

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON CAMBIOS  
RELACIONADOS CON MIELODISPLASIA:  
CARACTERIZACIÓN CITOMORFOLÓGICA,  
CITOGENÉTICA Y MOLECULAR, Y VALOR  
PRONÓSTICO DE MUTACIONES EN EL GEN *ASXL1***

CONCEPCIÓN PRATS MARTÍN

SEVILLA, 2023



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON CAMBIOS  
RELACIONADOS CON MIELODISPLASIA:  
CARACTERIZACIÓN CITOMORFOLÓGICA,  
CITOGENÉTICA Y MOLECULAR, Y VALOR  
PRONÓSTICO DE MUTACIONES EN EL GEN *ASXL1***

Tesis presentada para optar al grado de Doctor por  
Concepción Prats Martín

Realizada bajo la dirección de los doctores José Antonio Pérez Simón y  
Rosario María Morales Camacho

Sevilla, 2023



D. José Antonio Pérez Simón, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON CAMBIOS RELACIONADOS CON MIELODISPLASIA: CARACTERIZACIÓN CITOMORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA Y MOLECULAR, Y VALOR PRONÓSTICO DE MUTACIONES EN EL GEN *ASXL1*” ha sido realizado por la licenciada Concepción Prats Martín bajo su dirección, y reúne a su juicio las condiciones y méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en Sevilla, a 17 de enero de 2023.

Fdo. Dr. José Antonio Pérez Simón

Director y Tutor de la Tesis



Dña. Rosario María Morales Camacho, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON CAMBIOS RELACIONADOS CON MIELODISPLASIA: CARACTERIZACIÓN CITOMORFOLÓGICA, CITOGÉNICA Y MOLECULAR, Y VALOR PRONÓSTICO DE MUTACIONES EN EL GEN *ASXL1*” ha sido realizado por la licenciada Concepción Prats Martín bajo su dirección, y reúne a su juicio las condiciones y méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en Sevilla, a 17 de enero de 2023.

Fdo. Dra. Rosario María Morales Camacho

Directora de la Tesis



A Concha, Manolo y África



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Antonio Pérez Simón, tutor y director de la tesis, por su inestimable ayuda y por su confianza en mí para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Rosario M<sup>a</sup> Morales Camacho, directora de la tesis, por ofrecerme su amistad, su conocimiento y su apoyo siempre.

Al Dr. Sergio Burillo, por estar siempre dispuesto a ayudarme y por su trabajo indispensable en este proyecto.

A los Dres. Antonio Martín Noya y Ricardo Bernal, por su enseñanza y su afecto.

A mis compañeros del área de Diagnóstico y a todos los miembros del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, por tantos momentos compartidos y por su entrega diaria.

A los pacientes hematológicos, por todo lo que nos enseñan en circunstancias a veces tan difíciles.

A mis padres y hermanos, por su ejemplo, su cariño y su apoyo incondicional.

A Manolo y a mis hijos Concha, África y Manolo, por entender el esfuerzo pese al tiempo que les he robado, y por hacerme ver lo importante de la vida.



# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA .....	3
1.1. Definición .....	3
1.2. Epidemiología .....	3
1.3. Diagnóstico .....	5
1.4. Historia del conocimiento y evolución de las clasificaciones: de la FAB a la OMS .....	5
1.5. Pronóstico: clasificación de la <i>European LeukemiaNet</i> .....	10
1.6. Tratamiento .....	13
2. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON CAMBIOS RELACIONADOS CON MIELODISPLASIA .....	15
2.1. Definición .....	15
2.2. Antecedentes de la categoría .....	16
2.3. Epidemiología .....	18
2.4. Clínica .....	19
2.5. Aspectos citomorfológicos .....	20
2.6. Citogenética .....	25
2.7. Caracterización molecular .....	28
2.8. Valor pronóstico de la categoría .....	31
2.9. Tratamiento .....	34
3. LAS MUTACIONES EN <i>ASXL1</i> EN LAS NEOPLASIAS MIELOIDES .....	39
3.1. El gen <i>ASXL1</i> .....	39
3.2. La mutación de <i>ASXL1</i> en las neoplasias mieloides .....	40
3.3. Características asociadas a la presencia de mutación de <i>ASXL1</i> en LMA .....	42
3.4. Características asociadas a la presencia de mutación de <i>ASXL1</i> en LMA-CRM .....	42
<b>II. RESUMEN DE LA SITUACIÓN ACTUAL</b> .....	47
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	51

<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	55
1. Criterios de selección de pacientes .....	55
2. Datos clínicos .....	57
3. Estudio citomorfológico .....	58
4. Estudio de citometría de flujo .....	60
5. Estudio citogenético .....	61
6. Secuenciación del exón 12 de <i>ASXL1</i> .....	68
7. Técnica de secuenciación de nueva generación .....	69
8. Clasificación de los pacientes con LMA-CRM .....	69
9. Análisis estadístico .....	70
<b>V. RESULTADOS</b> .....	75
1. PARTE I: CARACTERÍSTICAS CITOMORFOLÓGICAS, CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES DE LOS PACIENTES CON LMA-CRM AL DIAGNÓSTICO .....	75
1.1. Características citomorfológicas de las LMA-CRM .....	76
1.2. Características citogenéticas de las LMA-CRM .....	79
1.3. Características moleculares de las LMA-CRM .....	80
1.4. Tratamiento y supervivencia .....	82
1.5. Diferencias por subgrupos diagnósticos: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo .....	83
1.6. Grupo control de LMA-NE: características y diferencias con LMA-CRM .....	87
2. PARTE II: ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN <i>ASXL1</i> A LMA-CRM.....	91
2.1. Prevalencia de la mutación en <i>ASXL1</i> en pacientes con LMA-CRM y con LMA-NE .....	91
2.2. Tipos de mutaciones detectadas en el gen <i>ASXL1</i> .....	91
2.3. Asociación de la mutación en el exón 12 de <i>ASXL1</i> con características clínicas, citomorfológicas y genéticas en LMA-CRM .....	93
2.4. Características de los pacientes con LMA-NE con mutación en <i>ASXL1</i> .....	98
3. PARTE III: ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA DISPLASIA .....	99
3.1. Evaluación del valor pronóstico independiente de la displasia multilínea .....	99
3.2. Asociación de rasgos citomorfológicos de displasia con pronóstico en LMA-CRM .....	101
3.3. Otras variables con impacto pronóstico en LMA-CRM .....	104

<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	109
1. PARTE I: Características citomorfológicas, citogenéticas y moleculares de los pacientes con LMA-CRM al diagnóstico .....	109
2. PARTE II: Estudio de la asociación de la mutación <i>ASXL1</i> a LMA-CRM .....	113
3. PARTE III: Estudio del valor pronóstico de la displasia .....	119
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	127
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	129
1. ANEXO 1: LMA RELACIONADA CON MIELODISPLASIA, DEFINICIÓN DE LA OMS 2022 .....	131
2. ANEXO 2: CLASIFICACIÓN DE LAS LMA DE LA OMS 2022 .....	133
3. ANEXO 3: CLASIFICACIÓN DE LAS LMA DE LA ICC 2022 .....	135
4. ANEXO 4: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS .....	137
5. ANEXO 5: RELACIÓN DE TABLAS .....	139
6. ANEXO 6: RELACIÓN DE FIGURAS .....	141
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	145



## **ABREVIATURAS**



## **ABREVIATURAS**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARA-C:** arabinósido de citosina

**ASXL1:** *additional sex combs-like 1*

**BSA:** *bovine serum albumin*

**CEBPA:** *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*

**CETLAM:** Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias

**CLK:** cloruro potásico

**COSMIC:** *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EE. UU.:** Estados Unidos

**ELN:** *European Leukemia Net*

**EMA:** *European Medicines Agency*

**EMR:** enfermedad medible residual

**FAB:** *French-American-British Cooperative Group*

**FISH:** *fluorescence in situ hybridization*

**FLT3:** *fms related receptor tyrosine kinase 3*

**FLT3-ITD:** *FLT3-internal tandem duplication*

**HR:** *hazard ratio*

**IC:** intervalo de confianza

**ICC:** *International Consensus Classification*

**IDH1:** *isocitrate deshidrogenase-1*

**IDH2:** *isocitrate deshidrogenase-2*

**ISCN:** *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

**KMT2A:** *lisina-(k) metiltransferasa 2a*

**LMA:** leucemia mieloide aguda

**LMA-CRM:** leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia

**LMA-RM:** leucemia mieloide aguda relacionada con mielodisplasia

**LMA-NE:** leucemia mieloide aguda no especificada de otra manera

**LMA-t:** leucemia mieloide aguda relacionada con el tratamiento

**MGG:** May-Grünwald Giemsa

**MIC:** *Morphology-Immunophenotype-Cytogenetics*

**ml:** mililitros

**NGS:** *next generation sequencing*

**NMP:** neoplasia mieloproliferativa

**NPM1:** *nucleophosmin-1*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAS:** ácido peryódico de Schiff

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PETHEMA:** Programa Español para el Tratamiento de las Hemopatías Malignas

**PML-RARA:** fusión *PML (promyelocytic leukaemia)* y *RARA (retinoic acid receptor  $\alpha$ )*

**PDGFRB:** *platelet derived growth factor receptor beta*

**RC:** remisión completa

**REDECAN:** Red Española de Registros de Cáncer

**RP:** remisión parcial

**RPM:** revoluciones por minuto

**RUNX1:** *runt related transcription factor 1*

**SEER:** *The Surveillance, Epidemiology and End Results*

**SMD:** síndrome mielodisplásico

**SMD/NMP:** neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa

**SSC:** *saline sodium citrate*

**TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos

**VAF:** *variant allele frequency*

# **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

### 1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

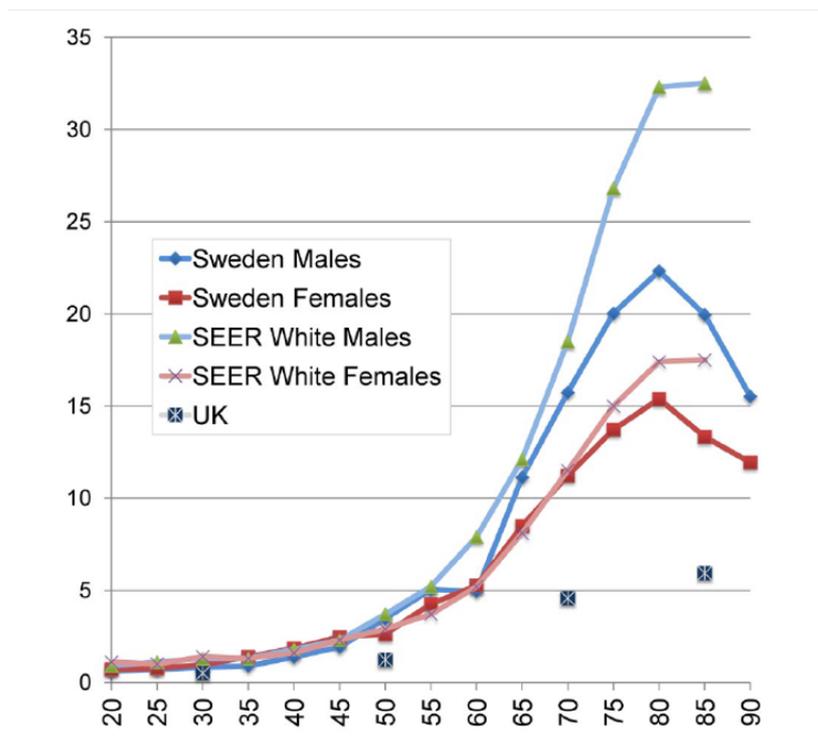
#### 1.1. Definición

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad heterogénea que tiene su origen en un trastorno clonal de las células progenitoras hematopoyéticas que pierden su capacidad de diferenciación normal y de respuesta a los mecanismos reguladores de la proliferación. Como consecuencia, se produce una expansión clonal de células mieloides inmaduras (blastos mieloides) en la médula ósea, la sangre periférica y/u otros tejidos, que impide el crecimiento de las células sanguíneas normales (1,2). Es un trastorno que puede afectar a una o a todas las líneas mieloides y que se caracteriza por una gran diversidad citogenética y molecular, con presentación clínica, respuesta al tratamiento y supervivencia muy variables.

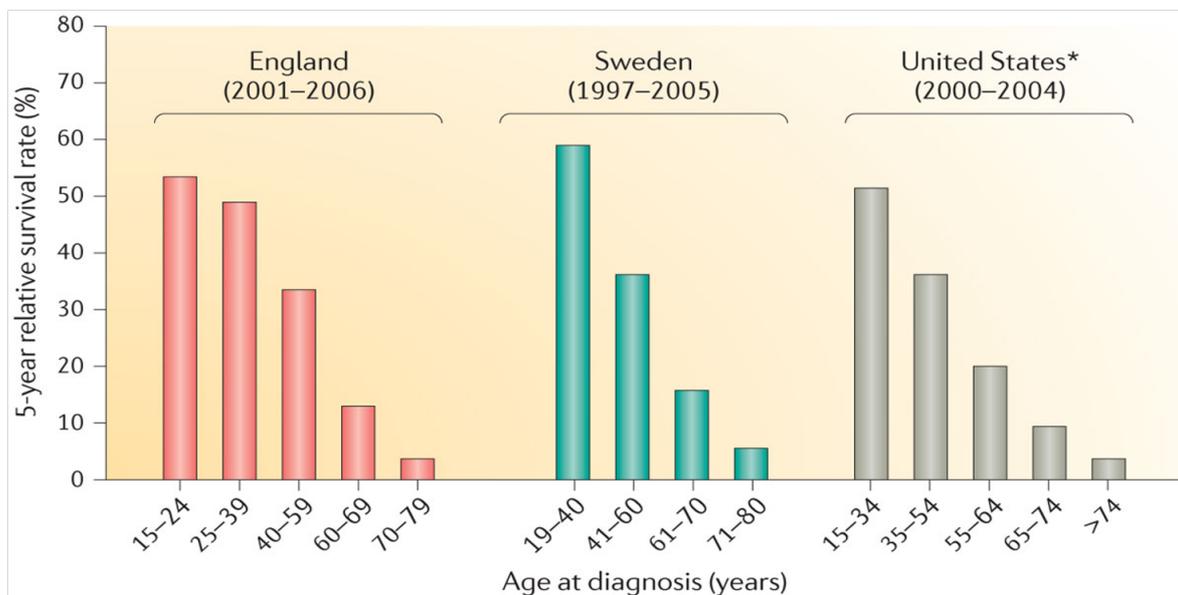
#### 1.2. Epidemiología

Se estima que en 2022 se produjeron 20050 casos nuevos de LMA en los Estados Unidos (EE. UU.), lo que supone un 1% de todos los cánceres diagnosticados en ese año. Su incidencia es de 4,1 casos por 100000 personas por año (basado en casos de 2015-2019 en EE. UU.), y muestra un incremento progresivo con la edad (Figura 1) (3,4). En particular en España, la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) estimó el número de casos de LMA para el año 2021 en 2060 (en base a la incidencia poblacional observada para 2002-2013), y la incidencia en 4,17 casos nuevos por 100000 habitantes y año (5).

Se trata del tipo de leucemia aguda más frecuente en el adulto, con una mediana de edad al diagnóstico de 68 años; mientras que en niños (edad  $\leq 15$  años) supone solo del 15 al 20% de los casos de leucemia. A pesar de que la supervivencia de los pacientes con LMA ha mejorado notablemente en los últimos años, sigue siendo una enfermedad de elevada mortalidad, con una tasa de muertes de 2,7 por 100000 personas por año (basado en datos de 2016-2020 en EE. UU.) y una supervivencia global del 30,5% a 5 años (datos de 2012-2018 en EE. UU.), aunque con diferencias notables en función del grupo de edad (Figura 2) (3,6,7).



**Figura 1.** Incidencia anual de LMA por 100000 habitantes según edad y sexo en Suecia (1997 a 2006), en el registro SEER (EE. UU., 2004-2008) y en el Reino Unido (Tomado de Juliusson G. y colaboradores, 2012) (4).



**Figura 2.** Supervivencia relacionada con la edad en pacientes con LMA en Inglaterra, Suecia y EE. UU. (Tomado de Khwaja A. y colaboradores, 2016) (7).

### 1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de una LMA se fundamenta según la clasificación de las neoplasias hematológicas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2017, en la detección de un porcentaje igual o superior al 20% de blastos mieloides en la médula ósea y/o la sangre periférica. Existen algunas excepciones en las que el diagnóstico puede establecerse independientemente del porcentaje de blastos observado, son aquellos casos en los que se asocia una  $t(8;21)(q22; q22.1)$ , una  $inv(16)(p13.1 q22)$  o  $t(16;16)(p13.1; q22)$  o una fusión *PML-RARA*. El sarcoma mieloides es también sinónimo de LMA independientemente del número de blastos observado en la médula ósea y/o la sangre periférica (8).

### 1.4. Historia del conocimiento y evolución de las clasificaciones: de la FAB a la OMS

A lo largo de los años se han utilizado diferentes criterios para el diagnóstico y la categorización de las LMA, cuyos cambios han ido reflejando el conocimiento adquirido, cada vez más preciso, de esta patología. La primera clasificación internacionalmente aceptada fue la del grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), publicada en el año 1976, en la que el diagnóstico de leucemia se establecía con la observación de una blastosis medular superior al 30%. En la clasificación FAB se describieron inicialmente seis categorías de LMA en función de la línea o líneas celulares afectadas y su grado de maduración, basándose en criterios exclusivamente citomorfológicos y citoquímicos. De este modo se definieron la M1, M2 y M3 (diferenciación granulocítica con diferente grado de maduración), la M4 (diferenciación granulocítica y monocítica), la M5 (monocítica) y la M6 (predominantemente eritroblástica) (Tabla 1) (9).

Cambios posteriores incluyeron: la descripción de la M3 variante (1980) (10); la incorporación del subtipo M4 con eosinofilia junto a la revisión de los criterios de clasificación (1985) (11); y, la introducción de dos nuevas categorías de LMA, la M7 (leucemia de línea megacariocítica) (1985) (12), y la M0 (leucemia con mínima diferenciación mieloides) (1991) (13), para cuya definición se utilizaron además de criterios citomorfológicos y citoquímicos, datos de inmunofenotipo y de microscopía electrónica (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación FAB de las leucemias mieloides agudas: M1-M6 (1976), M3 variante (1980), M4 Eo (1985), M7 (1985) y M0 (1991)

<b>Subtipo FAB</b>	<b>Denominación</b>
M0	Leucemia mieloide aguda mínimamente diferenciada
M1	Leucemia mieloblástica sin maduración
M2	Leucemia mieloblástica con maduración
M3	Leucemia promielocítica hipergranular – M3 variante
M4	Leucemia mielomonocítica – M4 con eosinofilia
M5	Leucemia monocítica <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pobremente diferenciada (monoblástica) (M5a)</li> <li>• Diferenciada (M5b)</li> </ul>
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia aguda megacarioblástica

Abreviaturas: FAB: grupo cooperativo Franco-Americano-Británico.

A partir de la clasificación FAB, y gracias a la aplicación generalizada de la citogenética al estudio de las LMA, empezaron a conocerse anomalías cromosómicas recurrentes que se asociaban a algunos subtipos morfológicos de leucemia. Esta información se plasmó en la descripción publicada en el año 1988 por el grupo de estudio cooperativo MIC (*morphology-immunophenotype-cytogenetics*) de diez categorías de LMA definidas por criterios citogenéticos, citomorfológicos e inmunológicos (Tabla 2) (14).

Asimismo, se empezó a relacionar la presencia de determinadas anomalías citogenéticas con pronóstico, como la obtención de una alta tasa de remisiones completas en los pacientes con M4Eo/inv(16) o una larga duración de las remisiones en los casos con M3/t(15;17) (14). Este grupo detalló además otras alteraciones citogenéticas que no se asociaban específicamente con un subtipo morfológico FAB de LMA, como la trisomía 8, la monosomía 7 y la deleción 7q, la deleción 5q, la pérdida del cromosoma Y, las trisomías 21 y 22, el isocromosoma (17q) y la deleción 9q (14).

**Tabla 2.** Clasificación MIC de las leucemias mieloides agudas

<b>Nomenclatura MIC</b>	<b>Morfología (FAB)</b>	<b>Anomalía citogenética</b>
M2/t(8;21)	M2	t(8;21)(q22;q22)
M3/t(15;17)	M3,M3v	t(15;17)(q22;q12)
M5a/t(11q)	M5a (M5b, M4) <sup>a</sup>	t/del(11)(q23)
M4Eo/inv(16)	M4Eo	inv/del(16)(q22)
M1/t(9;22)	M1 (M2) <sup>a</sup>	t(9;22)(q34;q11)
M2/t(6;9)	M2 o M4 con basofilia	t(6;9)(p21-22;q34)
M1/inv(3)	M1 (M2,M4,M7) <sup>a</sup> con trombocitosis	inv(3)(q21q26)
M5b/t(8;16)	M5b con fagocitosis	t(8;16)(p11;p13)
M2 Baso/t(12p)	M2 con basofilia	t/del(12)(p11-13)
M4/+4	M4 (M2) <sup>a</sup>	+4

<sup>a</sup>Asociaciones menos frecuentes. Abreviaturas: MIC: grupo cooperativo *morphology-immunophenotype-cytogenetics*; FAB: grupo cooperativo Franco-Americano-Británico.

A partir del año 1995, por iniciativa de la “*European Association for Haematopathology*” y la “*Society of Haematopathology*” de los EE. UU., empezó a gestarse la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS, que se comunicó por primera vez en el año 1999 (15) y se publicó como “libro azul” definitivamente en el año 2001 (tercera edición del libro OMS, que incluyó por primera vez la clasificación de las leucemias agudas) (16). En este nuevo sistema de clasificación se integraron aspectos clínicos, citomorfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares con la intención de definir entidades con importancia clínica y pronóstica. Como cambios significativos con respecto a clasificaciones previas, la OMS estableció un nuevo umbral para la definición de LMA con un porcentaje de blastos igual o superior al 20%, y reconoció cuatro grandes categorías de LMA: 1) las LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes, donde incluyó la t(8;21), la inv(16) o t(16,16), la t(15;17) y las anomalías en 11q23; 2) las LMA con displasia multilinea; 3) las LMA relacionadas con la terapia, que incluían aquellos casos surgidos tras la administración de quimioterapia citotóxica y/o radioterapia previas administradas para el tratamiento de otra neoplasia o de una enfermedad no neoplásica;

y 4) las LMA no categorizadas, donde quedaron agrupados los subtipos morfológicos clásicos que no cumplían criterios de ninguno de los grupos anteriores (16).

Esta clasificación ha tenido dos revisiones publicadas como libros en los años 2008 (cuarta edición) (17) y 2017 (cuarta edición revisada) (8), en las que se han ido perfilando algunas de las categorías ya existentes y se han definido nuevas, gracias en gran parte al avance de las técnicas de análisis molecular, que han permitido, junto a la citogenética clásica, identificar nuevas alteraciones recurrentes en LMA y definir nuevos subtipos biológicamente diferenciados de leucemia (18,19).

En concreto, en la edición del año 2008 se añadieron tres nuevas entidades con alteraciones citogenéticas recurrentes: la LMA con t(6;9), la LMA con inv(3) o t(3;3) y la LMA (megacarioblástica) con t(1;22) y, por primera vez, se incorporaron como entidades provisionales dos subtipos de LMA definidas por la presencia de mutaciones génicas, la LMA con mutación de *NPM1* y la LMA con mutación de *CEBPA*. Además, se sumaron dos nuevas categorías de LMA: las proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down y las neoplasias de células dendríticas plasmocitoides blásticas (17).

En la actualización de la OMS de 2017 quedaron definitivamente establecidas seis grandes categorías diagnósticas dentro de las LMA y neoplasias de precursores relacionadas: 1) las LMA con anomalías citogenéticas recurrentes; 2) las LMA con cambios relacionados con mielodisplasia (LMA-CRM); 3) las LMA relacionadas con el tratamiento (LMA-t); 4) las LMA no especificadas de otra manera (LMA-NE); 5) el sarcoma mieloides; y 6) las proliferaciones mieloides asociadas con el síndrome de Down. La clasificación de las LMA de la OMS de 2017 se describe en la Tabla 3. Además, se definió un nuevo grupo diagnóstico, el de las neoplasias mieloides con predisposición germinal, donde se incluyeron las LMA y síndromes mielodisplásicos (SMD) asociados con mutaciones hereditarias o *de novo* en la línea germinal (8).

Recientemente se ha publicado como artículo una nueva revisión de la clasificación OMS (5ª edición), pendiente aún de su publicación como libro. Los detalles de esta nueva clasificación se incorporan en la discusión y anexos de la tesis.

**Tabla 3.** Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de las leucemias mieloides agudas y neoplasias de precursores relacionadas (2017)

<p><b>LMA con anomalías citogenéticas recurrentes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>– LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></li> <li>– Leucemia promielocítica aguda con <i>PML-RARA</i></li> <li>– LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>KMT2A-MLLT3</i></li> <li>– LMA con t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></li> <li>– LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i></li> <li>– LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKLI</i></li> <li>– LMA con <i>BCR-ABL1</i> (entidad provisional)</li> <li>– LMA con mutaciones génicas: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ LMA con <i>NPM1</i> mutado</li> <li>○ LMA con mutación bialélica de <i>CEBPA</i></li> <li>○ LMA con <i>RUNX1</i> mutado (entidad provisional)</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>LMA con cambios relacionados con mielodisplasia</b></p>
<p><b>Neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento</b></p>
<p><b>LMA no especificadas de otra manera</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– LMA con mínima diferenciación</li> <li>– LMA sin maduración</li> <li>– LMA con maduración</li> <li>– Leucemia mielomonocítica aguda</li> <li>– Leucemia monoblástica/monocítica aguda</li> <li>– Leucemia eritroide pura</li> <li>– Leucemia megacarioblástica aguda</li> <li>– Leucemia aguda de basófilos</li> <li>– Panmielosis aguda con mielofibrosis</li> </ul>
<p><b>Sarcoma mieloide</b></p>
<p><b>Proliferaciones mieloides asociadas con el síndrome de Down</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Mielopoyesis anormal transitoria asociada con el síndrome de Down</li> <li>– Leucemia mieloide asociada con el síndrome de Down</li> </ul>

Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda.

### **1.5. Pronóstico: Clasificación de la *European LeukemiaNet***

Los factores que determinan el pronóstico de una LMA son múltiples. De una manera simplificada pueden subdividirse en tres categorías: los factores que dependen del paciente, aquellos dependientes de la leucemia y, por último, los relacionados con la respuesta al tratamiento.

A. Factores dependientes del paciente: entre los factores clínicos, la edad avanzada y un mal estado funcional o la presencia de comorbilidades se asocian a tasas más bajas de remisión completa y a una disminución de la supervivencia global en pacientes con LMA (20-23). Estas variables se relacionan con el riesgo de muerte temprana relacionada con el tratamiento. Por otro lado, en pacientes de más edad se ha descrito una mayor incidencia de alteraciones genéticas asociadas a mal pronóstico (24). El antecedente de una neoplasia hematológica o de exposición a terapia citotóxica para otra enfermedad también conllevan un pronóstico significativamente peor (25).

B. Factores dependientes de la leucemia: las alteraciones genéticas, incluyendo tanto la citogenética clásica como el perfil mutacional, constituyen el principal factor pronóstico de una LMA (18,19,26-28) y son el predictor más importante de resistencia al tratamiento. En el año 2010 y posteriormente en 2017 se publicaron las recomendaciones de la organización *European LeukemiaNet* (ELN) para la estratificación pronóstica de los pacientes con LMA (29,30). Esta guía establece tres grupos de riesgo: “favorable”, “intermedio” y “adverso”, en función de la presencia de determinadas alteraciones citogenéticas y moleculares (Tabla 4) (30). La relevancia pronóstica de este sistema de clasificación ha sido validada en numerosos estudios posteriores (31-34). Las recomendaciones de la ELN se han actualizado en el año 2022 (Tabla 5) (35).

C. Factores post-tratamiento: la respuesta alcanzada tras el inicio del tratamiento de una LMA determina en gran medida el pronóstico del paciente y desempeña un papel cada vez más relevante en la toma de decisiones terapéuticas. La obtención de una remisión completa tras la terapia de inducción se asocia a una supervivencia significativamente mayor (36); y más allá de la remisión completa morfológica, la persistencia de enfermedad medible residual (EMR) detectada por técnicas de citometría de flujo o de biología molecular, identifica a pacientes con un riesgo más alto de recaída, asociándose valores negativos de EMR a una mayor supervivencia global y supervivencia

libre de enfermedad en los pacientes con LMA (37-43). El valor predictor de la EMR se mantiene después del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (44).

**Tabla 4.** Estratificación pronóstica de la *European LeukemiaNet* (2017)

Categoría de riesgo	Anomalía genética/molecular
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> <li>– t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>– inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></li> <li>– <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> bajo<sup>1</sup></li> <li>– <i>CEBPA</i> mutación bialélica</li> </ul>
Intermedio	<ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> alto<sup>2</sup></li> <li>– <i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> bajo<sup>1</sup> (en ausencia de alteraciones citogenéticas adversas)</li> <li>– t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i><sup>3</sup></li> <li>– Alteraciones citogenéticas no clasificadas en riesgo favorable/adverso</li> </ul>
Adverso	<ul style="list-style-type: none"> <li>– t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></li> <li>– t(v;11q23.3); reordenamiento de <i>KMT2A</i></li> <li>– t(9;22) (q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></li> <li>– inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i></li> <li>– -5 o del(5q); -7; -17/alteración en (17p)</li> <li>– Cariotipo complejo<sup>4</sup>, cariotipo monosómico<sup>5</sup></li> <li>– <i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> alto<sup>2</sup></li> <li>– <i>RUNX1</i> mutado<sup>6</sup></li> <li>– <i>ASXL1</i> mutado<sup>6</sup></li> <li>– <i>TP53</i> mutado<sup>7</sup></li> </ul>

<sup>1</sup>Bajo: ratio *FLT3-ITD* < 0,5; <sup>2</sup>Alto: ratio *FLT3-ITD*: ≥0,5 <sup>3</sup>La presencia de t(9;11)(p21.3;q23.3) tiene prioridad sobre mutaciones concurrentes de riesgo adverso. <sup>4</sup>Tres o más anomalías cromosómicas no relacionadas en ausencia de una de las translocaciones o inversiones recurrentes de la OMS: t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3); LMA con *BCR-ABL1*. <sup>5</sup>Definido por la presencia de una monosomía única (excluyendo pérdida de X o Y) en asociación con al menos una monosomía adicional o anomalía cromosómica estructural (excluyendo LMA tipo *core-binding factor*). <sup>6</sup>Estos no deben usarse como marcador de pronóstico adverso si coinciden con subtipos de LMA de riesgo favorable. <sup>7</sup>Las mutaciones de *TP53* se asocian significativamente a LMA con cariotipo complejo y monosómico.

**Tabla 5.** Clasificación de riesgo genético de la *European LeukemiaNet* (2022)

Categoría de riesgo	Anomalía genética/molecular
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> <li>– t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i><sup>1</sup></li> <li>– inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i><sup>1</sup></li> <li>– <i>NPM1</i> mutado<sup>2</sup> sin <i>FLT3-ITD</i></li> <li>– <i>CEBPA</i> con mutación in-frame en bZIP<sup>3</sup></li> </ul>
Intermedio	<ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>NPM1</i> mutado con <i>FLT3-ITD</i><sup>2</sup></li> <li>– <i>NPM1</i> no mutado con <i>FLT3-ITD</i></li> <li>– t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3::KMT2A</i><sup>4</sup></li> <li>– Alteraciones citogenéticas y/o moleculares no clasificadas en riesgo favorable/adverso</li> </ul>
Adverso	<ul style="list-style-type: none"> <li>– t(6;9)(p23;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i></li> <li>– t(v;11q23.3)/reordenamiento <i>KMT2A</i><sup>5</sup></li> <li>– t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i></li> <li>– t(8;16)(p11;p13)/<i>KAT6A::CREBBP</i></li> <li>– inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2, MECOM(EV11)</i></li> <li>– t(3q26.2;v)/reordenamiento <i>MECOM(EV11)</i></li> <li>– -5 o del(5q); -7; -17/alteración en (17p)</li> <li>– Cariotipo complejo<sup>6</sup>, cariotipo monosómico<sup>7</sup></li> <li>– Mutaciones <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i>, o <i>ZRSR2</i><sup>8</sup></li> <li>– <i>TP53</i> mutado<sup>9</sup></li> </ul>

<sup>1</sup>La concurrencia de la mutación del gen *KIT* y/o *FLT3* no altera la categorización de riesgo. <sup>2</sup>La LMA con mutación *NPM1* y anomalías citogenéticas de riesgo adverso se clasifican como de riesgo adverso. <sup>3</sup>Solo las mutaciones en marco que afectan la región bZIP de *CEBPA*, independientemente de si ocurren como mutaciones mono o bialélicas, se han asociado con un pronóstico favorable. <sup>4</sup>La presencia de t(9;11)(p21.3;q23.3) tiene prioridad sobre mutaciones génicas raras concurrentes de riesgo adverso. <sup>5</sup>Excluyendo la duplicación parcial en tándem *KMT2A*. <sup>6</sup>Cariotipo complejo:  $\geq 3$  anomalías cromosómicas no relacionadas en ausencia de otra anomalía citogenética recurrente definitiva; excluye los cariotipos hiperdiploides con 3 o más trisomías (o polisomías) sin anomalías estructurales. <sup>7</sup>Cariotipo monosómico: presencia de 2 o más monosomías distintas (excluyendo la pérdida de X o Y), o una sola monosomía autosómica en combinación con al menos una anomalía cromosómica estructural (excluyendo LMA tipo *core-binding factor*). <sup>8</sup>Por el momento, estos marcadores no deben usarse como un marcador de pronóstico adverso si coexisten con subtipos de LMA de riesgo favorable. <sup>9</sup>Mutación de *TP53* con una VAF de al menos 10%, independientemente del estado alélico de *TP53* (mutación mono o bialélica); las mutaciones de *TP53* se asocian significativamente a LMA con cariotipo complejo y monosómico.

## 1.6. Tratamiento

La estrategia general de tratamiento de una LMA se puede dividir en dos fases, una primera que es la terapia de inducción, en la que se persigue conseguir la remisión de la enfermedad; y una segunda post-remisión o de consolidación que tiene como finalidad erradicar la carga tumoral residual con el fin de disminuir la probabilidad de recaída y conseguir una remisión duradera.

El pilar fundamental de la terapia de inducción consiste en el régimen de “3+7”, que combina siete días de infusión continua de arabinósido de citosina (ARA-C) con tres días de antraciclina (idarrubicina, daunorrubicina). Aunque se han utilizado otras combinaciones de fármacos citotóxicos en la inducción, de manera generalizada ninguna ha demostrado ser claramente superior (1,29,45,46). Este esquema de tratamiento es el estándar para la mayoría de los pacientes candidatos a terapia intensiva. Aproximadamente el 60-80% de los adultos jóvenes (<55-60 años) logran la remisión completa, mientras que entre los adultos mayores la remisión completa se alcanza en el 40-60% (1,29,45,46). Nuevas aproximaciones terapéuticas incluyen la adición de fármacos específicos dirigidos frente a antígenos de superficie celular, frente a mutaciones, o frente a vías de transducción de señales, que van a tener un papel de manera individualizada en lo que se conoce como terapia dirigida. Entre otros, se emplean inhibidores de *FLT3*, como midostaurin, sorafenib, quizartinib o crenolanib; inhibidores de *IDH1/IDH2*, como ivosidenib o enasidenib; inhibidores de BCL-2, como venetoclax; o anticuerpos monoclonales dirigidos frente a moléculas de membrana como gemtuzumab o zoogamicina (anti-CD33). También se han desarrollado nuevas formulaciones de agentes citotóxicos clásicos como CPX-351, que es una formulación liposomal de citarabina y daunorrubicina que ha demostrado mejorar la supervivencia en pacientes con LMA-t y LMA-CRM (47).

Las estrategias posteriores a la remisión incluyen la consolidación con quimioterapia intensiva (dosis intermedias o altas de citarabina), seguidas o no de TPH autólogo o alogénico. La categoría de riesgo del paciente y la monitorización de la EMR post-tratamiento son decisivas para determinar la mejor opción terapéutica en cada caso. Como terapia de mantenimiento se han ensayado fármacos como la azacitidina o el midostaurin, aunque no existen recomendaciones generalizadas al respecto.

En pacientes que por edad o comorbilidades no son candidatos a quimioterapia intensiva las posibilidades de tratamiento son mucho más limitadas. Entre las diferentes opciones se encuentran: los agentes hipometilantes (azacitidina o decitabina), solos o en combinación con otros agentes como venetoclax, tratamientos de baja intensidad como la citarabina a dosis bajas, la terapia de soporte, o, en los casos en los que sea posible, la inclusión en ensayos clínicos con fármacos o combinaciones de fármacos en investigación.

## 2. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON CAMBIOS RELACIONADOS CON MIELODISPLASIA

### 2.1. Definición

La LMA-CRM tal y como queda definida en la clasificación OMS de 2017 es un subtipo de LMA en la que se cumplen uno o más de los siguientes criterios diagnósticos (48):

- Presencia de displasia multilínea, entendida como la aparición de rasgos morfológicos de displasia en  $\geq 50\%$  de las células de dos o más líneas celulares hematopoyéticas mieloides (granulocítica, eritroide y/o megacariocítica).
- Historia previa de SMD o de neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa (SMD/NMP).
- Presencia de alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (Tabla 6).

**Tabla 6.** Alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (OMS 2017)

<b>Cariotipo complejo (<math>\geq 3</math> anomalías)</b>	
<b>Anomalías en desequilibrio</b>	<b>Anomalías equilibradas</b>
– -7 o del(7q)	– t(11;16)(q23.3;p13.3)
– del(5q) o t(5q)	– t(3;21)(q26.2;q22.1)
– Isocromosoma 17q o t(17p)	– t(1;3)(p36.3;q21.2)
– -13 o del(13q)	– t(2;11)(p21;q23.3)
– del(11q)	– t(5;12)(q32;p13.2)
– del(12p) o t(12p)	– t(5;7)(q32;q11.2)
– idic(X)(q13)	– t(5;17)(q32;p13.2)
	– t(5;10)(q32;q21)
	– t(3;5)(q25.3;q35.1)

Se excluyen los casos de LMA-t y de LMA con anomalías citogenéticas recurrentes. Quedan también fuera de este grupo aquellos casos con mutación bialélica de *CEBPA* o mutación de *NPM1* que tienen displasia multilínea como único criterio diagnóstico de LMA-CRM, englobándose estos últimos dentro de las LMA con anomalías citogenéticas recurrentes, cada uno en el subtipo molecular correspondiente.

## 2.2. Antecedentes de la categoría

La existencia de leucemias mieloides agudas *de novo* con marcados rasgos de mielodisplasia fue ya señalada por el grupo FAB en el año 1982 en su propuesta de diagnóstico y clasificación de los SMD (49). En esta publicación, Bennett y colaboradores señalaban que podía ser indicativo de una fase subclínica de SMD y de una posible etiología diferenciada de la que podían tener las LMA sin rasgos de mielodisplasia. En la revisión de la clasificación de las LMA que este mismo grupo realiza en el año 1985 se menciona que “las leucemias secundarias que a menudo evolucionan a través de una fase de SMD tienen características atípicas y con frecuencia no pueden clasificarse fácilmente según las propuestas de la FAB” (11). Estas constituyen probablemente las primeras aproximaciones al concepto actual de LMA-CRM.

De la misma época son las primeras publicaciones en las que se describe el valor pronóstico de la presencia de displasia en la hematopoyesis residual de los pacientes con LMA. En 1987, Jinnai y colaboradores asociaron la dismegacariopoyesis a pobre respuesta a la quimioterapia en pacientes con LMA *de novo* (50). En 1992, Goasguen y colaboradores relacionaron la disgranulopoyesis con una menor tasa de respuestas completas y con una mayor frecuencia de anomalías citogenéticas (51). La relación entre la dishemopoyesis y un cariotipo desfavorable fue reportada en 1996 por Gahn y colaboradores (52), quienes también describieron la disgranulopoyesis como un factor pronóstico adverso en pacientes con cariotipo normal, favorable o incierto. Y, Tamura y colaboradores demostraron en 1998 una menor supervivencia libre de enfermedad tras la remisión en pacientes con LMA *de novo* con displasia trilínea (53).

A partir del año 1999 la OMS introduce la displasia como un parámetro de clasificación, creando por primera vez una categoría de LMA que, de manera similar a los SMD, se caracterizaba por la presencia de dishemopoyesis, y a la que denominó LMA con displasia multilínea (15,16). En su clasificación de 2001 quedó definida como aquella LMA con displasia en un porcentaje igual o superior al 50% de las células de dos o más líneas hematopoyéticas mieloides, generalmente incluyendo megacariocitos, que podía presentarse *de novo* o siguiendo a un SMD o a un SMD/NMP. Las alteraciones

cromosómicas encontradas en esta nueva categoría eran similares a las de los SMD, aunque no suponían un criterio diagnóstico. Se consideró como un grupo de riesgo adverso por su respuesta desfavorable a la quimioterapia (54,55). Estudios posteriores a su definición apoyaron la validez de este subtipo de LMA (56), sin embargo, en otros no se corroboró que la displasia tuviera un valor pronóstico independiente, especialmente al considerar la presencia de alteraciones citogenéticas (57-59).

En el año 2008 la OMS redefinió la categoría para incluir como criterios diagnósticos la historia previa de SMD o SMD/NMP, ya apuntada previamente, y la presencia de determinadas anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (Tabla 7) (17,60); el grupo pasó a llamarse LMA con cambios relacionados con mielodisplasia. Según su nueva definición se podía pertenecer a esta categoría por tres posibles razones: la displasia multilinea, el antecedente de SMD o SMD/NPM y la presencia de anomalías citogenéticas relacionadas con SMD, pudiendo un caso cumplir uno, dos o los tres criterios diagnósticos. Además se especificaba la necesidad de excluir el antecedente de terapia citotóxica y/o radioterapia previas y la presencia de alteraciones citogenéticas específicas de las LMA con anomalías citogenéticas recurrentes.

**Tabla 7.** Alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (OMS 2008)

<b>Cariotipo complejo (<math>\geq 3</math> anomalías)</b>	
<b>Anomalías en desequilibrio</b>	<b>Anomalías equilibradas</b>
– -7 o del(7q)	– t(11;16)(q23.3;p13.3)
– del (5q) o t(5q)	– t(3;21)(q26.2;q22.1)
– Isocromosoma 17q o t(17p)	– t(1;3)(p36.3;q21.2)
– -13 o del(13q)	– t(2;11)(p21;q23.3)
– del(11q)	– t(5;12)(q32;p13.2)
– del(12p) o t(12p)	– t(5;7)(q32;q11.2)
– del(9q)	– t(5;17)(q32;p13.2)
– idic(X)(q13)	– t(5;10)(q32;q21)
	– t(3;5)(q25.3;q35.1)

De nuevo la relevancia pronóstica del grupo fue refrendada en alguna serie de casos (61), mientras que otros estudios cuestionaron el impacto pronóstico independiente de la displasia multilínea (62,63), corroborándose la asociación de esta con el antecedente de SMD y con la presencia de anomalías citogenéticas relacionadas con SMD, pero no un valor pronóstico independiente (62). Asimismo, diferentes publicaciones evidenciaron que, en los casos de LMA con mutación bialélica de *CEBPA* o mutación de *NPM1*, la displasia multilínea por sí sola (en ausencia de alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD) no empeoraba el pronóstico de los pacientes (64,65), sugiriendo que estos casos estarían mejor catalogados de acuerdo al estado mutacional y no a la presencia o no de displasia. Aun así, en el grupo de pacientes con citogenética de riesgo intermedio, excluidos los casos con mutación de *NPM1*, la detección de displasia multilínea mostró en algunos estudios su utilidad a efectos de diferenciar a pacientes con un pronóstico desfavorable (66,67), dato a favor de la validez de la displasia como criterio diagnóstico de esta categoría.

En la actualización de la clasificación de la OMS de 2017 (8,68), el grupo de las LMA-CRM se mantuvo con algunas modificaciones. El principal cambio fue la exclusión de esta categoría de los pacientes con displasia multilínea como único criterio de LMA-CRM en los que se detectara una mutación bialélica de *CEBPA* o una mutación de *NPM1*, pacientes que pasaron a estar clasificados dentro de las LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes. En ausencia de estas mutaciones, la displasia multilínea se mantuvo como criterio de diagnóstico. La segunda modificación correspondió a la lista de anomalías citogenéticas definitorias de LMA-CRM, de las que se eliminó la delección (9q) por su asociación con mutaciones de *NPM1* o bialélicas de *CEBPA*, y su ausencia de impacto pronóstico en presencia de estas mutaciones (68-70). El resto de alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD (Tabla 6) así como el antecedente de SMD o SMD/NMP continuaron siendo criterios de diagnóstico.

### **2.3. Epidemiología**

Las LMA-CRM representan entre el 21 y el 48% de las LMA del adulto (56,58,61,71,72) y de un 14 a un 21,8% de las LMA en niños (73-75). En adultos es más común en

pacientes de edad avanzada, con una mediana de edad al diagnóstico en torno a los 70 años, y tiende a ser algo más frecuente en hombres (62,76). En niños, la mediana de edad al diagnóstico es de 11 años (73).

Se diagnostican más casos *de novo* que como progresión de un SMD o de un SMD/NMP (56,62,76).

#### 2.4. Clínica

Los pacientes con LMA-CRM presentan síntomas similares a los de otros tipos de LMA aunque, debido a su frecuente inicio a una edad avanzada, muchos casos pueden presentar mayor número de comorbilidades y un peor estado funcional, lo que va a hacer menos probable que reciban un tratamiento con quimioterapia intensiva.

Parte de las manifestaciones que pueden aparecer derivan de las citopenias que se producen como consecuencia de la infiltración blástica de la médula ósea. Son habituales los síntomas generales como cansancio, debilidad o disnea. La aparición de hematomas, de petequias o de otros signos hemorrágicos se produce con frecuencia como una manifestación temprana de la enfermedad. La presencia de neutropenia puede conducir a una mayor incidencia de infecciones, que pueden ser especialmente graves cuando la cifra de granulocitos es inferior a  $0,5 \times 10^9/L$ . La infiltración leucémica de otros tejidos, como el hígado (hepatomegalia), bazo (esplenomegalia), piel (leucemia cutis), ganglios linfáticos (adenopatías), sistema nervioso central, etc. puede producir otras manifestaciones clínicas variadas. En los casos en los que la cifra de blastos es muy alta (hiperleucocitosis) pueden aparecer síntomas de leucostasis como disfunción ocular y cerebrovascular o afectación pulmonar (77).

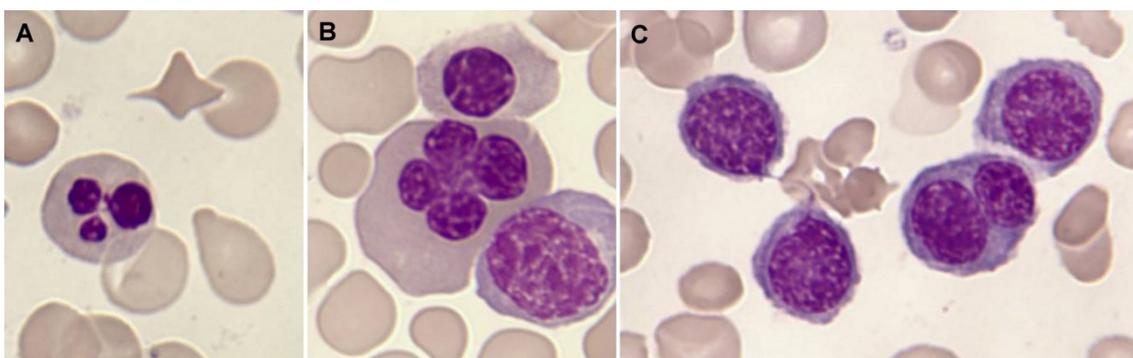
En relación a los antecedentes médicos resulta relevante la valoración de los tratamientos recibidos, ya que los pacientes con terapia citotóxica y/o radioterapia previas quedarían excluidos de esta categoría y clasificados como LMA-t. Por el contrario, en casos con un diagnóstico previo de SMD o SMD/NMP es posible hacer una rápida categorización del paciente dentro de las LMA-CRM.

## 2.5. Aspectos citomorfológicos

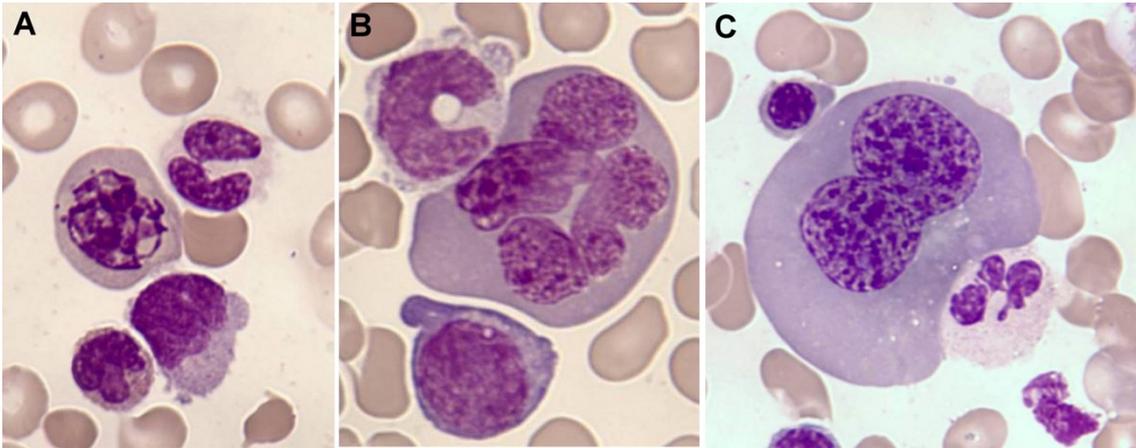
La displasia multilinea es una característica habitual de las LMA-CRM además de uno de sus criterios de diagnóstico. Se define por la presencia de anomalías citomorfológicas en el 50% o más de las células de dos o más líneas hematopoyéticas mieloides: eritroide, granulocítica y/o megacariocítica (48). Los signos morfológicos de displasia son superponibles a los observados en los SMD.

### A. Serie eritroide

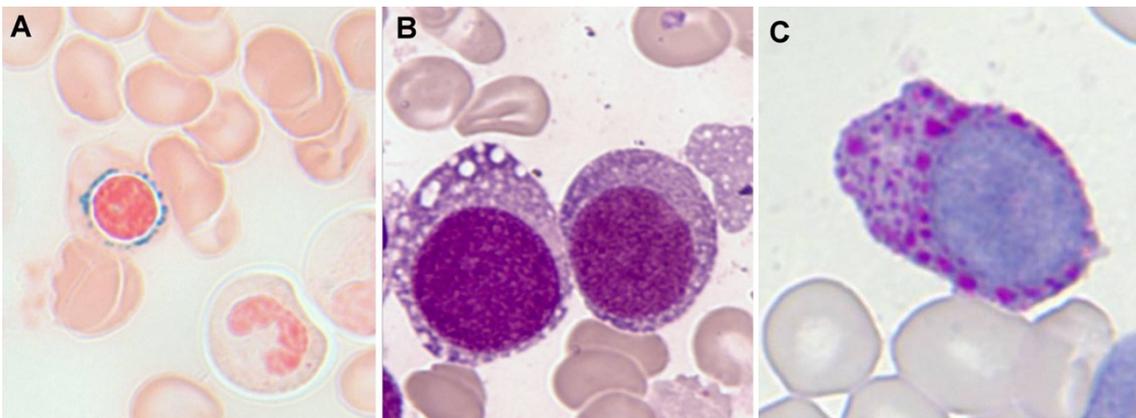
En la serie eritroide la OMS describe como signos de displasia característicos de las LMA-CRM: los rasgos megaloblásticos, la cariorrexis, las irregularidades del núcleo (como constricciones/lobulaciones o puentes internucleares), la fragmentación nuclear, la multinuclearidad, los sideroblastos en anillo (puestos de manifiesto con la tinción de Perls), las vacuolas citoplasmáticas y la positividad con la reacción del PAS (ácido peryódico de Schiff), ya sea con patrón difuso o granular (48) (Figuras 3, 4 y 5). Estas alteraciones son las mismas que se describen en el capítulo de la OMS de los SMD (78). Además, también pueden aparecer otros signos de diseritropoyesis como la macrocitosis o el gigantismo, los puentes citoplasmáticos, el punteado basófilo, los defectos de hemoglobinización y los restos cromatínicos, aunque estas alteraciones son en general menos específicas (79,80).



**Figura 3.** Signos de diseritropoyesis. Médula ósea, tinción de May-Grünwald Giemsa (MGG) x1000. A) Constricciones nucleares. B) Constricciones nucleares y macrocitosis. C) A la izquierda un puente internuclear, a la derecha una forma binucleada.



**Figura 4.** Signos de diseritropoyesis. Médula ósea, tinción de MGG x1000. A) Cariorexix. B) Multinuclearidad y gigantismo. C) Rasgos megaloblásticos.

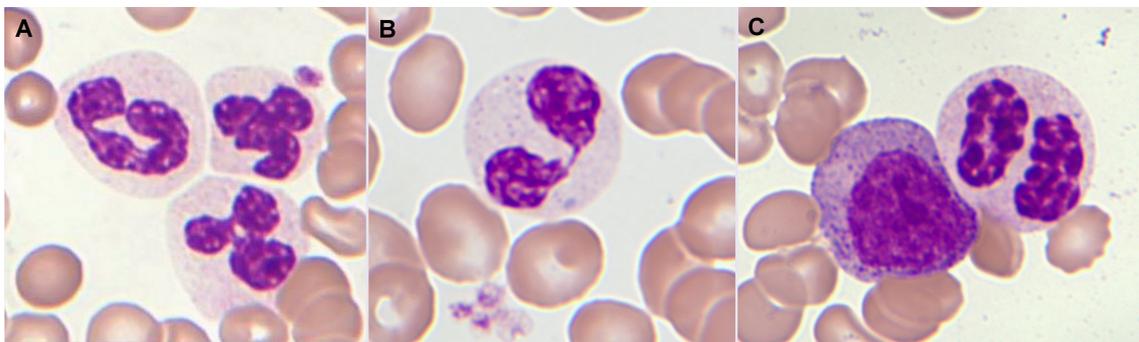


**Figura 5.** Signos de diseritropoyesis. Médula ósea A) Tinción de Perls x1000. Sideroblasto en anillo. B) Tinción de MGG x1000. Vacuolización en proeritroblastos. C) Reacción del PAS: positividad citoplasmática granular.

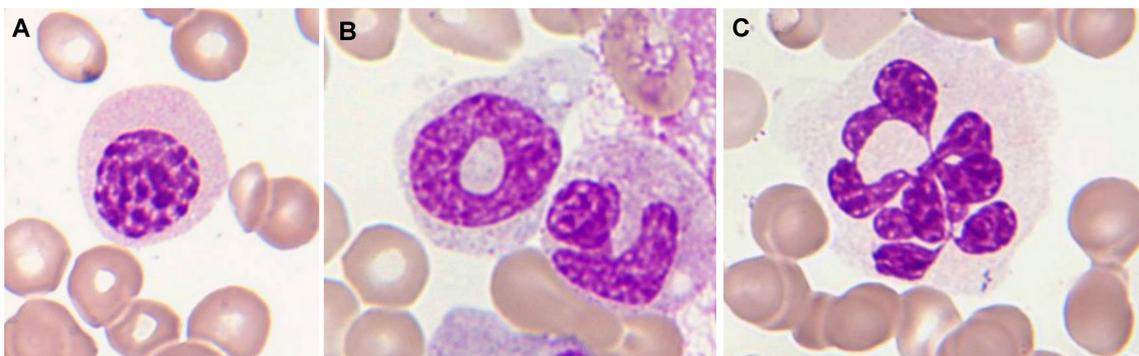
### B. Serie granulocítica

En la serie granulocítica las alteraciones morfológicas pueden ser muy variadas. La OMS describe como signos de de displasia más significativos y característicos de las LMA-CRM: los neutrófilos con citoplasma hipogranular, la hiposegmentación del núcleo (anomalía de pseudo-Pelger-Hüet) y la presencia de otras alteraciones en la segmentación nuclear, como los núcleos en espejo, los núcleos en anillo o la hipersegmentación (48) (Figuras 6 y 7). En algunos casos estas anomalías se pueden identificar más fácilmente

en la sangre periférica que en las extensiones de la médula ósea. Otros signos de disgranulopoyesis descritos por la OMS en los SMD también pueden verse en las LMA-CRM, como son el tamaño pequeño o anormalmente grande, la agranularidad, los gránulos tipo pseudo-Chédiak-Higashi, los cuerpos de Döhle (Figura 6) o los bastones de Auer (78,81). Junto a estos, también es frecuente observar otras alteraciones morfológicas como la condensación cromatínica anómala (Figuras 6 y 7), las vacuolas (Figura 7), el refuerzo periférico de la basofilia citoplasmática o la hemofagocitosis por precursores de la granulopoyesis (80-82).



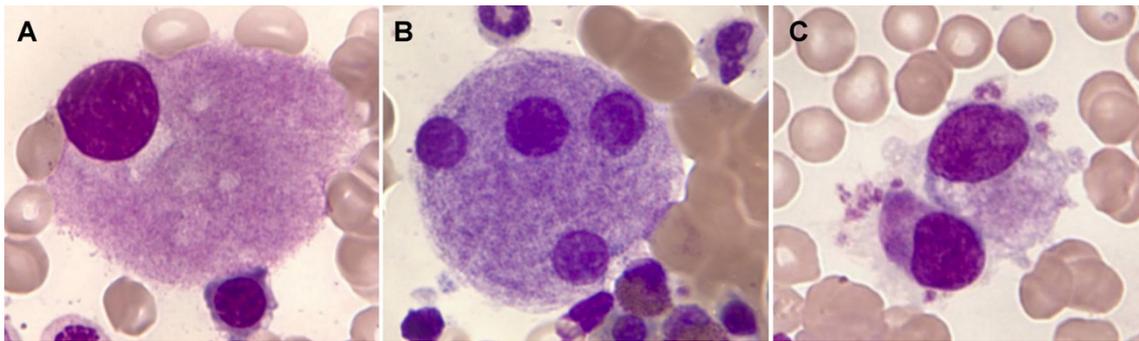
**Figura 6.** Signos de disgranulopoyesis. Tinción de MGG x1000. A) Sangre periférica: neutrófilos hipogranulares. B) Sangre periférica: hipogranularidad e hiposegmentación nuclear (pseudo-Pelger-Hüet). Cuerpo de Döhle. C) Médula ósea: neutrófilo con núcleos en espejo y condensación anómala de la cromatina.



**Figura 7.** Signos de disgranulopoyesis. Médula ósea, MGG x1000. A) Neutrófilo maduro sin segmentar (pseudo-Pelger-Hüet) y con condensación cromatínica anómala. B) Núcleo en anillo y vacuola citoplasmática. C) Tamaño grande, agranularidad e hipersegmentación nuclear.

### C. Serie megacariocítica

En la serie megacariocítica los signos de displasia descritos por la OMS en el capítulo de las LMA-CRM son: los micromegacariocitos, los megacariocitos con núcleo hipolobulado y los megacariocitos con núcleos múltiples separados (considerado más específico cuando los núcleos son redondeados y similares en talla) (48,78,83) (Figura 8). Estas alteraciones son las mismas que la OMS describe para los SMD y son las que tienen una correlación más alta con el diagnóstico de neoplasia mieloide (83). Otros signos de dismegacariopoyesis que pueden aparecer son: megacariocitos de talla pequeña, formas gigantes polilobuladas, megacariocitos con asincronías madurativas núcleo-citoplasmáticas o megacariocitos con vacuolización citoplasmática (80,83). En la valoración de la displasia megacariocítica es de gran utilidad el estudio de los cortes histológicos (48).



**Figura 8.** Signos de dismegacariopoyesis. Médula ósea, tinción de MGG x1000. A) Megacariocito de tamaño normal monolobulado. B) Megacariocito con núcleos múltiples separados. C) Micromegacariocitos.

Las principales manifestaciones de displasia en las series eritroide, granulocítica y megacariocítica descritas por la OMS se resumen en la Tabla 8 (48,78).

De entre todas las alteraciones morfológicas que pueden aparecer, las que se describen como más frecuentes en LMA-CRM son: en la serie eritroide, las irregularidades nucleares; en la serie granulocítica, la hipogranularidad; y en la serie megacariocítica, los micromegacariocitos y los megacariocitos con núcleos separados (84), siendo pocos los artículos en los que se describe este aspecto de las LMA-CRM.

**Tabla 8.** Principales manifestaciones morfológicas de displasia en SMD (OMS 2017)

Diseritropoyesis	<p>Alteraciones nucleares</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Constricciones/lobulaciones nucleares</li> <li>– Puentes internucleares</li> <li>– Cariorrexis</li> <li>– Multinuclearidad</li> <li>– Cambios megaloblásticos</li> </ul> <p>Alteraciones citoplasmáticas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Sideroblastos en anillo</li> <li>– Vacuolización</li> <li>– PAS positividad</li> </ul>
Disgranulopoyesis	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Hipogranularidad/agranularidad</li> <li>– Hiposegmentación nuclear (pseudo Pelger-Hüet)</li> <li>– Hipersegmentación nuclear</li> <li>– Tamaño pequeño o anormalmente grande</li> <li>– Gránulos tipo pseudo-Chédiak-Higashi</li> <li>– Cuerpos de Döhle</li> <li>– Bastones de Auer</li> </ul>
Dismegacariopoyesis	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Micromegacariocitos</li> <li>– Hipolobulación del núcleo</li> <li>– Multinuclearidad</li> </ul>

Abreviaturas: SMD: síndrome mielodisplásico; OMS: Organización Mundial de la Salud; PAS: ácido peryódico de Schiff.

Un último punto que considerar dentro del diagnóstico citomorfológico de las LMA-CRM es que, al estar basado en la observación de displasia, es dependiente de la persistencia de hematopoyesis residual en la médula ósea en el momento del diagnóstico, existiendo un porcentaje considerable de casos de LMA (17% a 21,5%) (67,84) en los que no hay suficiente celularidad para una correcta evaluación de la displasia. En estos casos, el diagnóstico de LMA-CRM solo podría realizarse sobre la base de la detección

de una anomalía citogenética relacionada con SMD o del antecedente clínico de SMD o SMD/NMP. El número mínimo de elementos de cada serie (eritroide, granulocítica y megacariocítica) que es necesario revisar para considerar una línea evaluable para displasia no está claramente definido por la OMS. Diferentes publicaciones centradas en LMA-CRM establecen en su metodología de evaluación de la displasia unos rangos que pueden servir de referencia y que están en torno a un mínimo de 20 a 25 elementos de la serie eritroide, 20 a 25 elementos de la serie granulocítica, y de 6 a 10 megacariocitos (62,67,84); si bien, idealmente, se recomienda valorar un número mayor de células. En el caso de los SMD la recomendación de la OMS es evaluar 200 precursores eritroides, 200 neutrófilos y sus precursores y al menos 30 megacariocitos (78).

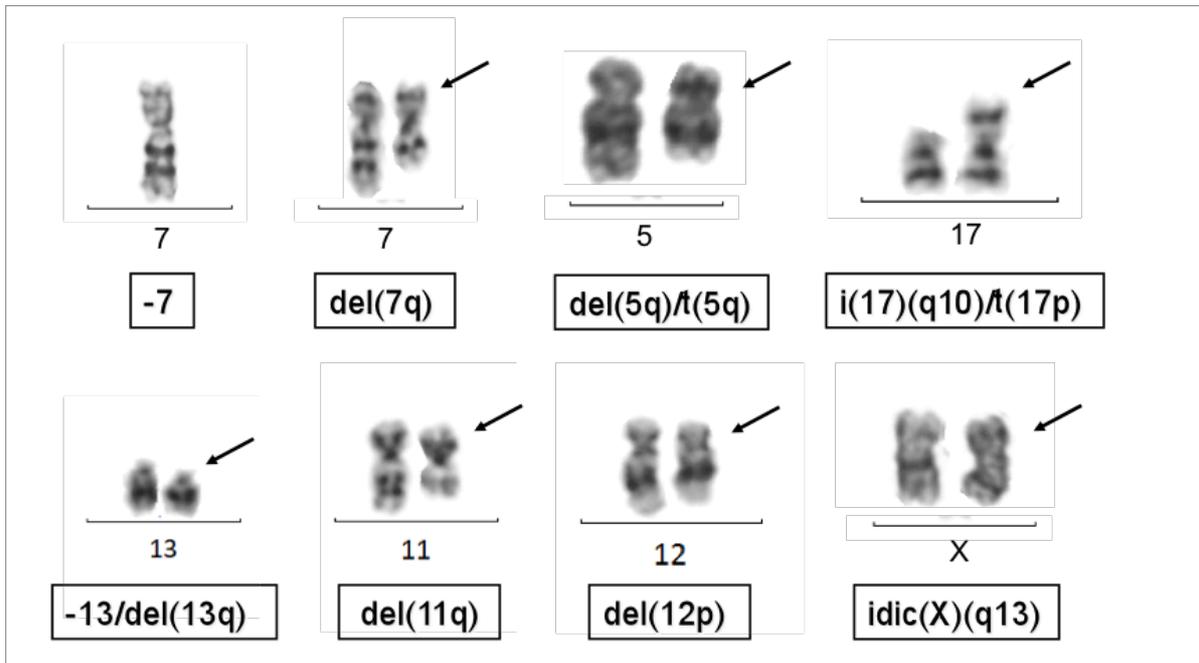
## 2.6. Citogenética

Las LMA-CRM presentan una gran variedad de anomalías citogenéticas subyacentes. Muchas de ellas son comunes a las encontradas en los SMD y a menudo involucran ganancias o pérdidas de segmentos de ciertos cromosomas o de cromosomas completos. Las anomalías detectadas con más frecuencia son el cariotipo complejo, la monosomía del cromosoma 7 o la del(7q) y la del(5q) (48,62,63,73,74,85).

Las alteraciones citogenéticas que se consideran diagnósticas de esta categoría según la OMS de 2017 (en el contexto de una blastosis  $\geq 20\%$  en sangre periférica y/o médula ósea y habiendo excluido LMA-t y LMA con anomalías citogenéticas recurrentes, salvo las definidas por mutaciones) se pueden reunir en tres grupos: el cariotipo complejo, las alteraciones en desequilibrio y las alteraciones equilibradas (Tabla 6) (48).

A) **El cariotipo complejo**, definido como la presencia de tres o más anomalías cromosómicas, es la alteración citogenética más frecuente en LMA-CRM (62,63,73). Dentro de este, predominan las alteraciones en desequilibrio, normalmente con pérdidas de segmentos cromosómicos, siendo las más habituales la del(5q), del(7q) y del(17p). Estas tres anomalías muchas veces aparecen combinadas, en lo que se ha definido como cariotipo complejo típico, que se asocia con frecuencia a mutaciones de *TP53* (Figura 9) (86).

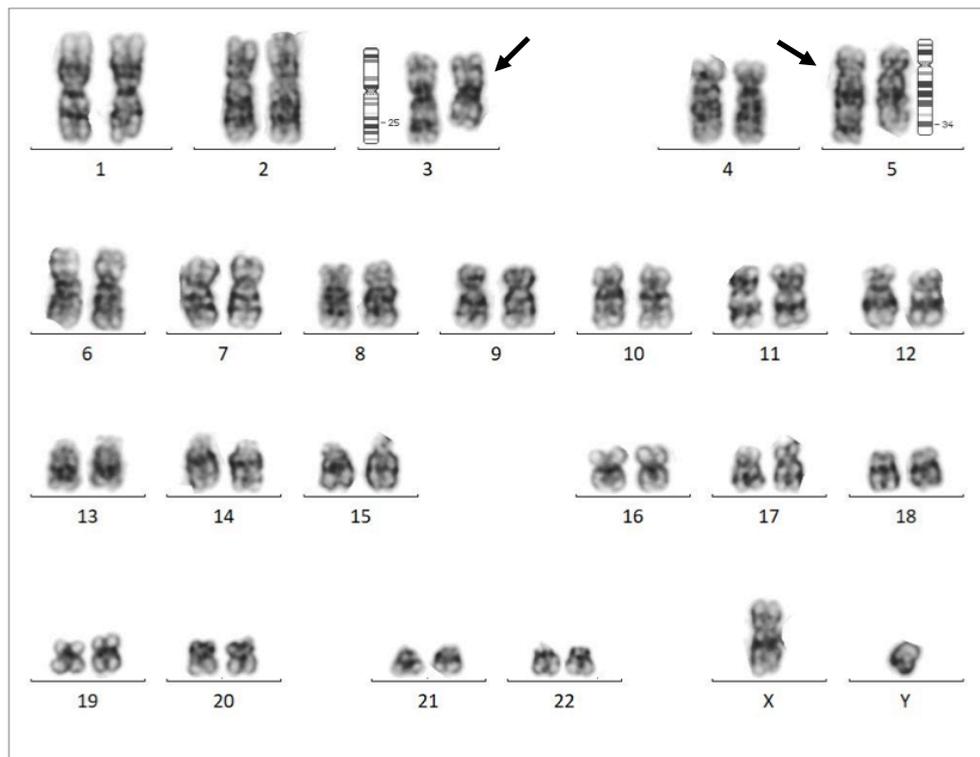




**Figura 10.** Anomalías en desequilibrio en LMA-CRM.

C) **Las translocaciones equilibradas** son alteraciones mucho menos frecuentes en LMA-CRM y son sumamente excepcionales. Cuando ocurren afectan con frecuencia a 5q32-33.

En la clasificación de la OMS de 2017 se consideran diagnósticas de LMA-CRM las siguientes (48):  $t(11;16)(q23.3;p13.3)$ ,  $t(3;21)(q26.2;q22.1)$ ,  $t(1;3)(p36.3;q21.2)$ ,  $t(2;11)(p21;q23.3)$ ,  $t(5;12)(q32;p13.2)$ ,  $t(5;7)(q32;q11.2)$ ,  $t(5;17)(q32;p13.2)$ ,  $t(5;10)(q32;q21)$  y  $t(3;5)(q25.3;q35.1)$  (Figura 11). Destaca que dos de ellas, la  $t(2;11)(p21;q23.3)$  y la  $t(11;16)(q23.3;p13.3)$ , implican reordenamientos de *KMT2A* (previamente gen *MLL*); sin embargo, según esta clasificación los casos con este reordenamiento específico de 11q23.3, que no hayan recibido quimioterapia y/o radioterapia previas, se clasifican dentro de la categoría de LMA-CRM y no dentro de las LMA con anomalías citogenéticas recurrentes. Otro dato destacable es que las translocaciones que afectan a 5q32 implican reordenamientos de *PDGFRB* (receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas).



**Figura 11.** Translocación equilibrada en LMA-CRM. Cariotipo: 46,XY,t(3;5)(q25;q34)[20].

## 2.7. Caracterización molecular

Las LMA-CRM se caracterizan por un patrón de anomalías moleculares que se diferencia del observado en otros subtipos de LMA. Las mutaciones que aparecen con mayor frecuencia afectan a *TP53*, hasta en un 39% de los casos y a *ASXL1*, hasta en un 35% (85,87-90). En la Tabla 9 se enumeran las mutaciones más prevalentes en LMA-CRM (incluidas aquellas con frecuencia  $\geq 6\%$ ).

De estas mutaciones, las que han mostrado una frecuencia significativamente superior en LMA-CRM frente a otros subtipos de LMA son las mutaciones en *ASXL1*, *TP53*, *SETBP1*, *SRSF2* y *U2AF1*. Por el contrario, se describe una tasa inferior de mutaciones en *FLT3*, *KIT*, *WT1*, *DNMT3A*, *NPM1* y *CEBPA* (87,89,91). En el caso de *NRAS* y *PTPN11* se han reportado resultados variables según los estudios (89,91). Las mutaciones de *NPM1* y la mutación bialélica de *CEBPA* son excepcionales en LMA-CRM, probablemente debido a la rareza de que aparezcan asociadas a anomalías citogenéticas

relacionadas con SMD (circunstancia en la que estos casos quedarían clasificados como LMA-CRM).

**Tabla 9.** Mutaciones descritas en LMA-CRM con frecuencia  $\geq 6\%$  (85,87-91)

<b>Mutación</b>	<b>Frecuencia (%)</b>	<b>Categoría funcional</b>
<i>TP53*</i>	16,7-39	Reparación del daño celular
<i>ASXL1*</i>	18,1-35	Regulador epigenético
<i>IDH2</i>	11-21	Regulador epigenético
<i>NRAS</i>	17-17,9	Transducción de señales
<i>U2AF1*</i>	8,3-17,9	Factor de <i>splicing</i>
<i>RUNX1</i>	11-17	Factor de transcripción
<i>TET2</i>	6-15	Regulador epigenético
<i>PTPN11</i>	11,9	Transducción de señales
<i>SRSF2*</i>	11,9-15,3	Factor de <i>splicing</i>
<i>IDH1</i>	4,1-11	Regulador epigenético
<i>DNMT3A</i>	8-10	Regulador epigenético
<i>STAG2</i>	7	Cohesina
<i>FLT3</i>	7	Transducción de señales
<i>KRAS</i>	6,9	Transducción de señales
<i>NF1</i>	6-6,9	Transducción de señales
<i>SETBP1*</i>	6	Factor de transcripción
<i>ETV6</i>	6	Factor de transcripción

\*Mutaciones con frecuencia significativamente superior en LMA-CRM. Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia.

Por otra parte, se ha descrito una mayor proporción de casos con mutación de *TP53* entre las LMA-CRM *de novo*, mientras que en las LMA-CRM secundarias a SMD se observa una frecuencia superior de mutaciones en *SETBP1*, *RUNX1* y *SRSF2* (85,92). Otros

estudios, sin embargo, no han encontrado diferencias en el perfil de mutaciones entre los casos de LMA-CRM *de novo* y los secundarios a SMD o SMD/NMP (87,88).

Las diferencias observadas en el perfil mutacional de los pacientes con LMA-CRM hace que se hayan tratado de identificar mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) genes “predictores” que permitan identificar aquellos casos de LMA *de novo* que puedan presentar características biológicas y pronósticas similares a las de las LMA-CRM, incluso en ausencia de los criterios diagnósticos clásicos de esta categoría. En este sentido, Gao y colaboradores (89) proponen como posibles factores predictores de LMA-CRM la aparición de mutaciones en *ASXL1*, *TP53*, *U2AF1*, *SRSF2* y *SETBP1*. Otro ejemplo es el desarrollo por Baer y colaboradores (90) de un modelo de predicción automático que, valiéndose de la información molecular, los datos citogenéticos y la historia del paciente, es capaz de identificar correctamente, sin valorar la morfología, del 96 al 99% de casos previamente catalogados como LMA-CRM según criterios OMS. Mediante la aplicación de este modelo identifican además más de un 10% de casos de LMA que presentan lo que identifican como patrón molecular “tipo LMA-CRM” y, que a pesar de no haber sido clasificados como LMA-CRM por criterios clásicos, comparten con estas un pronóstico desfavorable, sugiriendo el empleo de estrategias de tratamiento similares para los pacientes con este perfil molecular (90). Relevante es también el estudio de Lindsley y colaboradores (93) en el que se estudia una cohorte de casos con LMA-CRM secundarias a SMD o SMD/NMP, encontrando un conjunto de mutaciones (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2*) que son altamente específicas de LMA secundarias. El estudio de estas mutaciones en LMA *de novo* y LMA-t identifica a pacientes con un perfil biológico similar al de las LMA secundarias a SMD, por lo que proponen la caracterización genética y molecular como sistema de clasificación más preciso de las LMA.

En relación con el pronóstico hay dos mutaciones que, dentro de las LMA-CRM, consiguen identificar de manera independiente dos subgrupos de pacientes con un pronóstico especialmente adverso, son las mutaciones en *ASXL1* y *TP53* (88). Mientras que la mutación de *TP53* se encuentra principalmente en pacientes con cariotipo

complejo, y que, por tanto, están en la categoría de riesgo citogenético adverso, la mutación de *ASXL1* es más frecuente en pacientes en el grupo de citogenética de riesgo intermedio (87,88). La mutación de *ASXL1* en LMA-CRM se ha asociado además con la ausencia de anomalías citogenéticas relacionadas con SMD, con la presencia de mielodisplasia y con una mayor frecuencia de disgranulopoyesis en la médula ósea (88). Tiende a asociarse con mutaciones en otros genes como *SETBP1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *STAG2*, *CSFR3* y *ETV6*; sin embargo, es mutuamente excluyente con las mutaciones de *FLT3-ITD*, *NPM1* y *WT1* (89).

## 2.8. Valor pronóstico de la categoría

El diagnóstico de LMA-CRM se ha asociado globalmente a un mal pronóstico, con una tasa de remisiones completas y una supervivencia global inferiores a las de otros subtipos de LMA (56,58,61,63,87,94). Esto ha sido corroborado en diferentes estudios: Weinberg y colaboradores en una cohorte de 100 pacientes con LMA describieron una mediana de supervivencia global y supervivencia libre de progresión significativamente más cortas en los pacientes con LMA-CRM frente a LMA-NE (61); Devillier y colaboradores en una revisión de 85 casos, obtuvieron una tasa de remisiones completas tras tratamiento intensivo significativamente inferior en el grupo de LMA-CRM respecto a otras LMA (48% vs 78%,  $p=0,023$ ) (87); y Xu y colaboradores reportaron en un estudio amplio con 449 pacientes con LMA una mediana de supervivencia global significativamente más corta en LMA-CRM en comparación con LMA-NE (10 meses frente a 16), así como una menor supervivencia libre de enfermedad (5 meses frente a 12) y menor tasa de remisiones completas (60,9% frente a 77,5%) (63).

Sin embargo, los resultados son más dispares a la hora de determinar cuáles son los factores que se asocian a un peor pronóstico en los pacientes con LMA-CRM. En particular, se ha demostrado que la citogenética tiene un papel esencial, y que los casos con alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD, y especialmente los de cariotipo adverso, muestran una supervivencia significativamente inferior comparados con aquellos casos con cariotipo normal o ausencia de anomalías relacionadas con SMD (62,63,76,85,94). El impacto negativo del antecedente de SMD o SMD/NMP en el

pronóstico de los pacientes con LMA-CRM también se ha establecido en diferentes estudios (62,63,94). Otros factores que se han asociado a un pronóstico desfavorable en LMA-CRM han sido la edad (63,85) y la presencia de determinadas mutaciones como *ASXL1* (88) o *TP53* (85,88). Sin embargo, especialmente discutido ha sido el valor predictivo de la displasia multilínea y si esta característica identifica de forma independiente a pacientes con un pronóstico adverso, comparable al del resto de los pacientes con LMA-CRM diagnosticados por criterios citogenéticos o por el antecedente de SMD o SMD/NMP. Los resultados de los estudios que han abordado esta cuestión se detallan a continuación:

- Arber y colaboradores -2003- (56), en un estudio con 300 pacientes que incluía 106 casos de LMA con displasia multilínea, observaron una supervivencia global significativamente inferior de los casos con displasia frente al resto de LMA y, específicamente, frente a LMA-NE; respaldando la importancia pronóstica de la displasia multilínea y por tanto la validez de la categoría definida por la OMS.
- Haferlach y colaboradores -2003- (57), en un análisis de 614 pacientes con LMA entre los que se incluían 152 casos de LMA con displasia multilínea, concluyeron que la presencia o ausencia de displasia no tenía impacto en la tasa de remisión, la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global de los pacientes; aunque sí demostraron correlación entre la displasia trilínea y un cariotipo desfavorable.
- Yanada y colaboradores -2005- (58), en un estudio con 109 casos de LMA, y Want y colaboradores -2008- (59), con 1766, tampoco lograron demostrar un impacto pronóstico independiente de la displasia multilínea, aunque en este último estudio se observó de nuevo asociación de la displasia a una citogenética desfavorable.
- Weinberg y colaboradores -2009- (61), en una revisión de 100 pacientes con LMA que incluía 48 casos de LMA-CRM encontraron que, aunque los casos con displasia multilínea en ausencia de alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD tenían un pronóstico mejor que el de los casos con alteraciones citogenéticas, este era aún peor que el de las LMA-NE, apoyando este dato el valor pronóstico de la mielodisplasia.
- Miessner y colaboradores -2010- (62), en un estudio con 408 casos de LMA-CRM y LMA-NE, no encontraron diferencias en la supervivencia de los pacientes con

- LMA-CRM diagnosticada solo por la presencia de displasia y las LMA-NE. En este estudio, la citogenética y el antecedente de SMD si demostraron ser pronósticamente relevantes.
- Xu y colaboradores -2014- (63) publicaron resultados muy similares a los de Miessner. Tras analizar 449 casos de LMA, el pronóstico global de las LMA-CRM resultó ser significativamente inferior que el de las LMA-NE, pero con respecto a los criterios de diagnóstico, solo la citogenética y el antecedente de SMD o SMD/NMP demostraron ser factores pronósticos independientes, frente a la ausencia de valor de la displasia multilínea.
  - Rozman y colaboradores -2014- (67), en un grupo seleccionado de 177 pacientes con LMA con citogenética de riesgo intermedio y sin mutación de *NPM1*, demostraron que la presencia de mielodisplasia se asociaba a una menor probabilidad de remisión completa.
  - Fang y colaboradores -2020- (94) realizaron una revisión de 186 casos de LMA-CRM en la que obtuvieron que el pronóstico de los casos con anomalías citogenéticas relacionadas con SMD (especialmente cariotipo complejo) y con antecedente de SMD o SMD/NMP era significativamente inferior al de los casos diagnosticados solo por mielodisplasia; sin embargo, a pesar de los mejores resultados de este subgrupo, estos aún eran inferiores a los reportados para LMA-NE, apoyando este dato el pronóstico adverso de la categoría tal y como quedaba definida en la OMS 2017.
  - Jiang y colaboradores -2020- (76) compararon 179 LMA-CRM y 105 LMA-NE con cariotipo normal, concluyendo que los pacientes con LMA-CRM diagnosticados solo por la presencia de displasia multilínea tenían un pronóstico mejor que el resto de LMA-CRM y comparable al del grupo de LMA-NE.
  - Montalban-Bravo y colaboradores -2020- (85) evaluaron el pronóstico de 415 pacientes con LMA-CRM en función del criterio de diagnóstico, obteniendo que los pacientes con displasia multilínea y aquellos con antecedente de SMD no tratado tenían mejor supervivencia global que los casos con anomalías citogenéticas relacionadas con SMD o con antecedente de SMD tratado. Al comparar las LMA-CRM con un grupo control de 468 LMA, concluyeron que el grupo de diagnóstico morfológico tenía un pronóstico equiparable al de los pacientes con LMA de riesgo intermedio según la ELN.

En otro sentido, y teniendo en cuenta los resultados contradictorios en cuanto al significado de la displasia en LMA, también se ha planteado si la definición de displasia multilínea establecida por la OMS es la óptima para diferenciar casos con significado clínico o, si la consideración de solo ciertos rasgos específicos de displasia podría tener una mejor correlación con el pronóstico. Por ejemplo, en el trabajo de Rozman y colaboradores -2014-, se utiliza una definición más amplia de displasia multilínea (displasia en  $\geq 50\%$  de los elementos de una línea celular y  $\geq 30\%$  de las células de alguna de las otras líneas) que mantiene significado pronóstico (67). En el trabajo de Weinberg y colaboradores -2015- (84) se analiza de manera individual el valor de rasgos específicos de displasia en un grupo de LMA-CRM sin alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD, encontrando que solo la presencia de micromegacariocitos y de neutrófilos hipogranulares se asocia con una menor supervivencia libre de enfermedad. Concretamente el valor pronóstico de la displasia megacariocítica en LMA, específicamente de la presencia de micromegacariocitos (95,96) y también de megacariocitos hipobulados (88) ha sido refrendada en estudios posteriores.

## **2.9. Tratamiento**

La elección del tratamiento para los pacientes con LMA-CRM va a depender de diferentes factores como la edad, el estado funcional o la presencia de alteraciones citogenéticas de riesgo adverso entre otros.

Entre las diferentes opciones de tratamiento se encuentran:

- Quimioterapia convencional: los regímenes de quimioterapia tipo “3+7”, que combinan la administración de siete días de ARA-C con tres días de antraciclinas son el estándar de tratamiento intensivo para la inducción a la remisión en pacientes con LMA, incluidas las LMA-CRM. Sin embargo, en estas últimas, los datos de remisión completa y de supervivencia global con este régimen son inferiores a los de otros subtipos de LMA (25,63,97). En un estudio de 115 pacientes con LMA-CRM tratados con quimioterapia se obtuvieron tasas de remisión completa del 60,9% en LMA-CRM frente al 77,5% en LMA-NE, con una mediana de supervivencia global de 10 meses y de 16 meses respectivamente, siendo ambas diferencias significativas (63). Cuando se ha comparado el resultado de la quimioterapia intensiva según los diferentes

criterios diagnósticos de LMA-CRM se obtiene que el grupo que más se beneficia de este tratamiento es el de los pacientes diagnosticados por la presencia de displasia multilínea, que tienen una supervivencia global significativamente mejor que el resto de los pacientes (85).

- CPX-351: es el único fármaco aprobado específicamente para pacientes con LMA-CRM, y el primero en demostrar un impacto favorable en términos de supervivencia frente a la quimioterapia convencional (97). Se trata de una formulación liposomal de citarabina y daunorrubicina con una relación molar 1:5, que maximiza su actividad sinérgica antitumoral, con una semivida plasmática prolongada tras la administración intravenosa. Estudios preclínicos demuestran que estos liposomas persisten en altas concentraciones en la médula ósea, donde tienen una captación preferencial por las células leucémicas en comparación con las células hematopoyéticas normales. Una vez internalizados, los liposomas se degradan y liberan los fármacos en el medio intracelular (98,99). Todas estas características contribuyen a aumentar la actividad antileucémica de este fármaco, que fue autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) el 27 de agosto de 2018 para el tratamiento de pacientes adultos con nuevo diagnóstico de LMA-CRM y LMA-t. Su aprobación estuvo basada en los resultados de un ensayo clínico fase III, abierto, multicéntrico y aleatorizado que comparaba CPX-351 con daunorrubicina y citarabina convencionales (esquema “3+7”) en pacientes de edad entre 60 y 75 años con LMA de alto riesgo de nuevo diagnóstico, que no hubieran recibido tratamiento previo. La definición de alto riesgo incluía LMA-CRM y LMA-t, aunque hay que matizar que los casos con LMA-CRM correspondían solo a pacientes con alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD o con antecedente de SMD o SMD/NMP. El ensayo incluyó 309 pacientes, 153 en la rama de CPX-351 y 156 en la de quimioterapia convencional. Tras una mediana de seguimiento de 20,7 meses, CPX-351 demostró mejorar la supervivencia global en 3,6 meses frente al esquema 3+7 (mediana de 9,56 frente a 5,95 meses; HR: 0,69; IC 95% 0,52-0,9; p=0,003). Las respuestas globales también fueron mejores en la rama de CPX-351 (respuestas completas + respuestas completas con recuperación hematológica incompleta del 47,7% frente al 33,3%; p=0,016). El beneficio se observó tanto en LMA-CRM como en LMA-t (97,100). Solo los casos con LMA secundaria a SMD que habían recibido previamente tratamiento con agentes hipometilantes no mostraron beneficio en la supervivencia global. El número de

pacientes que recibió un trasplante alogénico fue superior en la rama de CPX-351 (34% frente a 25% en la rama de quimioterapia tipo 3+7;  $p=0,098$ ). Con respecto a los efectos adversos fueron muy similares en ambas ramas, salvo la recuperación hematológica de neutrófilos y plaquetas que fue más larga entre los pacientes que recibieron CPX-351. Datos a más largo plazo y estudios posteriores con pacientes en vida real confirman la eficacia y seguridad de CPX-351 en este grupo de pacientes (101-103).

- Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: es la única opción potencialmente curativa. Dos estudios, con 139 (incluyendo 60 LMA-CRM) y 138 (incluyendo 50 LMA-CRM) pacientes con LMA, respectivamente, han demostrado una supervivencia global, mortalidad no relacionada con la recaída e incidencia acumulada de recaída similares entre los pacientes trasplantados con LMA-CRM y LMA-NE (104,105).
- Terapias dirigidas: en algunos casos los pacientes con LMA-CRM pueden ser candidatos a tratamiento con:
  - o Gemtuzumab ozogamicina: se trata de un conjugado compuesto por un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD33 unido covalentemente al citotóxico N-acetil-gamma-calicheamicina. Fue autorizado por la EMA en el 2018 para el tratamiento combinado con daunorrubicina y citarabina de pacientes a partir de los 15 años con LMA CD33+ *de novo* (excepto la leucemia promielocítica) que no hubieran recibido tratamiento previo. Su aprobación estuvo basada en un estudio fase III, multicéntrico, aleatorizado y abierto en el que esta combinación demostró un incremento de supervivencia libre de enfermedad frente a la quimioterapia sola (106). Sin embargo, en este ensayo se excluyeron pacientes con antecedente de SMD o SMD/NMP y en el análisis por subgrupos, el uso de gemtuzumab ozogamicina no mejoró la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con citogenética de riesgo adverso. Hasta el momento no hay información específica sobre la eficacia o seguridad de este fármaco en pacientes con LMA-CRM.
  - o Midostaurin y gilteritinib: son inhibidores de *FLT3*. Midostaurin está aprobado para pacientes adultos con LMA de nuevo diagnóstico con mutación

*FLT3* en combinación con la quimioterapia estándar de inducción (daunorrubicina y citarabina) y de consolidación (altas dosis de citarabina) seguido de un tratamiento de mantenimiento en monoterapia en pacientes que hayan alcanzado respuesta completa. Gilteritinib está indicado en monoterapia para el tratamiento de pacientes adultos con LMA recidivante o refractaria con mutación *FLT3*. Aunque no se han ensayado específicamente en pacientes con LMA-CRM, globalmente ambos fármacos han mostrado resultados prometedores en LMA y pueden ser adecuados en pacientes con mutación de *FLT3* (107,108).

- Otras terapias dirigidas: ivosidenib y enasidenib son fármacos inhibidores de *IDH1* e *IDH2*, respectivamente. Están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EE. UU., pero no por la EMA, para el tratamiento de adultos con LMA en recaída o refractaria con mutaciones susceptibles de *IDH1* e *IDH2*. No se han ensayado específicamente en LMA-CRM.
- Tratamientos de baja intensidad: los pacientes que no son candidatos a quimioterapia intensiva pueden beneficiarse de agentes hipometilantes (azacitidina o decitabina), solos o en combinación con venetoclax (inhibidor potente y selectivo de la proteína antiapoptótica BCL-2); o de dosis bajas de citarabina. La azacitidina es el tratamiento más empleado en pacientes con LMA-CRM no candidatos a terapia intensiva. En este grupo de pacientes ha demostrado mejorar la mediana de supervivencia global frente a otros regímenes de tratamiento convencionales, principalmente dosis bajas de citarabina (8,9 meses frente a 4,9; HR: 0,74; 95% IC, 0,57-0,97), con mejor tasa también de respuestas globales (109). En el caso de la decitabina no se han realizado análisis específicamente en pacientes con LMA-CRM. Venetoclax está indicado en el tratamiento de pacientes adultos con LMA de nuevo diagnóstico que no son candidatos a recibir quimioterapia intensiva en combinación con un agente hipometilante. Aunque no hay estudios específicos en LMA-CRM, es una opción de tratamiento a considerar por su alta tasa de respuestas y facilidad de administración (110).

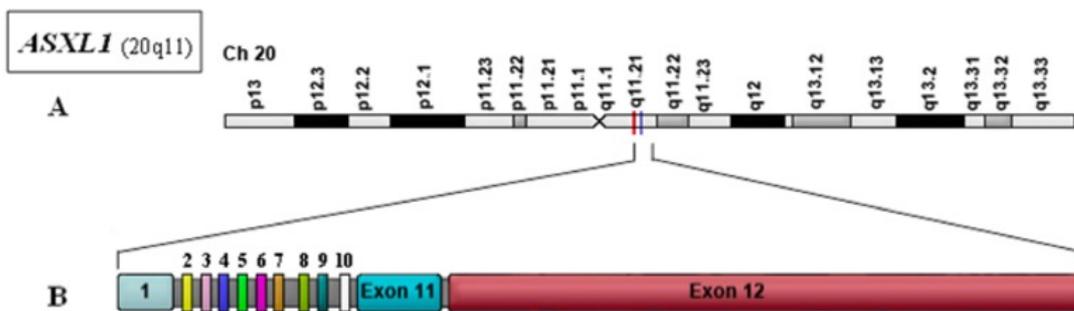
Con respecto a la elección del tratamiento, cuando la intención es curativa, las estrategias se centran en utilizar quimioterapia de inducción intensiva seguida de TPH alogénico. El uso de esquemas capaces de inducir la remisión previa al trasplante es fundamental para asegurar una mejor respuesta. CPX-351 es el primer fármaco que ha demostrado mejorar las respuestas globales en los pacientes con LMA-CRM, consiguiendo que un mayor número de pacientes lleguen al TPH en comparación con los regímenes de quimioterapia convencional y una supervivencia mayor después del trasplante alogénico (97,101). Sin embargo, no hay comparaciones con otras estrategias como el uso de agentes hipometilantes en combinación con venetoclax, y tampoco se ha ensayado su uso en combinación con terapias dirigidas. Para pacientes no candidatos a terapia intensiva, la azacitidina sigue siendo el fármaco más empleado.

En la actualidad hay diferentes ensayos clínicos en marcha en un esfuerzo por mejorar los resultados en este grupo de pacientes. Se está ensayando el uso de CPX-351 en pacientes menores de 60 años con LMA-CRM (NCT04269213) (111). También hay un estudio fase II de CPX-351 en combinación con glasdegib en pacientes con LMA-CRM o LMA-t a partir de 75 años o no aptos para quimioterapia intensiva (NCT04231851) (112). Existe un ensayo fase III que compara el uso de azacitidina en combinación con mepesuccinato de omacetaxina, frente a azacitidina sola para pacientes con SMD de riesgo intermedio, SMD de riesgo alto y LMA-CRM (NCT03978364) (113). Pevonedistat, una molécula pequeña inhibidora de la enzima activadora de la NEDD8 (EAN) que puede inhibir la proliferación y supervivencia celular, se está investigando en combinación con quimioterapia tipo 3+7 en un ensayo fase Ib/II en pacientes con LMA-CRM y LMA-t (NCT03330821) (114).

### 3. LAS MUTACIONES EN *ASXL1* EN LAS NEOPLASIAS MIELOIDES

#### 3.1. El gen *ASXL1*

El gen *ASXL1* (por sus siglas en inglés, *additional sex combs like 1*) es uno de los genes mutados con mayor frecuencia en las neoplasias mieloides. Se sitúa en la banda cromosómica 20q11.21 y forma parte de una familia de tres genes: *ASXL1*, *ASXL2* y *ASXL3*, que son homólogos del gen *ASX* (*additional sex combs*) de la mosca *Drosophila* (115-118). Fue caracterizado en el año 2003 por Fisher y colaboradores (115). El gen *ASXL1* se expresa ampliamente en los tejidos de los mamíferos, incluida la médula ósea, donde su expresión es baja (115). En la Figura 12 se representa el gen *ASXL1* constituido por 12 exones (NM\_001363734).



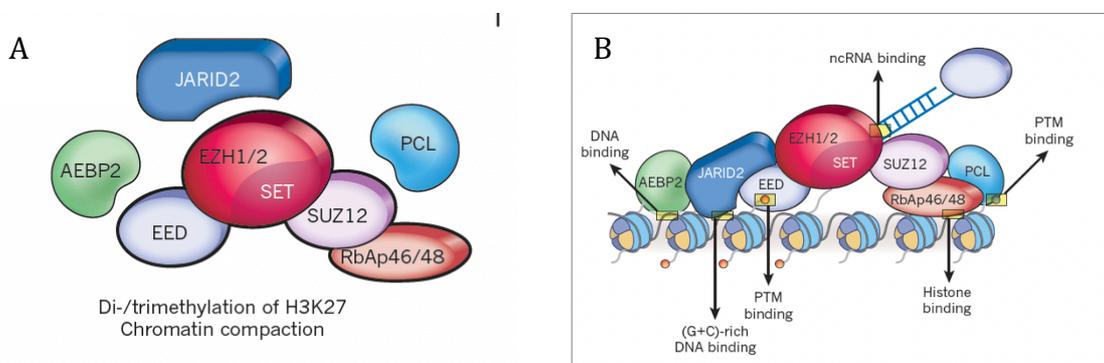
**Figura 12.** Representación del gen *ASXL1* en el locus 20q11. A) Localización del gen *ASXL1* en el cromosoma 20. B) Exones del 1 al 12 del gen *ASXL1*. Modificado de Mozziconacci, MJ; Birnbaum, D. *ASXL1* (additional sex combs like 1 (*Drosophila*) Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2011;15(5):391-394 (119).

El gen *ASXL1* está categorizado como miembro del grupo de genes “*Enhancer of trithorax and Polycomb*” que codifican proteínas de los grupos polycomb y trithorax, que son reguladores epigenéticos (120,121). Las proteínas polycomb son necesarias para silenciar sus genes diana, mientras que las proteínas trithorax mantienen la activación transcripcional (120,121). *ASXL1*, por tanto, puede aumentar o reprimir la transcripción de genes en áreas localizadas a través de la modificación de la estructura de la cromatina. La proteína *ASXL1* consta de un dominio amino terminal homólogo a *ASX* (ASX-H, *ASX*

*homology domain*) y un homeodominio carboxi-terminal (PHD C-terminal, *C-terminal plant homeodomain*) (115).

### 3.2. La mutación de *ASXL1* en las neoplasias mieloides

La gran mayoría de las mutaciones de *ASXL1* encontradas en las neoplasias mieloides afectan al exón 12 del gen (122,123). Estas mutaciones son heterocigotas en prácticamente todos los casos. Se trata principalmente de mutaciones sin sentido (*nonsense*) y de mutaciones de cambio en el marco de lectura (*frameshift*), que dan lugar a una proteína truncada con pérdida del homeodominio carboxi-terminal (PHD C-terminal) (122), resultando en una haploinsuficiencia o un efecto dominante negativo. La mutación de *ASXL1* conduce a través del complejo represivo Polycomb 2 (PRC2, por sus siglas en inglés *Polycomb Repressive Complex 2*) a una pérdida de la trimetilación de la lisina 27 en la proteína histona H3 (H3K27me3). PRC2 es un regulador epigenético que actúa a través de su actividad modificadora de histonas mediante la adición de marcas represivas H3K27me3 (Figura 13) (124).



**Figura 13.** El complejo Polycomb PRC2. A) Diagrama que representa el complejo Polycomb PRC2. B) Representación esquemática de las interacciones de PCR2 con la cromatina. Interacciones con el DNA o las histonas. Tomado de Margueron R, Reinberg D. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):343-9 (124).

Por tanto, la inhibición de *ASXL1* conduce a la pérdida de reclutamiento de PRC2 y así a la pérdida de marcas represivas en histonas de loci leucemogénicos, como el

agrupamiento *HOXA* (*homeobox A*), lo que conduce a una expresión más alta de los genes *HOXA* 5-9. Estos y otros datos sugieren un papel de la pérdida de *ASXLI* en la leucemogénesis mieloide, probablemente en combinación con alteraciones en otros oncogenes (125).

Aunque el papel exacto de *ASXLI* en la hematopoyesis normal y el mecanismo por el que la mutación en *ASXLI* contribuye al desarrollo de neoplasias hematológicas no se han dilucidado completamente, los datos sugieren que funciona como un gen supresor de tumores implicado en la homeostasis de las células hematopoyéticas y en la autorrenovación o diferenciación de las células progenitoras mieloides normales (123,127,128). En este sentido, modelos animales han mostrado que pérdidas o mutaciones de *ASXLI* conducen al desarrollo de mielodisplasia o a una enfermedad similar a un SMD en ratones (126-128), o que ratones con la mutación de stop en *ASXLI* Y588X desarrollan neoplasias mieloides (129). También en un estudio se analizó el efecto de la expresión de la mutación *NRAS G12D* junto a la pérdida de *ASXLI* *in vivo* mediante el trasplante de estas células a ratones irradiados, resultando en una mieloproliferación acelerada y una supervivencia más corta en los ratones con la pérdida adicional de *ASXLI* frente a los ratones que si lo expresaban (125).

Las mutaciones en el gen *ASXLI* se reportaron por primera vez en el año 2009 en los SMD, donde después de una búsqueda de genes candidatos mediante análisis de arrays de hibridación genómica comparada (aCGH, por sus siglas en inglés *Comparative Genomic Hybridization*) se encontraron mutaciones de pérdida de función en el gen *ASXLI* involucradas en esta enfermedad (123). Además de en los SMD, se han descrito mutaciones en *ASXLI* en neoplasias mieloproliferativas (NMP), en SMD/NMP y en LMA. Los porcentajes descritos son variables según las series: 11-20,7% en SMD (123,130-133), 20-47,2% en leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) (123,131,134-137), 16-36% en mielofibrosis primaria (134,138,139), 7% en policitemia vera (138) y 4% en trombocitemia esencial (138). En SMD y LMMC la mutación en *ASXLI* se ha asociado con un menor tiempo hasta la transformación a LMA (133,135). Además, las mutaciones en este gen han sido relacionadas con un peor pronóstico en SMD (133), LMMC (135), NMP (138) y mielofibrosis primaria (140). La frecuencia de la mutación

de *ASXL1* en LMA y las características asociadas a la misma se desarrollan en el siguiente apartado (3.3).

La mutación más prevalente en las neoplasias mieloides, que representa más del 50% de todas las mutaciones en *ASXL1*, es una duplicación de una guanina (c.1934dupG) que conduce a un cambio de marco de lectura (p.Gly646TrpfsX12) y, que después de algún desacuerdo, actualmente se considera una verdadera mutación patogénica (122,133,141).

### **3.3. Características asociadas a la presencia de mutación de *ASXL1* en LMA**

De manera global el porcentaje de casos con mutación en *ASXL1* descrito en LMA varía entre el 5,3 y el 25% según las series (131,141-145). Entre las características clínicas que se han asociado de manera significativa a la presencia de esta mutación se encuentran: edad avanzada, sexo masculino, leucocitosis y menor porcentaje de blastos en sangre periférica y en médula ósea (142,144,145). Con respecto al tipo de LMA, se ha descrito mayor frecuencia de mutación de *ASXL1* en LMA secundarias (144,145) y en LMA-CRM (146). En relación con la citogenética, la mutación en *ASXL1* se ha asociado con trisomía 8, alteraciones en el cromosoma 11 [+11, del(11q), t(11), add(11p)] y cariotipo normal; siendo inversa su asociación con el cariotipo complejo, con las anomalías citogenéticas relacionadas con SMD [-5/del(5q) y 7-/del(7q)], y con la t(15;17) (131,142,144). Entre las alteraciones moleculares, *ASXL1* se presenta con más frecuencia junto a mutaciones en *RUNX1*, mientras que se describe una menor incidencia de mutaciones en *NPM1*, *WT1*, *FLT3 ITD* y *DNMT3A* respecto a las LMA *ASXL1* negativas (141-143,145). Por último, la detección de mutaciones en *ASXL1* se ha asociado a un impacto pronóstico adverso independiente en LMA (141,147-150).

### **3.4. Características asociadas a la presencia de mutación de *ASXL1* en LMA-CRM**

Dentro del grupo de LMA-CRM se ha descrito una incidencia elevada de mutaciones en *ASXL1*, que alcanza el 35% de los casos (87). La presencia de mutación de *ASXL1* en LMA-CRM se ha asociado a mielodisplasia, a una mayor proporción de disgranulopoyesis en la médula ósea, al grupo de riesgo citogenético intermedio y a la ausencia de alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD (87,88). Además, dentro de

las LMA-CRM, la mutación en *ASXL1* identifica a un subgrupo de pacientes de pronóstico especialmente adverso, describiéndose una tasa de respuestas completas del 40% en casos con mutación en *ASXL1* frente al 69% en pacientes sin mutación ( $p=0,039$ ); y una supervivencia global a los dos años dentro del grupo con citogenética de riesgo intermedio del 14% en casos con mutación en *ASXL1* frente al 37% en casos sin mutación ( $p=0,030$ ) (88).



# **RESUMEN DE LA SITUACIÓN ACTUAL**



## RESUMEN DE LA SITUACIÓN ACTUAL

La clasificación de las LMA tiene como objeto la definición de entidades con un perfil clínico, biológico y pronóstico diferenciado. Las LMA-CRM constituyen un subtipo frecuente de LMA (21-48% de las LMA del adulto) (56,58,61,71,72) asociadas a mal pronóstico. Sin embargo, tal y como queda definido en la OMS de 2017 se trata de un grupo muy heterogéneo en el que se incluyen pacientes con displasia multilinea como único criterio de diagnóstico, otros que presentan alteraciones citogenéticas de riesgo adverso, pacientes que han progresado a partir de un SMD o un SMD/NMP o bien, casos que reúnen varias de estas características. De los tres criterios que pueden llevar al diagnóstico de LMA-CRM, el perfil citogenético ha demostrado tener un papel pronóstico relevante, y los casos con anomalías citogenéticas relacionadas con SMD, especialmente los de cariotipo adverso, muestran una supervivencia significativamente menor comparada con aquellos con cariotipo normal o anomalías no relacionadas con SMD (62,63,94). Diversos estudios han establecido también el impacto negativo de la historia previa de SMD o SMD/NMP en los pacientes con LMA y específicamente en LMA-CRM (62,63,94). Sin embargo, el valor de la displasia multilinea como factor pronóstico independiente en los pacientes con LMA-CRM ha sido un aspecto muy discutido, con estudios que muestran resultados desiguales (56-59,61-63,67,76,85,94). Además, se añade que la displasia es un criterio a veces difícil de objetivar, basado en una evaluación citomorfológica que implica cierto grado de variabilidad interobservador y que es dependiente de la presencia de hematopoyesis residual en el momento del diagnóstico de la leucemia.

Por otro lado, la aplicación durante los últimos años de las técnicas moleculares de secuenciación de nueva generación al estudio de las LMA, ha dado lugar a numerosa información que se ha convertido en una nueva herramienta de diagnóstico, por ejemplo, las mutaciones de *NPM1* y las mutaciones bialélicas de *CEBPA* definen diferentes categorías de LMA; y también de pronóstico, por ejemplo, mutaciones de *TP53* y de *ASXL1*, que están asociadas a un pronóstico adverso. En el grupo de las LMA-CRM se ha descrito un perfil molecular diferenciado con una elevada frecuencia de mutaciones en *ASXL1* (87).

Con esta perspectiva histórica planteamos el estudio de una cohorte de pacientes con LMA-CRM centrándonos en su caracterización citomorfológica, citogenética y molecular, en el estudio de la mutación en *ASXL1* como posible marcador asociado a LMA-CRM con utilidad pronóstica, y en la evaluación de la displasia multilinea como factor pronóstico independiente en este grupo.

Algunos de los conceptos planteados en la hipótesis y objetivos de este proyecto de tesis, iniciado en el año 2019, se recogen en la nueva clasificación de las LMA publicada en junio de 2022 en el artículo que antecede a la quinta edición de la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS (151); estos aspectos, al igual que los detalles de la nueva clasificación, se debatirán en profundidad en el apartado de discusión del presente trabajo de tesis.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La displasia multilínea es un factor pronóstico discutido en LMA, que se ha utilizado desde el año 2001 como criterio de diagnóstico de la LMA-CRM.

Como hipótesis de trabajo se propone que la displasia multilínea por sí sola no constituye un factor pronóstico independiente en los pacientes con LMA-CRM, sino relacionado con o dependiente de otros factores genético-moleculares subyacentes; y, que el perfil mutacional permite discriminar diferentes categorías pronósticas dentro de los pacientes diagnosticados solo por la presencia de displasia, centrando el estudio en la mutación de *ASXL1* como posible marcador asociado a LMA-CRM.

### 2. OBJETIVOS

1. Estudiar las características citomorfológicas, citogenéticas y moleculares de los pacientes con LMA-CRM (OMS 2017) al diagnóstico.

- Descripción de las características citomorfológicas, citogenéticas y moleculares de las LMA-CRM.
- Identificación de diferencias por subgrupos diagnósticos (pacientes con alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD, pacientes con antecedente de SMD o SMD/NMP, pacientes con displasia multilínea como único criterio de diagnóstico).
- Pronóstico de las LMA-CRM comparado con LMA-NE.

2. Estudiar la asociación de la mutación de *ASXL1* a LMA-CRM y su valor pronóstico.

- Establecer la frecuencia de la mutación de *ASXL1* en LMA-CRM y compararla con la encontrada en un grupo control de LMA-NE.
- Identificar características clínicas, citomorfológicas, citogenéticas y moleculares asociadas a la presencia de la mutación de *ASXL1* en pacientes con LMA-CRM.

- Establecer el posible valor pronóstico de las mutaciones en *ASXL1* en pacientes con LMA-CRM.
3. Evaluar el valor pronóstico independiente de la displasia multilínea en LMA-CRM.
- Evaluación del valor pronóstico independiente de la displasia multilínea.
  - Asociación de rasgos citomorfológicos de displasia con pronóstico en LMA-CRM.
  - Otras variables con impacto pronóstico en LMA-CRM.

**MATERIAL  
Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Criterios de selección de pacientes

Se realizó un estudio ambispectivo de pacientes de edad adulta (>14 años) de un único centro de tercer nivel (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla) diagnosticados de LMA-CRM entre los años 2008 y 2020 de acuerdo con criterios OMS 2017 (Tabla 10).

**Tabla 10.** Criterios diagnósticos de LMA-CRM (OMS 2017)

1. Presencia de $\geq 20\%$ de blastos en sangre periférica y/o médula ósea
2. Cualquiera de los siguientes (uno o más)
– Historia de síndrome mielodisplásico o neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa
– Presencia de anomalía citogenética relacionada con mielodisplasia
○ Cariotipo complejo
○ Anomalías en desequilibrio
▪ -7/del(7q)
▪ del(5q) o t(5q)
▪ Isocromosoma 17q o t(17p)
▪ -13 o del(13q)
▪ del(11q)
▪ del(12p) o t(12p)
▪ idic(X)(q13)
○ Anomalías equilibradas
▪ t(11;16)(q23.3;p13.3)
▪ t(3;21)(q26.2;q22.1)
▪ t(1;3)(p36.3;q21.2)
▪ t(2;11)(p21;q23.3)
▪ t(5;12)(q32;p13.2)
▪ t(5;7)(q32;q11.2)
▪ t(5;17)(q32;p13.2)
▪ t(5;10)(q32;q21)
▪ t(3;5)(q25.3;q35.1)
– Displasia multilínea ( $\geq 50\%$ de elementos displásicos en $\geq 2$ líneas celulares)

Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; OMS: Organización Mundial de la Salud.

Se excluyeron los pacientes que habían recibido tratamiento previo con quimioterapia y/o radioterapia (LMA-t), y aquellos con anomalías citogenéticas diagnósticas de LMA con anomalías citogenéticas recurrentes. Asimismo, se excluyeron los casos con mutación bialélica de *CEBPA* o con mutación de *NPM1* con displasia multilínea como único criterio de LMA-CRM (considerados dentro del grupo de LMA con anomalías citogenéticas recurrentes desde la clasificación OMS 2017). Se seleccionó un grupo control de pacientes diagnosticados de LMA-NE (Tabla 11) en el mismo periodo de tiempo y en la misma institución.

**Tabla 11.** Criterios diagnósticos de LMA-NE (OMS 2017)

1. Presencia de $\geq 20\%$ de blastos en sangre periférica y/o médula ósea
2. Casos que no cumplen los criterios de inclusión en las categorías de LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes, LMA-t o LMA-CRM
<p>Subtipos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ LMA con mínima diferenciación</li> <li>○ LMA sin maduración</li> <li>○ LMA con maduración</li> <li>○ Leucemia mielomonocítica aguda</li> <li>○ Leucemia monoblástica/monocítica aguda</li> <li>○ Leucemia eritroide pura</li> <li>○ Leucemia megacarioblástica aguda</li> <li>○ Leucemia aguda de basófilos</li> <li>○ Panmielosis aguda con mielofibrosis</li> </ul>

Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda; LMA-t: LMA relacionada con el tratamiento; LMA-CRM: LMA con cambios relacionados con mielodisplasia; LMA-NE: LMA no especificada de otra manera; OMS: Organización Mundial de la Salud.

El número total de pacientes incluidos fue de 111 casos de LMA-CRM y 47 controles con LMA-NE. Todos los casos contaban con estudio citomorfológico, inmunofenotípico y citogenético y/o de hibridación in situ fluorescente (FISH) al diagnóstico. El estudio

molecular se realizó en los pacientes diagnosticados a partir del año 2012 siendo el factor limitante la disponibilidad de muestra de ácido desoxirribonucleico (ADN) obtenida en el momento del diagnóstico.

El estudio fue aprobado por el Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado de acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales.

## 2. Datos clínicos

Los datos clínicos y analíticos al diagnóstico de la LMA fueron recogidos de la historia clínica digital. El tipo de tratamiento recibido, incluida la indicación de TPH, se ajustó al protocolo vigente en cada momento. Los protocolos empleados durante este periodo fueron PETHEMA (Programa Español para el Tratamiento de las Hemopatías Malignas) LMA-2006 (pacientes con LMA *de novo* o secundaria a SMD o tratamiento previo, con independencia de la edad); PETHEMA-LMA10 (tratamiento de primera línea adaptado al riesgo de pacientes con LMA de edad menor o igual a 65 años); PETHEMA LMA 2011  $\geq$  65 (tratamiento de la LMA en pacientes de edad mayor o igual a 65 años y/o no candidatos a quimioterapia intensiva); PETHEMA LMA 2014  $\geq$  65 (tratamiento de la LMA en pacientes de edad mayor o igual a 65 años y/o en aquellos no candidatos a quimioterapia intensiva); CETLAM16LAM70 (pacientes de edad  $>$  70 años con diagnóstico de LMA *de novo* o secundaria, con o sin displasia trilineal no tratados previamente) (CETLAM: Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias).

Las definiciones de remisión completa, remisión parcial, fracaso terapéutico y recurrencia de la enfermedad se obtuvieron de las recomendaciones revisadas por la ELN (29,30):

- Remisión completa (RC): blastos en médula ósea  $<$ 5%; ausencia de blastos circulantes y de blastos con bastones de Auer; ausencia de enfermedad extramedular; cifra de neutrófilos  $>$ 1x10<sup>9</sup>/L y de plaquetas  $>$ 100x10<sup>9</sup>/L.

- Remisión completa con recuperación hematológica incompleta: todos los criterios de RC, salvo por presencia de neutropenia ( $<1 \times 10^9/L$ ) o trombocitopenia ( $<100 \times 10^9/L$ ) residuales.
- Remisión parcial (RP): todos los criterios hematológicos de RC; disminución del porcentaje de blastos en médula ósea de 5 a 25%; y disminución del porcentaje de blastos pre-tratamiento en médula ósea de al menos el 50%.
- Enfermedad refractaria: no RC o RC con recuperación hematológica incompleta después de 2 cursos de tratamiento intensivo de inducción; excluyendo pacientes con muerte en aplasia o muerte por causa indeterminada.
- Recaída hematológica (después de cualquier tipo de RC): blastos en médula ósea  $\geq 5\%$ ; o reaparición de blastos en la sangre; o desarrollo de enfermedad extramedular.

### **3. Estudio citomorfológico**

Las extensiones de sangre periférica y de médula ósea realizadas al diagnóstico y teñidas con May-Grünwald-Giemsa fueron revisadas de forma independiente por dos citólogos expertos pertenecientes al Grupo Español de Citología Hematológica.

El estudio citológico se obtuvo siempre previo al inicio de quimioterapia. En la sangre periférica se evaluó la presencia de dismorfias en los hematíes (anisocitosis, anisocromía y poiquilocitosis), en los neutrófilos (hipogranularidad e hipo/hipersegmentación) y en las plaquetas (alteración en la forma y la granulación, presencia de micromegacariocitos circulantes). En la médula ósea se evaluó el porcentaje de células displásicas en cada línea celular sobre un mínimo de 25 eritroblastos (habitualmente 100 cada observador), 25 neutrófilos (habitualmente 100 cada observador) y 10 megacariocitos (habitualmente 30). Se revisaron y registraron las siguientes características de dishemopoyesis para cada línea celular estudiada: eritroide (multinuclearidad, otros defectos nucleares - lobulación/constricciones, puentes internucleares, cambios megaloblásticos-, macrocitosis, defectos de hemoglobinización, PAS positividad y presencia de sideroblastos en anillo en casos con tinción de Perls); granulocítica (hipogranularidad, hiposegmentación nuclear -formas pseudo-Pelger-Hüet-, otras alteraciones nucleares - núcleos en espejo/anillo o hipersegmentación nuclear-, gigantismo, vacuolas y presencia de gránulos tipo pseudo-Chédiak-Higashi); y megacariocítica (micromegacariocitos,

megacariocitos con núcleo hipolobulado, núcleos múltiples separados, megacariocitos pequeños y megacariocitos de talla grande).

Se consideró criterio de displasia multilínea, de acuerdo con las recomendaciones de la clasificación OMS 2017, la observación de al menos un 50% de elementos displásicos en dos o más líneas celulares mieloides (eritroide, granulocítica y/o megacariocítica) en la médula ósea.

Técnica de tinción con MGG:

Se trata de una tinción panóptica, es decir, se emplean sucesivamente varios colorantes que se van añadiendo por etapas.

Reactivos y preparaciones:

- Tampón fosfato pH 6,4. Tabletas (laboratorio Merck).
- Solución madre de May-Grümwald (laboratorio Merck).
- Solución madre de Giemsa (laboratorio Merck).
- Glicerol.
- Solución de agua tamponada: disolver una tableta de tampón fosfato pH 6,4 en 1 litro de agua destilada (estable un mes –máximo- a temperatura ambiente).
- Solución de Giemsa al 3%: en la solución de agua tamponada (3 mililitros [ml] Giemsa + 97 ml agua tamponada + 1 ml de glicerol [estabilizante]). Se prepara la cantidad necesaria para uso diario. No se almacena.

Procedimiento:

- Fijación-precoloración: Sobre la extensión se vierten 2 ml de solución madre de May-Grümwald, procurando que quede bien cubierta, se mantiene 3 minutos. A continuación, se añaden 2 ml de agua tamponada en goteo rápido mezclándola bien y se mantiene otros 3 minutos.
- Escurrir la mezcla de May-Grümwald sin lavar con agua. El contenido del porta se derrama completamente, y se procura absorber el máximo de líquido sobre papel de filtro. El porta completamente mojado se vuelve a colocar horizontal.
- Solución de Giemsa al 3% (contracoloración): inmediatamente añadir 3-4 ml que cubran completamente la extensión. Se deja actuar durante 20 minutos.

- Lavado breve (10-15 segundos) y suave con agua del grifo. El agua no debe caer sobre la propia extensión, sino desde más arriba. Luego dejar secar completamente al aire con el porta apoyado verticalmente sobre papel de filtro.
- Cubrir con medio de montaje Entellan o DPX (siempre antes de su examen al microscopio) evitando la formación de burbujas.

#### 4. Estudio de citometría de flujo

Para el estudio de citometría de flujo la muestra utilizada fue la médula ósea, recogida en tubo de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y procesada dentro de las primeras veinticuatro horas desde su extracción. El estudio se realizó en todos los casos al diagnóstico y durante el seguimiento para la determinación de la EMR. Hasta el año 2012 se emplearon paneles de estudio con combinaciones de anticuerpos para 6 colores, detallados en la Tabla 12. A partir de junio de 2012 se utilizaron los paneles de diagnóstico de LMA descritos por el consorcio Euroflow, detallados en la Tabla 13 (152). En este mismo momento se incorporaron también las recomendaciones del grupo Euroflow para el procesamiento de muestras, así como para la calibración y compensación de los citómetros (152).

**Tabla 12.** Panel de anticuerpos monoclonales empleado para el diagnóstico de LMA (años 2008 a junio de 2012)

<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP.Cy5</b>	<b>PE.Cy7</b>	<b>APC</b>	<b>APC.Cy7</b>
CD5	CD7	CD45	CD2	HLADR	CD3
CD24	CD38	CD34	CD10	CD20	CD19
CD66B	CD16b	CD33	CD13	CD11b	CD45
CD64	CD56	CD45	-	CD36	CD14
CD65	CD123	CD9	CD10	CD117	CD45
TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	CD45	CD4	CD1a	CD8
KORSA	CD15	CD41a	-	CD71	CD45
KAPPA	LAMBDA	CD24	CD19	CD79b	CD45
MPO <sub>c</sub>	IgM <sub>c</sub>	CD79a <sub>c</sub>	CD3 <sub>c</sub>	TdT <sub>c</sub>	CD45

**Tabla 13.** Panel de anticuerpos monoclonales empleado para el diagnóstico de LMA (desde junio de 2012)

<b>PacB</b>	<b>PacO</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP Cy5.5</b>	<b>PECy7</b>	<b>APC</b>	<b>APCH7</b>
CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3
HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14
HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
HLADR	CD45	NuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
HLADR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
HLADR	CD45	CD42a/ CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9

Adaptado de van Dongen JJ et al. *Leukemia*, 2012 (152).

El seguimiento de la EMR se llevó a cabo según fenotipo asociado a leucemia (LAP, por sus siglas en inglés *Leukaemia Associated Phenotypes*) hasta la incorporación de los paneles de Euroflow de ocho colores, a partir de los cuales se utilizó la combinación de los tubos del panel de SMD junto con un tubo diseñado según LAP. Esta última estrategia permitió la combinación del análisis de LAP específico junto con análisis de diferente frente a normal.

La adquisición de la muestra se realizó en un citómetro FACSCanto II de 8 colores (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), con el software Diva (Becton Dickinson). El análisis se llevó a cabo hasta febrero de 2011 con el software Diva (Becton Dickinson) y a partir de marzo de 2011 con el software Infinicyt, en sus versiones 1.6 a 2.0 (Cytognos).

## 5. Estudio citogenético

Se realizaron análisis citogenético y técnica de FISH en muestras de médula ósea fresca (cultivada durante 24 horas sin adición de mitógenos de acuerdo con técnicas estándar en el caso del cariotipo, y cultivada o sin cultivar en el caso de la FISH).

### Técnica de citogenética con bandas G:

#### A) Reactivos y preparaciones:

##### - Medio de cultivo de lavado:

- Medio RPMI1640 (1X), 500 ml (Gibco™).
- L-glutamina 4,5 ml.
- Penicilina-estreptomicina-neomicina 3 ml.

##### - Medio de cultivo completo:

- Medio RPMI1640 (1X), 500 ml (Gibco™).
- Suero bovino fetal 100 ml.
- L-glutamina 6 ml.
- Penicilina-estreptomicina-neomicina 3 ml.

- Solución hipotónica, cloruro potásico (CIK) 0,075 M (0,56%): 0,56 g de CIK en 100 ml de agua bidestilada.

- Solución de Carnoy (3:1 metanol: ácido acético glacial).

- Colorante de Giemsa: añadir 1 g de tinción Leishman a 500 ml de metanol en un recipiente de cristal y en oscuridad.

#### B) Procedimiento:

1. Cultivo celular: es necesario trabajar en condiciones estériles (campana de flujo laminar vertical). El número de células por cultivo se ajusta a 20 millones de leucocitos. La cantidad de muestra de médula ósea calculada se lava con medios de cultivo en tubo cónico. Después, según la cantidad de médula ósea y el número de leucocitos de la misma, obtendremos un número variable de cultivos por cada muestra (1 a 3) con un volumen de 10 ml utilizando medios de cultivo realizados en el laboratorio. El cultivo se realiza en una incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C hasta el día siguiente (24 horas).

2. Parada de la división celular: una vez pasado el tiempo de cultivo, se obtiene un máximo de células en división (metafases). En este momento se añade colcemid (colchicina, antimitótico), 100 µl en la superficie de cada cultivo sin mezclar, en condiciones de esterilidad. Incubar 10 minutos a 37°C y CO<sub>2</sub> (5%) en patología mieloide.

3. Choque hipotónico: posteriormente las células son sometidas a un choque hipotónico con CIK (CIK 0,075 M). Se añaden 8 ml de solución hipotónica (CIK) con la muestra en agitación en vórtex, previamente precalentada a 37°C. El primer ml de CIK se añade gota a gota. Incubar en el baño a 37°C durante 20 minutos. El choque hipotónico por acción de ósmosis hace que la membrana citoplasmática se tense y que los cromosomas de las células que están en metafase empiecen a separarse entre ellos.

4. Fijación con solución de Carnoy: tras el choque hipotónico, sin centrifugar, prefijar añadiendo gota a gota y agitando en vórtex 1 ml de Carnoy. Posteriormente, se realizará centrifugación y, a continuación, los lavados con fijador de Carnoy hasta que el pellet celular quede limpio. La función del fijador es lisar los hematíes, romper las membranas citoplasmáticas, fijar los cromosomas y, finalmente, eliminar membranas citoplasmáticas, citoplasmas y diferentes organelas para obtener un pellet con los núcleos en interfase y metafase. El pellet se guarda en un tubo ependorf de 1,5 ml en la seroteca.

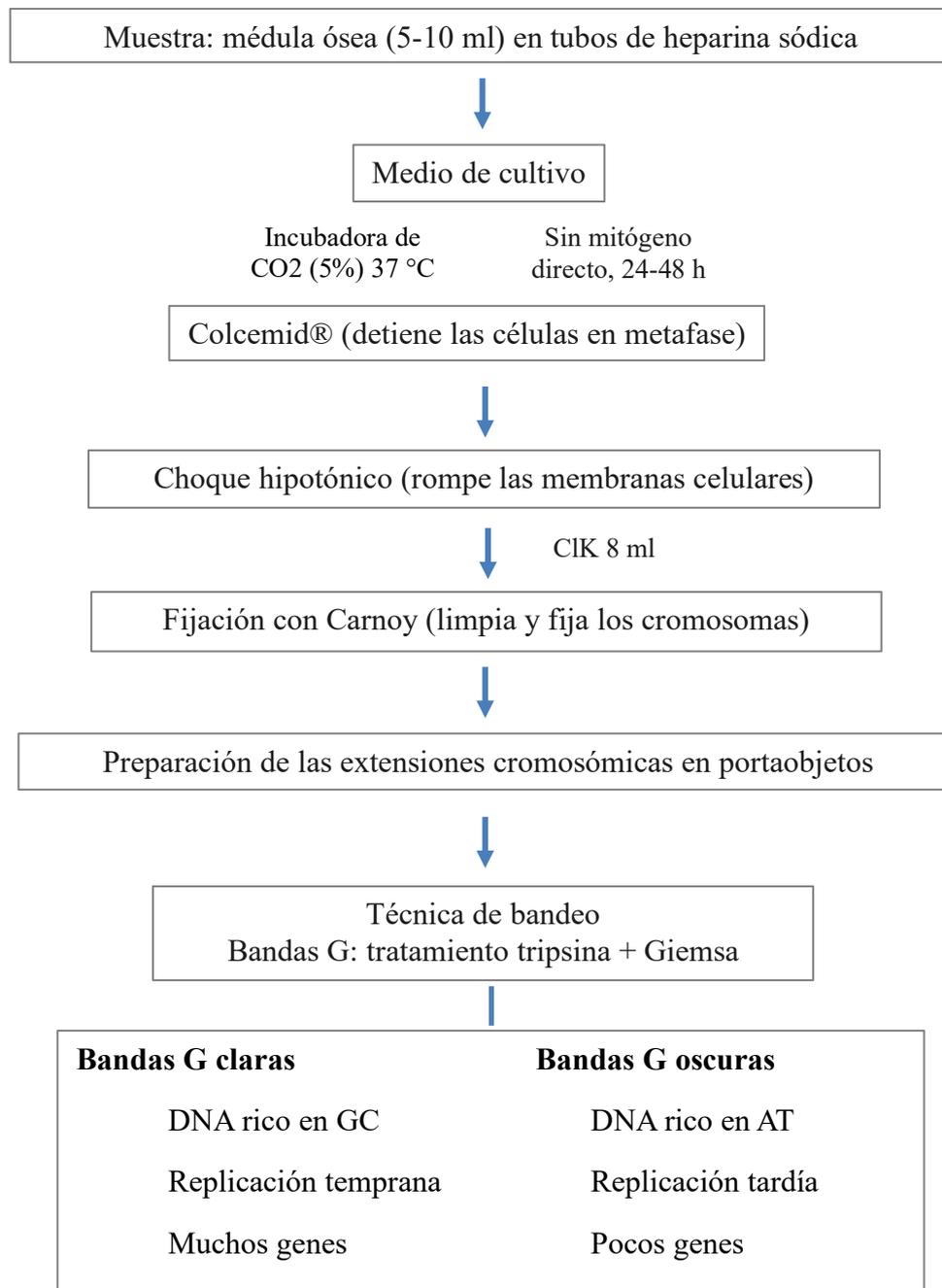
5. Extensiones y envejecimiento: las extensiones deben realizarse con una dilución ajustada y condiciones de humedad y temperatura adecuadas para conseguir que los cromosomas queden adecuadamente separados. El envejecimiento (necesario para obtener las bandas cromosómicas) puede ser por calor o dejando pasar un tiempo (al menos 24 horas a temperatura ambiente) hasta la tinción.

6. Técnica de Bando G con tripsina (GTG):

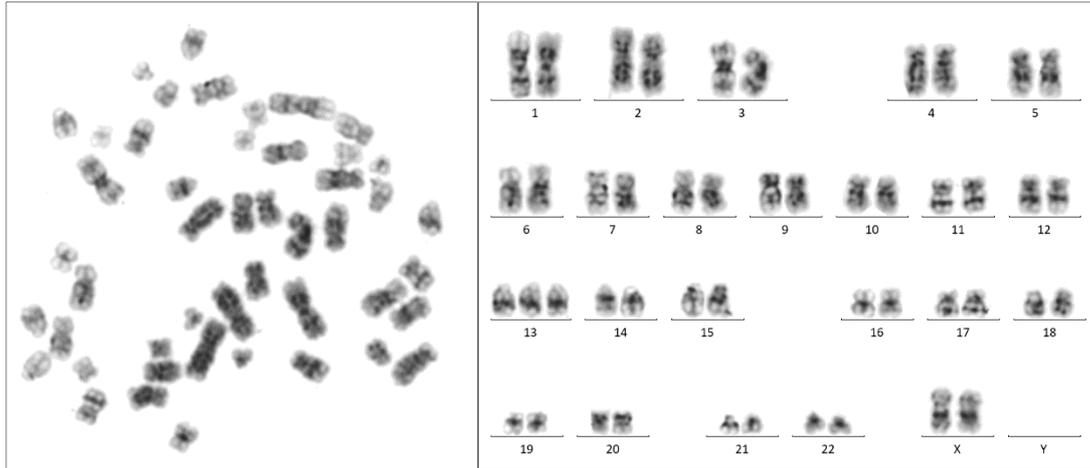
- Preparar tres vasos de coplin: uno, con una solución ya preparada comercialmente de tripsina a 0,05%, el segundo, con agua destilada, y el tercero, con colorante de Giemsa (preparado previamente) diluido con solución buffer pH 6,88 (aproximadamente 25 ml de buffer y 10 ml de colorante Giemsa).
- Introducir el portaobjeto en la solución de tripsina brevemente, después enjuagar en el agua destilada y después teñir con el colorante Giemsa durante 1 a 3 minutos. Después enjuagar con agua del grifo y dejar secar.

El objetivo del tratamiento previo con tripsina es romper los dos puentes entre A-T (adenina-timina), más frágiles que los tres puentes de G-C (guanina-citosina). Al romperse los enlaces A-T se facilita que la tinción penetre en la estructura del cromosoma rica en secuencias de A-T (bandas oscuras).

La técnica de citogenética con bandas G se resume en la Figura 14, y en la Figura 15 se representa la imagen de una metafase y de un cariotipo con patrón de bandas G.



**Figura 14.** Esquema de la técnica de citogenética con bandas G. Adaptado de Espinet, B; Blanco, ML; Costa, D; Cuatrecasas, E y Ruiz-Xivillé, N (Eds.) (2021). *Análisis citogenómicos aplicados a neoplasias hematológicas*; ISBN:978-84-09-29357-5.



**Figura 15.** Imagen de una metafase y un cariotipo con patrón de bandas G. A la izquierda metafase. A la derecha cariotipo: 47,XX+13.

#### C) Análisis cromosómico:

Para el análisis citogenético se utilizó un captador automático de metafases: *Metafer4 v3.9.4 MSearch de MetaSystems* y para el análisis de las metafases capturadas se utilizó el programa Ikaros de *MetaSystems*. Se trató de cariotipar un mínimo de 20 metafases en todos los casos, siguiendo las recomendaciones basadas en las guías europeas “*European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms*” (154). Se consideró la presencia de una anomalía clonal cuando se encontró en  $\geq 2$  metafases en el caso de trisomías/ganancias o anomalías estructurales, o en  $\geq 3$  metafases en el caso de monosomías.

Las anomalías cromosómicas fueron descritas de acuerdo con el Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica vigente en cada momento (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature –ISCN–*; 2009, 2013, 2016 o 2020) (155-158). Las anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia consideradas para el diagnóstico de LMA-CRM en la clasificación OMS de 2017 están recogidas en la Tabla 10. Las categorías de riesgo citogenético: bajo, intermedio o adverso se establecieron según criterios de Grimwade y colaboradores (18), que se mantienen en las últimas recomendaciones de la *European LeukemiaNet* (30).

### Estudios de FISH:

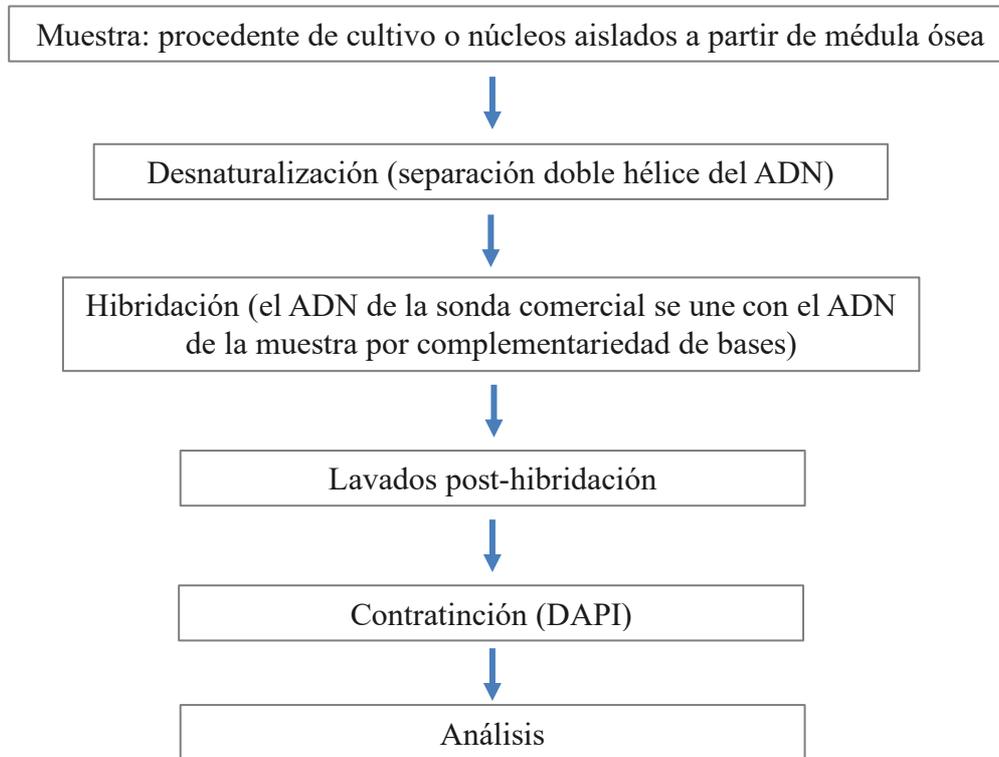
El estudio de FISH se realizó en casos seleccionados en función de los resultados del cariotipo y de los estudios de citomorfología y citometría (casos con cariotipo sin crecimiento, confirmación de alteraciones observadas en el cariotipo o detección de alteraciones sospechadas según los estudios citomorfológico y y citométrico). Se realizó sobre muestras procedentes de cultivo de citogenética o bien sobre suspensión celular de médula ósea, fijadas con Carnoy (técnica similar a la de citogenética, pero sin cultivo celular).

#### A) Procedimiento:

Una vez partimos de las extensiones con núcleos o núcleos y metafases, el procedimiento técnico es el siguiente:

1. Desnaturalización: es la separación de las cadenas de la doble hélice del ADN para permitir la hibridación con la sonda complementaria. Para ello, hay que preparar la sonda que vayamos a utilizar (dejar que alcance temperatura ambiente) y aplicar la dilución de la sonda (según lo descrito por la casa comercial para cada tipo de sonda) en un cubreobjetos que posteriormente cubre la extensión. Después, el porta se coloca en la placa calefactora 5 minutos a 74°C. Una vez completado este tiempo los portas se envuelven en papel parafilm.
2. Hibridación: es el proceso por el cual el ADN de la sonda se une con el ADN de la muestra por complementariedad de bases. Esto se consigue llevando los portas a una cámara húmeda en la estufa de 37°C durante 16-24 horas.
3. Lavados post-hibridación: se realizan para eliminar el exceso de sonda que no se ha unido con el ADN de la muestra problema y las señales inespecíficas (híbridos no perfectos que generan ruido de fondo). Los lavados consisten en soluciones salinas en condiciones astringentes (solución SSC, del inglés *saline sodium citrate* 0,4x y solución SSC 2x) junto con el uso de detergentes (NP-40®). Se hacen dos lavados, primero con solución 1 (0,4x SSC/ 0,3% NP-40®, 2 minutos a 72°C) y posteriormente con solución 2 (2x SSC/0,1% NP-40®).

4. **Contratinción:** el fluorocromo más utilizado es el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (II para interfase y I para metafase). Aplicar 5  $\mu$ l en el área de hibridación y poner un cubreobjetos. El esquema de la técnica de FISH se describe en la Figura 16.



**Figura 16.** Esquema de la técnica de FISH. Adaptado de Espinet, B; Blanco, ML; Costa, D; Cuatrecasas, E y Ruiz-Xivillé, N (Eds.) (2021). *Análisis citogenómicos aplicados a neoplasias hematológicas*; ISBN:978-84-09-29357-5.

## B) Análisis

El resultado de la FISH se valoró mediante observación manual en microscopio óptico de fluorescencia (modelo Nikon Eclipse E400). De manera general se realizó un recuento sobre 200 núcleos en interfase para cada una de las sondas empleadas.

En los casos de LMA-CRM se emplearon sondas para la detección de la delección 5q, delección 7q/monosomía 7, delección de *TP53*, delección 20q y trisomía 8. Las especificaciones técnicas de las sondas utilizadas se describen en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Tipos de sondas de FISH empleadas para el estudio de las LMA-CRM

	<b>TIPO DE SONDA</b>
LSI 5q31 (EGR1) SpGreen/D5S721, D523 SpectrumOrange	Locus específica/locus específica
LSI 7q31 (D7S486) SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen	Locus específica/centromérica
LSI TP53 SpectrumOrange/ CEP 17 SpectrumGreen	Locus específica/centromérica
CEP 8 SpectrumOrange, IVD Kit	Centromérica
LSI 20q12 (D20S108) SpectrumOrange/CEP 20 SpectrumGreen	Locus específica/centromérica

## 6. Secuenciación del exón 12 de *ASXL1*

Se realizó secuenciación por Sanger del último exón codificante de *ASXL1*, exón 14 de la secuencia genómica de referencia (RefSeq NG\_027868) o exón 12 del mRNA mayoritario (NM\_015338.6) en los casos diagnosticados a partir del año 2012 en los que se disponía de muestra de ADN obtenida en el momento del diagnóstico, lo que incluyó a 80 pacientes con LMA-CRM y 47 controles con LMA-NE diagnosticados en el mismo periodo. En el resto del trabajo se nombrarán los exones de acuerdo a la secuencia de mRNA NM\_015338.6.

El ADN se extrajo de sangre periférica completa o de células de médula ósea cultivadas conservadas en Carnoy, con Qiagen mini blood DNA kit (Qiagen), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La secuenciación Sanger del exón 14 de *ASXL1* se llevó a cabo según lo descrito por Gelsi-Boyer (123) con modificaciones. Mediante Sanger se secuenció la región codificante desde el aminoácido 556 hasta el aminoácido 1220, en el exón 14 de la secuencia genómica NG\_027868 y se buscaron mutaciones de parada y de cambio del marco de lectura. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo con *Hot Start DreamTaq* (Thermo Fisher) con las mismas condiciones de termociclador descritas por Gelsi-Boyer, se purificaron con ExoSAP (GE) y se realizaron las reacciones de secuenciación con *BigDye kit 3.1* (Thermo Fisher) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Estas se purificaron con columnas SigmaSpin (Sigma) y se secuenciaron en un equipo 3130xl *Genetic Analyzer* de *Applied Biosystems*. Se consideraron las mutaciones de tipo *nonsense* y mutaciones de cambio en el marco de lectura (*frame-shift*).

## 7. Técnica de secuenciación de nueva generación

Se realizó NGS en 47 casos de LMA-CRM. Para la técnica de NGS, el ADN genómico se aisló de las células mononucleadas de la médula ósea en el momento del diagnóstico utilizando el kit de ADN de Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN se cuantificaron mediante el ensayo fluorométrico Qubit. Se empleó una cantidad total de 10 nanogramos para realizar una secuenciación dirigida basada en PCR de una selección de genes implicados en neoplasia mieloide. Durante el estudio se emplearon dos paneles diferentes de genes, hasta el año 2016 el panel incluyó 19 genes (Ion AmpliSeq™ *AML Cancer Research Panel*: regiones codificantes de *CEPBA*, *DNMT3A*, *GATA2*, *TET2*, *TP53* y regiones hotspots de *ASXL1*, *BRAF*, *CBL*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RUNX1* y *WT1*); y a partir de 2016 se utilizó un panel de estudio con 40 genes (*Oncomine Myeloid Research Panel*: regiones hotspots de *ABL*, *BRAF*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *FLT3*, *GATA2*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *MYD88*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *WT1* y regiones codificantes de *ASXL1*, *BCOR*, *CALR*, *CEBPA*, *EDEV6*, *EZH2*, *IKZF1*, *NF1*, *PHF6*, *PRPF8*, *RBI*, *RUNX1*, *SH2B3*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, *ZRSR2*). De los 47 casos estudiados, en 10 se realizó el primer panel que incluía 19 genes a estudio, y en 37 el panel ampliado que incluía 40 genes.

La secuenciación se realizó utilizando la plataforma de secuenciación Ion Torrent S5 de *Life Technologies*. El análisis de datos sin procesar, las alineaciones y la identificación de variantes se realizaron con el Software Torrent Suite™. Las anotaciones y los informes se realizaron mediante el software Ion Reporter (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*). La interpretación de las variantes se realizó de acuerdo con las recomendaciones de “*The American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*” (159).

## 8. Clasificación de los pacientes con LMA-CRM

Para llevar a cabo el estudio de las diferencias entre los distintos subgrupos diagnósticos de LMA-CRM (alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia, antecedente de SMD o SMD/NMP, displasia multilinea), y los estudios relacionados con el valor

pronóstico de la displasia multilínea, los pacientes con LMA-CRM se clasificaron en tres categorías según el siguiente orden jerárquico:

- 1) Pacientes con alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (LMA-CRM-citog).
- 2) Pacientes con antecedente de SMD o SMD/NMP (LMA-CRM-smd).
- 3) Pacientes con displasia multilínea como único criterio diagnóstico de LMA-CRM (LMA-CRM-morfo).

Para este análisis se excluyeron los 9 casos de LMA-CRM en los que no se disponía de estudio citogenético al diagnóstico (N=102).

## 9. Análisis estadístico

Para caracterizar la serie de pacientes con LMA-CRM y LMA-NE se realizó un análisis descriptivo que incluyó un estudio de frecuencias de las distintas variables evaluadas y el análisis de las diferencias. Para comparar las características asociadas a los diferentes subgrupos diagnósticos dentro de las LMA-CRM (LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo), las variables categóricas se compararon con test de Chi-cuadrado y las variables cuantitativas se compararon con one-way ANOVA. Para el estudio de las diferencias entre los pacientes con LMA-CRM y LMA-NE las variables categóricas se compararon con test de Fisher y las variables cuantitativas con t-test.

Con el fin de explorar las características clínicas y citomorfológicas asociadas a la presencia de la mutación *ASXL1* en LMA-CRM, se compararon las frecuencias de las variables categóricas o las medias de las variables cuantitativas en pacientes con LMA-CRM con mutación en *ASXL1* (*ASXL1+*) frente a pacientes sin mutación en *ASXL1* (*ASXL1-*). Las variables categóricas en pacientes con y sin mutación en *ASXL1* se compararon mediante pruebas de Chi-cuadrado o Fisher. Las medias de las variables cuantitativas entre los pacientes con y sin mutación en *ASXL1* se compararon mediante t-test.

Los estudios univariantes y multivariantes se realizaron mediante regresión de Cox. El modelo de regresión de Cox se empleó para la estimación del Hazard-ratio.

Los estudios de comparación de la supervivencia global en los diferentes grupos de pacientes se realizaron por método de Kaplan-Meier. Las medianas de supervivencia se calcularon según el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante la prueba Log-rank.

La supervivencia global se calculó como el período de tiempo desde el diagnóstico hasta la fecha de muerte por cualquier causa, y los que sobrevivieron fueron censurados en el último seguimiento registrado.

El nivel de significación estadística se estableció con un valor de p menor o igual a 0,05. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (abreviatura del inglés, *Statistical Package for the Social Sciences*) en su versión 25. La figura de los perfiles mutacionales en los pacientes con LMA-CRM (Figura 17) se llevó a cabo con la función Waterfall del paquete GenVisR (*Genomic Visualizations in R*) (160). En esta figura se incluyeron aquellos genes que estaban secuenciados en los 47 pacientes (comunes a los dos paneles de NGS empleados durante el periodo de estudio).



# **RESULTADOS**



## RESULTADOS

### PARTE I: CARACTERÍSTICAS CITOMORFOLÓGICAS, CITOGÉNÉTICAS Y MOLECULARES DE LOS PACIENTES CON LMA-CRM AL DIAGNÓSTICO

Se estudiaron un total de 111 pacientes con LMA-CRM diagnosticados entre los años 2008 y 2020. Las principales características clínicas y biológicas se resumen en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Características clínicas y biológicas de los pacientes con LMA-CRM

Parámetro		Valor	
Número de pacientes (N)		111	
Edad (años), media (rango) $\pm$ ES		67 (14-89) $\pm$ 1,5	
Sexo (Hombre/Mujer)		63/48	
Sangre periférica	Hemoglobina (g/l), media (rango) $\pm$ ES	83,15 (42-137) $\pm$ 1,9	
	Leucocitos ( $\times 10^9/l$ ), media (rango) $\pm$ ES	21 (0,2-205,6) $\pm$ 3,3	
	Neutrófilos ( $\times 10^9/l$ ), media (rango)	3,5 (0-50,6)	
	Plaquetas ( $\times 10^9/l$ ) media (rango) $\pm$ ES	82,8 (8-577) $\pm$ 7,9	
	Blastos (%), media (rango) $\pm$ ES	25,1 (0-93) $\pm$ 2,6	
Blastos en médula ósea (%), media (rango) $\pm$ ES		48,9 (7-97) $\pm$ 2,1	
LMA <i>de novo</i>		70/111	
LMA con historia de SMD o SMD/NMP		41/111	
Citogenética	Normal	40/102	
	Citogenética relacionada con SMD: (N/total)	Cariotipo complejo	28/102
		-7/del(7q)	10/102
		-5/del(5q)	4/102
		del(11q)	2/102
	i(17q)/t(17p)	2/102	
Otras alteraciones	16/102		
Supervivencia global (mediana días, 95% IC)		178 (123,1-232,9)	

Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; ES: error estándar; SMD: síndrome mielodisplásico; SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa; IC: intervalo de confianza.

La mediana de edad de los pacientes con LMA-CRM al diagnóstico fue de 67 años, con un ligero predominio de hombres (63 de 111). Se diagnosticaron más casos como LMA *de novo*: 70/111 (63,1%) que como progresión de un SMD o un SMD/NMP: 41/111 (36,9%).

Un 45,1% (46/102) de los casos presentaba anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia, un 36,9% (41/111) tenía antecedente de SMD (30/41) o SMD/NMP (11/41), y un 76,6% (85/111) cumplía criterios de displasia multilinea; de estos, 33 pacientes (29,7%) se diagnosticaron exclusivamente por criterio citomorfológico.

### 1.1. Características citomorfológicas de las LMA-CRM

En la sangre periférica se observaron dismorfias en los hematíes en 87/101 (86,1%) casos valorables, dismorfias en los neutrófilos en 70/88 (79,5%), y dismorfias en las plaquetas en 44/81 (54,3%). En 27/88 (31,5%) casos los neutrófilos mostraron anomalía de pseudo Pelger-Hüet, y en 7/101 (6,5%) se observaron micromegacariocitos circulantes. La media de blastos observados en sangre fue de 25,1% (0-93).

La médula ósea fue mayoritariamente normo o hipercelular (92/111; 82,8%), con una cifra media de blastos de 48,9% (7-97). En 20/111 (18%) casos se observaron bastones de Auer en los blastos. Según la clasificación FAB el subtipo morfológico más frecuente fue la LMA M2 (53/111; 47,7%), seguido de los casos con componente monocítico: LMA M5 (20/111; 18%) y LMA M4 (17/111; 15,3%) (Tabla 16).

**Tabla 16.** Subtipos morfológicos FAB dentro de los casos de LMA-CRM

Tipo FAB	Frecuencia (N=111)	Porcentaje %
MO	1	0,9
M1	18	16,2
M2	53	47,7
M3	0	
M4	17	15,3
M5	20	18
M6	2	1,8
M7	0	

Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia.

Con respecto a la evaluación de la displasia multilineal, esta fue valorable en 93/111 (83,8%) casos, y no valorable en 18/111 (16,2%) por ausencia de suficiente hematopoyesis residual en el momento del diagnóstico de la LMA (casos con número de líneas mieloides evaluables  $\leq 1$ ).

A continuación se detallan las alteraciones citomorfológicas observadas en cada serie (resumidas en la Tabla 17):

- La serie eritroide fue valorable en 81/111 (72,9%) casos, de los que 56 (69,1%) presentaron displasia en un porcentaje  $\geq 50\%$  de las células. En estos casos, por orden de frecuencia se observaron:
  - Defectos citoplasmáticos (defectos de hemoglobinización) (100%).
  - Macroцитosis (77,8%).
  - Otros defectos nucleares (lobulación, constricciones, puentes internucleares, cambios megaloblásticos) (58,1%).
  - Multinuclearidad (31,8%).
  - Sideroblastos en anillo: 19/37 casos en los que se realizó la tinción de Perls de forma dirigida.
  - PAS positividad (11%).
  
- La serie granulocítica fue valorable en 94/111 (84,7%) casos, de los que 84 (89,4%) presentaron displasia en un porcentaje  $\geq 50\%$  de las células. En estos casos, por orden de frecuencia se observaron:
  - Hipogranularidad (98,8%).
  - Vacuolas (52,1%).
  - Gigantismo (38,9%).
  - Otras alteraciones nucleares (núcleos en espejo, en anillo o hipersegmentación) (37,5%).
  - Anomalía de pseudo Pelger-Huet (27,4%).
  
- La serie megacariocítica fue valorable en 89/111 (80,2%) casos, de los que 76 (85,4%) presentaron displasia en un porcentaje  $\geq 50\%$  de los megacariocitos. En estos casos, por orden de frecuencia se observaron:
  - Megacariocitos de tamaño pequeño (95,7%).
  - Megacariocitos con núcleo hipolobulado (95,5%).

- Micromegacariocitos (54,8%).
- Núcleos múltiples separados (39,4%).
- Megacariocitos de talla grande (13,6%).

**Tabla 17.** Rasgos de displasia observados en los casos con LMA-CRM

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Sangre periférica</b>	
- Dismorfias en hematíes (+/casos evaluables; %)	87/101 (86,1%)
- Dismorfias en neutrófilos (+/casos evaluables; %)	70/88 (79,5%)
- Dismorfias en plaquetas (+/casos evaluables; %)	44/81 (54,3%)
<b>Médula ósea</b>	
<b>Serie eritroide (casos evaluables; %)</b>	81/111 (72,9%)
- Defectos de hemoglobinización	100%
- Macrocitosis	77,8%
- Otros defectos nucleares (lobulación, constricciones, puentes, cambios megaloblásticos)	58,1%
- Multinuclearidad	31,8%
- Sideroblastos en anillo (estudio dirigido)	19/37
- PAS positividad	11%
<b>Serie granulocítica (casos evaluables; %)</b>	94/111 (84,7%)
- Hipogranularidad	98,8%
- Vacuolas	52,1%
- Gigantismo	38,9%
- Otras alteraciones nucleares (espejo, anillo, hipersegmentación)	37,5%
- Anomalía de pseudo Pelger-Hüet	27,4%
- Gránulos tipo pseudo-Chédiak-Higashi	0%
<b>Serie megacariocítica (casos evaluables; %)</b>	89/111 (80,2%)
- Tamaño pequeño	95,7%
- Núcleo hipolobulado	95,5%
- Micromegacariocitos	54,8%
- Núcleos múltiples separados	39,4%
- Talla grande	13,6%

## 1.2. Características citogenéticas de las LMA-CRM

102 de los 111 casos estudiados disponían de estudio citogenético al diagnóstico. De estos, 40 casos (39,2%) presentaron cariotipo normal y 62 (60,8%) presentaron alteraciones, siendo en 46/62 (74,2%) casos alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD. De las alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD detectadas, la más frecuente fue el cariotipo complejo en 28/46 (60,9%), seguido de la monosomía 7 o del(7q) en 10/46 (21,7%), y la del(5q) en 4/46 (8,7%) casos. Se detectaron 2/46 (4,3%) casos con i(17q) y 2/46 (4,3%) casos con del(11q). Ningún paciente presentó anomalías citogenéticas relacionadas con SMD equilibradas. En 16/62 (25,8%) casos se observaron otras alteraciones citogenéticas “no relacionadas con mielodisplasia”, siendo la más frecuente la trisomía 8 en 6/16 (37,5%) casos, uno de los cuales presentaba además una alteración numérica adicional (trisomía 9) (Tabla 18).

**Tabla 18.** Alteraciones citogenéticas identificadas en los pacientes con LMA-CRM

Citogenética		Casos/N	
Cariotipo normal		40/102 (39,2%)	
Cariotipo con alteraciones: 62/102 (60,8%)	Citogenética relacionada con SMD: 46/62 (74,2%)	Cariotipo complejo	28/46
		Monosomía 7/del(7q) - -7 (6 casos) - del(7q) (4 casos)	10/46
		Del(5q)	4/46
		i(17q)	2/46
		del(11q)	2/46
		Trisomía 8*	6/16
	Otras alteraciones citogenéticas 16/62 (25,8%)	47,XX,+1[3]/46,XX[17]	1/16
		47,XX,+11[17]/46,XX[3]	1/16
		45,XX,der(7;15)(q10;q10)[5]/46,XX[5]	1/16
		47,XY,+21[18]/46,XY[2]	1/16
		47,XY,+19[10]/46,XY[10]	1/16
		45,XY,-2,add(11)(q22)[9]/46,XY[11]	1/16
		75-80,XXX,inc[20]	1/16
46,XX,t(X;3)(p21;p21)[20]	1/16		
46,XY,ins(1)(p36q32q44)[20]	1/16		
45,XY,t(1;18)(p21;p11.3),-18[10]/46,XY[10]	1/16		

\*En uno de los casos con una trisomía 9 adicional. Abreviaturas: SMD: síndrome mielodisplásico.

En relación con la evaluación del riesgo citogenético, 44/102 (43,1%) casos presentaron cariotipo de riesgo adverso y 58/102 (56,9%) de riesgo intermedio según la clasificación de la ELN (30).

### 1.3. Características moleculares de las LMA-CRM

Se realizó secuenciación del exón 12 de *ASXL1* por Sanger en 80 pacientes con LMA-CRM y estudio de NGS en 47 pacientes, de los que 10 correspondieron al panel de estudio con 19 genes y 37 al panel con 40 genes. En los casos en los que se realizó el panel de NGS de 19 genes todos los pacientes presentaron entre 1 y 4 mutaciones (media de 1,7), y en los que se realizó el panel de 40 genes se detectaron entre 0 y 6 mutaciones por paciente (media de 2,8). En 3/47 (6,4%) casos no se detectaron mutaciones, correspondiendo 2 de estos a LMA-CRM diagnosticadas únicamente por la presencia de displasia multilínea, y el tercero a un paciente con anomalía citogenética relacionada con mielodisplasia.

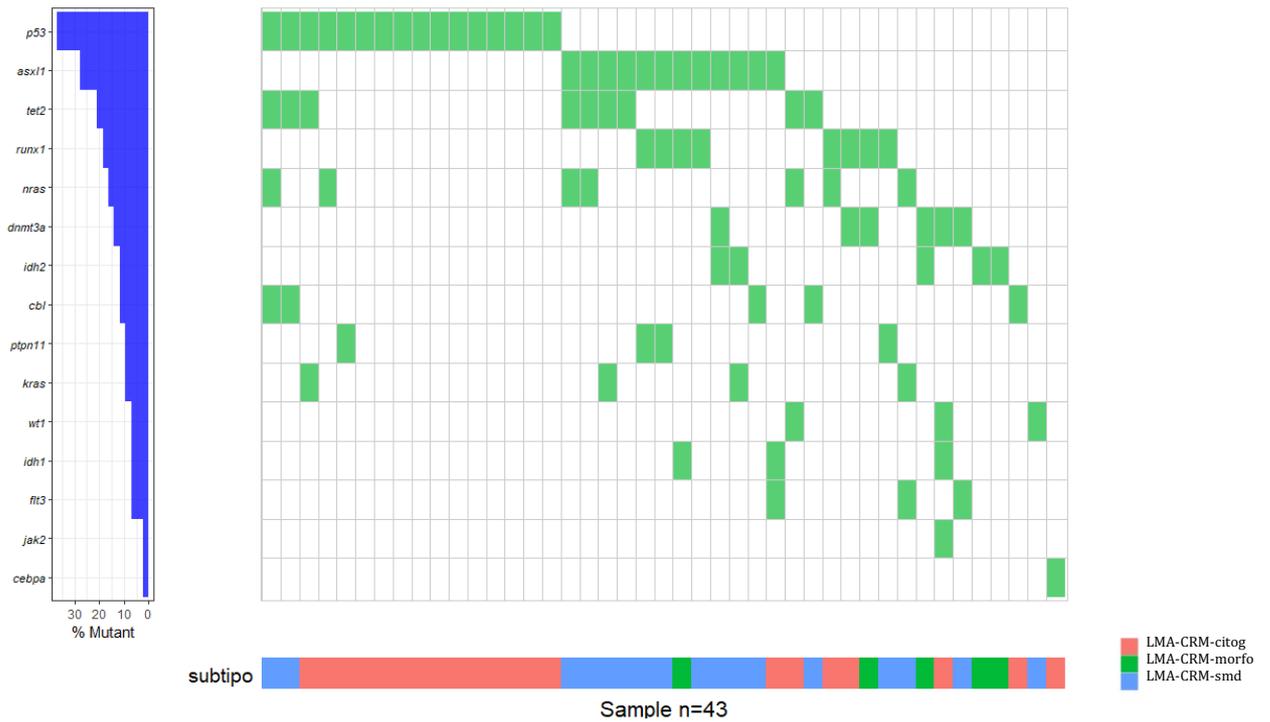
Los genes mutados con mayor frecuencia fueron *TP53* en 16/47 (34%) casos y *ASXL1* en 22/80 (27,5%) casos. Le siguieron en frecuencia *TET2*, mutado en 9/47 (19,1%), *SRSF2* en 7/37 (18,9%), *RUNX1* en 8/47 (17%), *NRAS* en 7/47 (14,9%), *SF3B1* en 5/37 (13,5%), *DNMT3A* en 6/47 (12,8%), *NF1* en 4/37 (10,8%), *IDH2* en 5/47 (10,6%) y *CBL* en 5/47 (10,6%) casos. El resto de las mutaciones detectadas por orden de frecuencia se incluyen en la Tabla 19 junto a la frecuencia que se ha descrito en la literatura para cada una de ellas.

Una representación descriptiva de las mutaciones detectadas mediante NGS en los 47 casos de LMA-CRM secuenciados se muestra en la Figura 17. Incluye los 15 genes que se secuenciaron en los 47 pacientes (comunes en los dos paneles de NGS utilizados). De los 47 casos, 43 mostraron mutaciones en al menos alguno de estos genes (mostrados en el gráfico) y en 4 no se detectaron mutaciones en estos genes (no incluidos en el gráfico), aunque uno de ellos sí las presentaba en el panel ampliado.

**Tabla 19.** Mutaciones detectadas en los pacientes con LMA-CRM

<b>Mutación</b>	<b>Frecuencia detectada Casos/N (%)</b>	<b>Frecuencia descrita* (%)</b>
<i>TP53</i>	16/47 (34%)	16,7-39**
<i>ASXL1</i>	22/80 (27,5%)	18,1-35**
<i>TET2</i>	9/47 (19,1%)	6-15
<i>SRSF2</i>	7/37 (18,9%)	11,9-15,3**
<i>RUNX1</i>	8/47 (17%)	11-17
<i>NRAS</i>	7/47 (14,9%)	17-17,9
<i>SF3B1</i>	5/37 (13,5%)	5
<i>DNMT3A</i>	6/47 (12,8%)	8-10
<i>NF1</i>	4/37 (10,8%)	6-6,9
<i>IDH2</i>	5/47 (10,6%)	11-21
<i>CBL</i>	5/47 (10,6%)	2
<i>KRAS</i>	4/47 (8,5%)	6,9
<i>STAG2</i>	3/37 (8,1%)	7
<i>PHF6</i>	3/37 (8,1%)	2
<i>PTPN11</i>	4/47 (8%)	11,9
<i>WT1</i>	3/47 (6,4%)	4
<i>IDH1</i>	3/47 (6,4%)	4,1-11
<i>FLT3</i>	3/47 (6,4%)	6
<i>U2AF1</i>	2/37 (5,4%)	8,3-17**
<i>EZH2</i>	2/37 (5,4%)	4
<i>BCOR</i>	2/37 (5,4%)	5
<i>JAK2</i>	1/47 (2,1%)	4
<i>CEBPA</i>	1/47 (2,1%)	2
<i>CALR</i>	1/37 (2,7%)	2
<i>PRPF8</i>	1/37 (2,7%)	
<i>SETBP1</i>	1/37% (2,7%)	6**
<i>ZRSR2</i>	1/37 (2,7%)	1

\*Referencias (85,87-91). \*\*Mutaciones descritas con frecuencia significativamente superior en LMA-CRM. Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda; LMA-t: LMA relacionada con el tratamiento; LMA-CRM: LMA con cambios relacionados con mielodisplasia; LMA-NE: LMA no especificada de otra manera; OMS: Organización Mundial de la Salud.

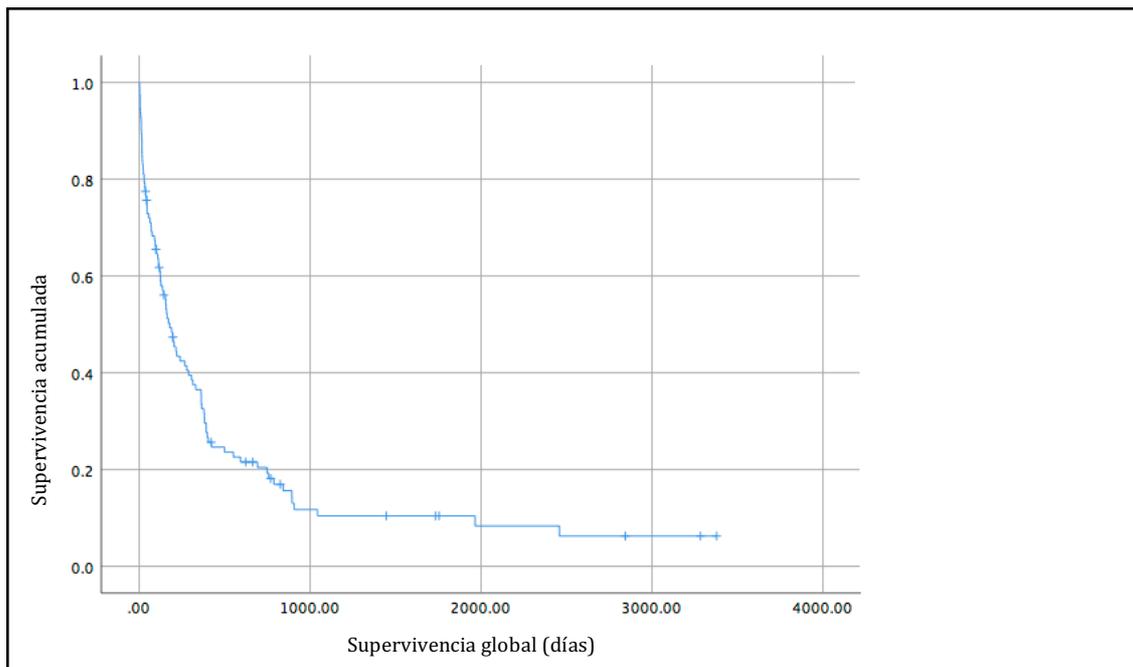


**Figura 17.** Representación descriptiva de las mutaciones detectadas por NGS en los pacientes con LMA-CRM. Se muestran los 43/47 pacientes que presentaban mutaciones en alguno de los 15 genes secuenciados en todos los casos. No se incluyen 4 pacientes que no presentaban mutaciones en estos 15 genes.

#### 1.4. Tratamiento y supervivencia

Del total de la serie, 86 pacientes recibieron tratamiento con quimioterapia (61/86) o azacitidina (25/86), 21 recibieron tratamiento de soporte paliativo, y 4 no llegaron a iniciar tratamiento. En los pacientes evaluables tras la inducción se alcanzó un 50,8% (32/63) de respuestas completas. Se sometieron a un trasplante de progenitores hematopoyéticos 21 pacientes (2 trasplantes autólogos, 10 alogénicos de hermano y 9 alogénicos de donante no relacionado).

La supervivencia global de los 111 casos de LMA-CRM fue: mediana de 178 días, 95% IC (123,1-232,9) (Figura 18). La supervivencia a 2 años fue del 12,6% siendo la media de seguimiento de supervivientes (n=17) de 725 días (37-2823).



**Figura 18.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los 111 pacientes con LMA-CRM.

### 1.5. Diferencias por subgrupos diagnósticos: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo

Para el estudio de las diferencias entre los distintos subgrupos diagnósticos dentro de las LMA-CRM se excluyeron del análisis los 9 casos en los que no se disponía de estudio citogenético (N= 102). La distribución jerarquizada de los pacientes según el criterio diagnóstico de LMA-CRM fue la siguiente:

- 46/102 (45,1%) casos diagnosticados por la presencia de anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (LMA-CRM-citog).
- 29/102 (28,4%) casos diagnosticados por el antecedente de SMD o SMD/NMP (LMA-CRM-smd).
- 27/102 (26,5%) casos con displasia multilínea como único criterio diagnóstico de LMA-CRM (LMA-CRM morfo).

Dentro del grupo de LMA-CRM-citog, 9/46 pacientes también tenían antecedente de SMD o SMD/NMP y 29/46 (63%) mostraban displasia multilínea. Dentro de las LMA-

CRM-smd, se observó displasia multilínea en 20/29 (69%). Las características clínico-biológicas de los tres subgrupos diagnósticos se comparan en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Comparación de las características clínicas y biológicas entre los subgrupos diagnósticos de LMA-CRM: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo

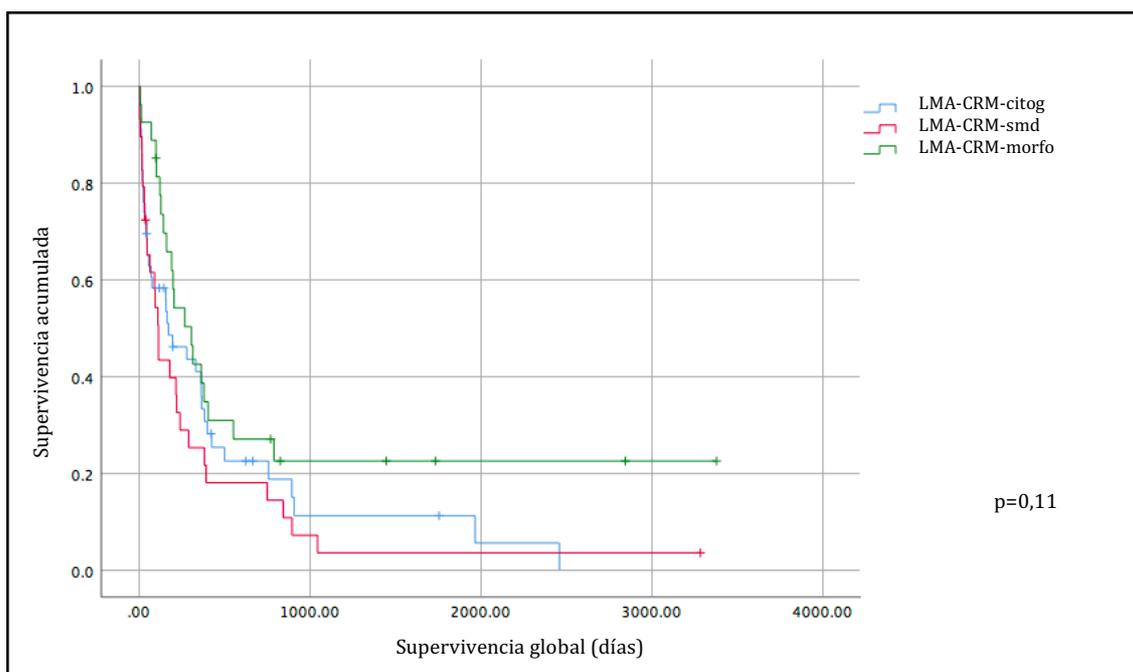
	Subtipo LMA-CRM			p-valor	
	A:LMA-CRM-citog N: 46	B: LMA-CRM-smd N: 29	C: LMA-CRM-morfo N: 27	Global	Post-hoc*
Edad (años), media ±ES	62,3±2,7	72,8±2,1	66,9±2,9	<b>0,02</b>	<b>B&gt;A: 0,02</b>
Sexo (Hombre/Mujer)	22/24	19/10	15/12	0,33	NA
Hemoglobina (g/l), media ±ES	83,6±3,4	81±2,9	83,9±4,1	0,83	NA
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /l), media ±ES	17,1±4,2	45,7±9,1	4,5±0,9	<b>&lt;0,01</b>	<b>B&gt;A: 0,01</b> <b>B&gt;C: &lt;0,01</b>
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l), media ±ES	78,5±8,9	70,5±20,3	90,3±15,7	0,67	NA
Blastos MO (%), media ±ES	55,5±3,4	46,9±4,5	44,1±3,7	0,08	NA
Cariotipo adverso (Si/No)	44/2	0/29	0/27	<b>&lt;0,01</b>	<b>A&gt;B: &lt;0,01</b> <b>A&gt;C: &lt;0,01</b>
Supervivencia global (mediana días, 95% IC)	171 (23,1- 318,9)	113 (83,8- 142,2)	306 (162,4- 449,6)	0,11	NA

\*Solo se muestran los valores de p estadísticamente significativos post-hoc. A: LMA-CRM-citog: LMA-CRM debido a anomalías citogenéticas relacionadas con SMD; B: LMA-CRM-smd: LMA-CRM debido a antecedente de SMD o SMD/NMP; C: LMA-CRM-morfo: LMA-CRM debido solo a displasia multilínea. Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; NA: no aplicable; ES: error estándar de la media; MO: médula ósea; IC: intervalo de confianza.

Entre las variables clínicas se observó una edad significativamente superior en los pacientes con LMA-CRM-smd, frente a LMA-CRM-citog (p=0,02). El recuento leucocitario fue mayor en las LMA-CRM-smd frente a LMA-CRM-citog y LMA-CRM-morfo (p<0,01). No se encontraron diferencias significativas para la cifra de hemoglobina, cifra de plaquetas o porcentaje de blastos en la médula ósea entre los tres subgrupos.

En relación con los hallazgos citogenéticos, la presencia de un cariotipo de riesgo adverso se asoció al grupo de LMA-CRM-citog ( $p < 0,01$ ). En el grupo de LMA-CRM-smd, 23/29 (79,3%) pacientes presentaron un cariotipo normal y 6/29 (20,7%) un cariotipo con alteraciones, siendo en todos los casos de riesgo intermedio y detectándose como la alteración más frecuente la trisomía 8 en 3/6 casos. En el grupo de LMA-CRM-morfo, 17/27 (63%) pacientes presentaron un cariotipo normal y en 10/27 (37%) se encontraron alteraciones, todas de riesgo intermedio, siendo la más frecuente la trisomía 8 en 3/10 casos.

Respecto a la supervivencia global, si bien el grupo de LMA-CRM-morfo mostró una mediana de supervivencia superior a la de los otros dos subgrupos, LMA-CRM-citog y LMA-CRM-smd, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,11$ ) (Tabla 20) (Figura 19).



**Figura 19.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los pacientes con LMA-CRM en función del subgrupo diagnóstico: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo.

En último lugar se compararon las diferencias en el perfil mutacional entre las tres categorías diagnósticas (Tabla 21).

**Tabla 21.** Comparación del perfil mutacional entre los tres subgrupos diagnósticos de LMA-CRM: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo

MUTACIÓN	Subtipo LMA-CRM			p-valor	
	A:LMA-CRM-citog N= 46	B: LMA-CRM-smd N= 29	C: LMA-CRM-morfo N= 27	Global	Post-hoc*
<i>TP53</i> (Si/No)	14/8	2/15	0/8	<b>&lt;0,01</b>	<b>A&gt;B: &lt;0,01</b> <b>A&gt;C: &lt;0,01</b>
<i>ASXL1</i> (Si/No)	1/32	15/9	6/16	<b>&lt;0,01</b>	<b>B&gt;A: &lt;0,01</b> <b>B&gt;C: &lt;0,01</b>
<i>TET2</i> (Si/No)	2/20	7/10	0/8	<b>0,01</b>	<b>B&gt;A: 0,0</b> <b>B&gt;C: 0,04</b>
<i>SRSF2</i> (Si/No)	1/16	4/9	2/5	0,185	NA
<i>RUNX1</i> (Si/No)	2/20	4/13	2/6	0,4	NA
<i>NRAS</i> (Si/No)	3/19	4/13	0/8	0,31	NA
<i>SF3B1</i> (Si/No)	0/17	4/9	1/6	0,05	NA
<i>DNMT3A</i> (Si/No)	2/20	2/15	2/6	0,52	NA
<i>NF1</i> (Si/No)	3/14	1/12	0/7	0,43	NA
<i>IDH2</i> (Si/No)	0/22	2/15	3/5	<b>0,01</b>	<b>C&gt;A: &lt;0,01</b>
<i>CBL</i> (Si/No)	1/21	4/13	0/8	0,09	NA
<i>KRAS</i> (Si/No)	1/21	3/14	0/8	0,23	NA
<i>STAG2</i> (Si/No)	0/17	2/11	1/6	0,27	NA
<i>PHF6</i> (Si/No)	2/15	1/12	0/7	0,65	NA
<i>PTPN11</i> (Si/No)	1/21	3/14	0/8	0,23	NA
<i>WT1</i> (Si/No)	2/20	1/16	0/8	0,67	NA
<i>IDH1</i> (Si/No)	2/20	0/17	1/7	0,39	NA
<i>FLT3</i> (Si/No)	1/21	2/15	0/8	0,49	NA
<i>U2AF1</i> (Si/No)	0/17	2/11	0/7	0,15	NA
<i>EZH2</i> (Si/No)	0/17	1/12	1/6	0,36	NA
<i>BCOR</i> (Si/No)	1/16	1/12	0/7	0,78	NA
<i>JAK2</i> (Si/No)	1/21	0/17	0/8	0,57	NA
<i>CEBPA</i> (Si/No)	1/21	0/17	0/8	0,57	NA
<i>CALR</i> (Si/No)	0/17	1/12	0/7	0,41	NA
<i>PRPF8</i> (Si/No)	1/16	0/13	0/7	0,57	NA
<i>SETBP1</i> (Si/No)	0/17	1/12	0/7	0,41	NA
<i>ZRSR2</i> (Si/No)	1/16	0/13	0/7	0,57	NA

\*Solo se muestran los valores de p estadísticamente significativos post-hoc. A: LMA-CRM-citog: LMA-CRM debido a anomalías citogenéticas relacionadas con SMD; B: LMA-CRM-smd: LMA-CRM debido al antecedente de SMD o SMD/NMP; C: LMA-CRM-morfo: LMA-CRM debido solo a displasia multilinea. Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; NA: no aplicable. Nota: se incluyen 79 de los 80 pacientes secuenciados para *ASXL1* porque se excluyeron de este análisis los pacientes sin cariotipo.

La frecuencia de mutación en *TP53* fue mayor en el grupo de LMA-CRM-citog comparada con LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo ( $p < 0,01$ ). *ASXL1* se encontró mutado con más frecuencia en pacientes con LMA-CRM-smd con respecto a los otros dos subgrupos diagnósticos ( $p < 0,01$ ). La mutación de *TET2* se encontró asociada a las LMA-CRM-smd ( $p = 0,01$ ) frente a LMA-CRM-citog y LMA-CRM-morfo. Y, por último, la mutación en *IDH2* se asoció significativamente a LMA-CRM-morfo frente a LMA-CRM-citog ( $p = 0,01$ ). Para el resto de las mutaciones estudiadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas por subgrupos. La media de genes mutados en los pacientes con LMA-CRM-citog fue de 2 (0-6). La media de genes mutados en los casos con LMA-CRM-smd fue de 3,6 (1-6). La media de genes mutados en los pacientes con LMA-CRM-morfo fue de 1,7 (0-4).

#### **1.6. Grupo control de LMA-NE: características y diferencias con LMA-CRM**

En el grupo control se incluyeron 47 pacientes con LMA-NE. Las características de estos pacientes están resumidas en la Tabla 22.

Brevemente, los pacientes con LMA-NE tenían menor edad que los pacientes con LMA-CRM ( $p < 0,01$ ). Los valores de hemoglobina y de leucocitos al diagnóstico fueron mayores en los casos de LMA-NE ( $p < 0,01$ ); y, se observó mayor porcentaje de blastos tanto en sangre periférica como en médula ósea en LMA-NE frente a LMA-CRM ( $p < 0,01$ ).

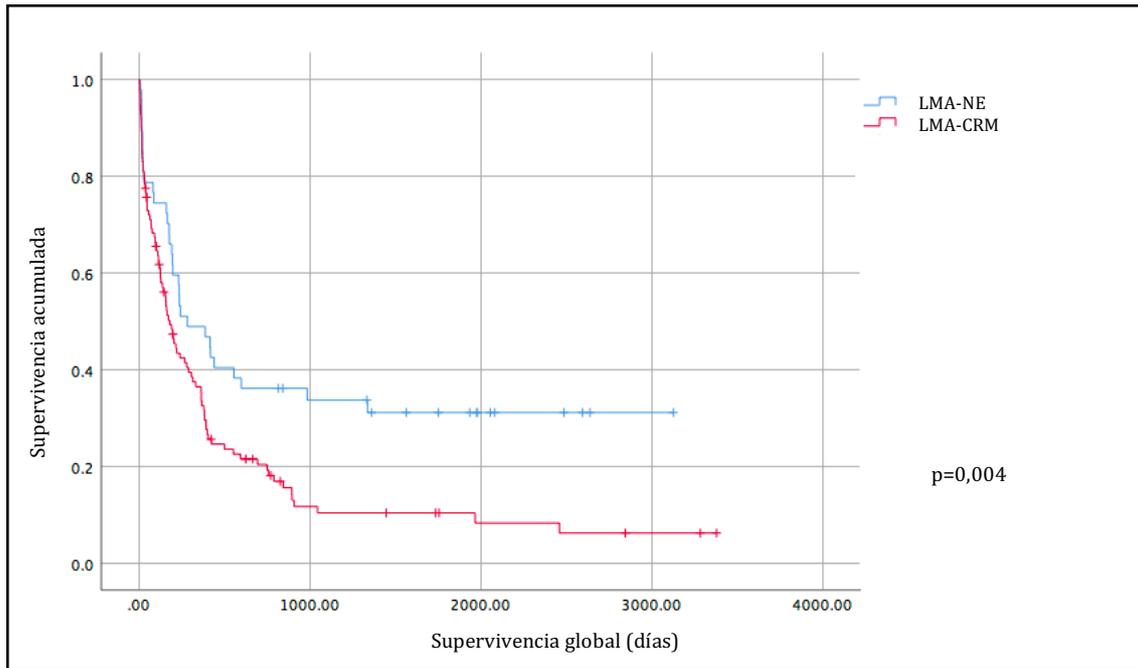
Respecto a los hallazgos citogenéticos, el grupo de LMA-NE no incluyó ningún caso con anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia; 35/42 (83,3%) pacientes presentaron un cariotipo normal y en 7 se observaron otras alteraciones citogenéticas, todas consideradas de riesgo intermedio según la estratificación de la ELN (29,30).

En relación con el pronóstico, la supervivencia global de los casos de LMA-NE (N=47) fue significativamente superior a la del grupo de LMA-CRM (N=111): mediana de 282 días, 95% IC (37,5-526,5) en LMA-NE frente a 178 días 95% IC (123,1-232,9), en LMA-CRM ( $p = 0,004$ ) (Tabla 22) (Figura 20).

**Tabla 22.** Características clínicas y biológicas del grupo control de LMA-NE y comparación con LMA-CRM

Parámetro		LMA-CRM (111)	LMA-NE (47)	p-valor	
Edad (años), media (rango) ±ES		67 (14-89) ±1,5	57,5 (17-86) ±2,4	<0,01	
Sexo (Hombre/Mujer)		63/48	20/27	0,07	
Sangre periférica	Hemoglobina (g/l), media (rango) ±ES	83,2 (42-137) ±1,9	94,4 (66-133) ±2,5	<0,01	
	Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /l), media (rango) ±ES	21 (0,2-205,6) ±3,3	66,9 (1-371,8) ±11,7	<0,01	
	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l), media (rango) ±ES	82,8 (8-577) ±7,9	84,1 (12-353) ±10,9	0,93	
	Blastos (%), media (rango) ±ES	25,1 (0-93) ±2,6	45,6 (0-99) ± 5,6	<0,01	
Blastos en médula ósea (%), media (rango) ±ES		48,9 (7-97) ±2,1	66,1 (10-98) ±3,6	<0,01	
LMA <i>de novo</i>		70/111	47/47	<0,01	
LMA con historia de SMD o SMD/NMP		41/111	0/47	<0,01	
Citogenética	Normal		40/102	35/42	<0,01
	Citogenética relacionada con SMD (N/total)	Cariotipo complejo	28/102	0/42	<0,01
		-7/del(7q)	10/102	0/42	0,03
		-5/del(5q)	4/102	0/42	0,32
		del(11q)	2/102	0/42	0,5
		i(17q)/t(17p)	2/102	0/42	1
Otras alteraciones		16/102	7/42	0,5	
Supervivencia global (mediana días, 95%IC)		178 (123,1-232,9)	282 (37,5-526)	<b>0,004</b>	

Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda; LMA-CRM: LMA con cambios relacionados con mielodisplasia; LMA-NE: LMA no especificada de otra manera; ES: error estándar de la media; SMD: síndrome mielodisplásico; SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa; IC: intervalo de confianza.



**Figura 20.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global del grupo control de LMA-NE comparada con LMA-CRM.



## PARTE II

### ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN EN *ASXL1* A LMA-CRM

#### 2.1. Prevalencia de la mutación en *ASXL1* en pacientes con LMA-CRM y pacientes con LMA-NE

La prevalencia de mutaciones somáticas en *ASXL1* en los pacientes con LMA-CRM fue 22/80 (27,5%) frente a 2/47 (4,2%) en los controles con LMA-NE, (p=0,001).

#### 2.2. Tipos de mutaciones detectadas en el gen *ASXL1*

En los pacientes con LMA-CRM se encontraron cuatro mutaciones de tipo *nonsense* (p.R693\*, p.Q965\*, p.E705\* y p.Q1201\*) y diez mutaciones de tipo *frame-shift* diferentes.

La mutación más frecuente fue p.G646fs\*12, detectada en ocho pacientes con LMA-CRM, seguida de la mutación p.E635fs\*15, detectada en dos pacientes con LMA-CRM y en un control con LMA-NE. Además, cada una de las siguientes mutaciones: p.R620fs\*11, p.A627fs\*8, p.R634fs\*62, p.I641fs\*15, p.G643fs\*15, p.R715fs\*10, p.S770fs\*1 y p.L775fs\*1 fue detectada en un paciente con LMA-CRM respectivamente; y la mutación p.I641fs\*16 en un control con LMA-NE.

Las mutaciones p.I641fs\*15 y p.Q1201\* presentes en dos pacientes con LMA-CRM, y la mutación p.I641fs\*16 observada en un control con LMA-NE, fueron las únicas que no habían sido descritas previamente en la base de datos COSMIC (del inglés, *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*). En la Tabla 23 se detalla la relación de mutaciones detectadas en *ASXL1* en los pacientes con LMA-CRM y los controles con LMA-NE ordenados por la posición del aminoácido mutado.

Adicionalmente, se encontraron varias mutaciones *missense*, pero no han sido consideradas en este trabajo debido a la imposibilidad de discernir entre las variantes con un efecto de pérdida de función en la proteína y las variantes no funcionales.

**Tabla 23.** Lista de pacientes (LMA-CRM) y controles (LMA-NE) con mutaciones en *ASXL1*, ordenados por posición de aminoácido mutado

ID	Cambio de AA	Cambio de cDNA	Diagnóstico	COSMIC ID	Edad	Historia de SMD-SMD/NMP	LMA monocítica/mielomonocítica	Cariotipo	Terapia	Supervivencia global (días)
1	p.R620fs*11	c.1857_1867del10	LMA-CRM	COSM1012902	75	NO	SI	45,XX,der(7;15)(q10;q10)[5]/46,XX[5]	F	788
2	p.A627fs*8	c.1879_1880insG	LMA-CRM	COSM1012908	77	SI	SI	46,XX[20]	A	1043
3	p.R634fs*62	c.1900_1921del22	LMA-CRM	COSM219102	68	NO	NO	47,XY,+8[6]/48,idem,+9[3]/46,XY[11]	F	12
4	p.I641fs*16	c.1922insA	LMA-NE	No reportada	80	NO	SI	46,XY [20]	F	20
5	p.I641fs*15	c.1923_1927del5	LMA-CRM	No reportada	67	NO	SI	46,XX[20]	F	100
6	p.E635fs*15	c.1888_1910del23	LMA-CRM	COSM51200	58	SI	SI	46,XY[20]	A	33
7	p.E635fs*15	c.1899_1921del23	LMA-CRM	COSM41597	81	SI	NO	46,XY[20]	A	894
8	p.E635fs*15	c.1899_1921del23	LMA-NE	COSM41597	86	NO	SI	48,XY,+8,+13[18]/46,XY[2]	P	21
9	p.G643fs*15	c.1926dup	LMA-CRM	COSM4385691	75	SI	NO	47,XY,+8[16]/46,XY[4]	A	86
10	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	86	SI	SI	46,XY[20]	C	46
11	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	78	NO	NO	46,XX[20]	P	71
12	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	74	SI	NO	46,XY[20]	A	381
13	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	78	SI	SI	46,XY[20]	A	748
14	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	73	SI	SI	46,XX[20]	A	385
15	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	49	SI	SI	46,XY[20]	I + C	239
16	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	75	NO	SI	45,XX,der(7;15)(q10;q10)[5]/46,XX[5]	C	788
17	p.G646fs*12	c.1934_1935insG	LMA-CRM	COSM34210	89	NO	NO	46,XY[14]	P	127
18	p.R693*	c.2077C>T	LMA-CRM	COSM51388	71	SI	SI	46,XY[20]	A	178
19	p.E705*	c.2113G>T	LMA-CRM	COSM1012899	36	SI	NO	46,XX,[20]	I + C	3283
20	p.R715fs*10	c.2141delC	LMA-CRM	COSM3719373	87	SI	NO	46,XY[20]	A	113
21	p.S770fs*1	c.2309_2309delC	LMA-CRM	COSM5944120	70	SI	SI	46,XX,+8[20]	A	93
22	p.L775fs*1	c.2324_2324delT	LMA-CRM	COSM53206	79	SI	SI	47,XY,+21[18]/46,XY[2]	A	392
23	p.R965*	c.2893C>T	LMA-CRM	COSM267971	73	SI	SI	46,XY[20]	C	37
24	p.Q1201*	c.3601C>T	LMA-CRM	No reportada	63	SI	SI	46,XX,[8]	I + C	3

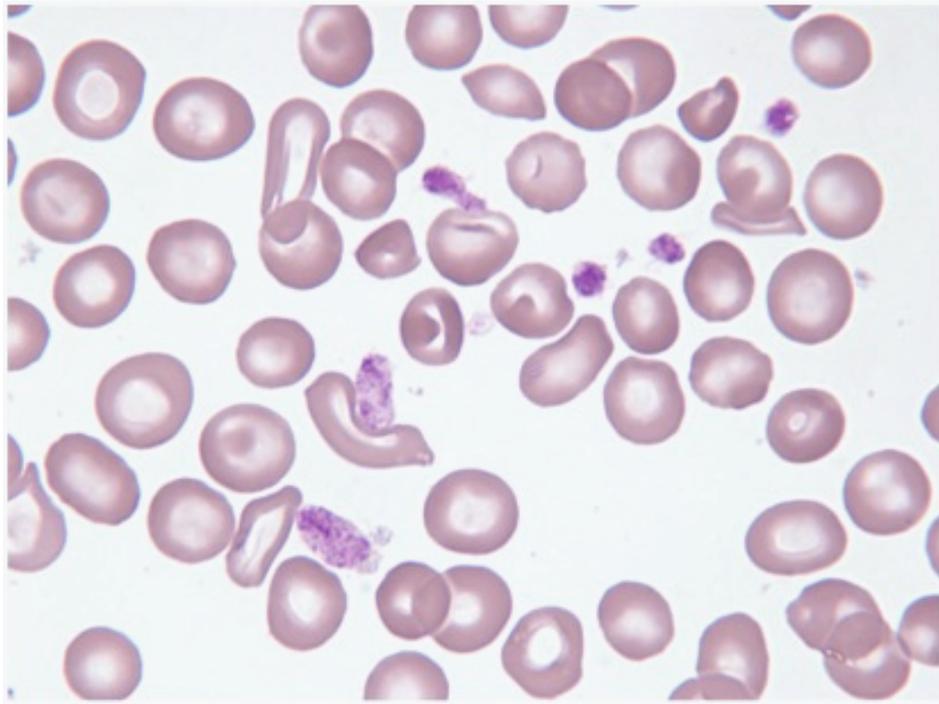
Abreviaturas en la siguiente página

Tabla 23. Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; LMA-NE: LMA no especificada de otra manera; AA: Aminoácido; SMD: síndrome mielodisplásico; SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa; A: azacitidina; F: FLUGA; P: paliativo; C: Ara-C; I: idarrubicina.

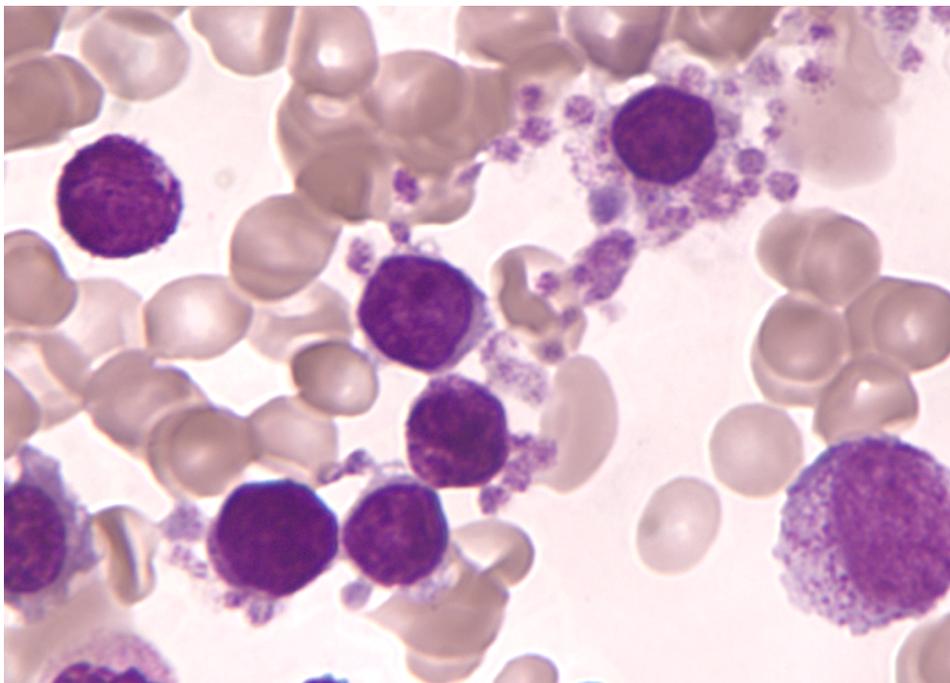
### 2.3. Asociación de la mutación en el exón 12 de *ASXL1* con características clínicas, citomorfológicas y genéticas en LMA-CRM

Los casos de LMA-CRM con mutación en *ASXL1* (*ASXL1*+) fueron predominantemente pacientes con historia previa de SMD o SMD/NMP: 15/22 (68,2 %) casos con SMD o SMD/NMP previos entre los pacientes *ASXL1*+ comparado con 18/58 (31%) casos con SMD o SMD/NMP previos en pacientes sin mutación en *ASXL1* (*ASXL1*-) ( $p=0,005$ ). De los 15 casos con antecedente de SMD o SMD/NMP que tenían mutación en *ASXL1*, 8 eran SMD y 7 eran SMD/NMP. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la edad, ni en relación con parámetros analíticos como la cifra de leucocitos, la cifra de hemoglobina o de plaquetas.

Entre los signos morfológicos de displasia, los pacientes con LMA-CRM *ASXL1*+ presentaron mayor frecuencia de: dismorfias en los hematíes en sangre periférica, 19/19 (100%) en pacientes *ASXL1*+ frente a 41/52 (77,4%) en pacientes *ASXL1*-, ( $p=0,03$ ); dismorfias en las plaquetas en sangre periférica: 13/16 (81,3%) en casos *ASXL1*+ frente a 19/41 (46,3%) en casos *ASXL1*-, ( $p=0,02$ ); y presencia de micromegacariocitos en la médula ósea: 12/17 (70,6%) casos en LMA-CRM *ASXL1*+ frente a 18/45 (40%) en LMA-CRM *ASXL1*-, ( $p=0,04$ ) (Figuras 21 y 22). En el resto de los signos morfológicos de displasia evaluados (serie eritroide: defectos de hemoglobinización, macrocitosis, multinuclearidad, otros defectos nucleares -lobulación/constricciones, puentes internucleares, cambios megaloblásticos-, PAS positividad y sideroblastos en anillo; serie granulocítica: hipogranularidad, hiposegmentación nuclear -pseudo-Pelger-Hüet-, otras alteraciones nucleares -núcleos en espejo/anillo o hipersegmentación-, gigantismo y vacuolas; serie megacariocítica: micromegacariocitos, núcleos hipolobulados, núcleos múltiples separados, megacariocitos pequeños y megacariocitos de talla grande) no se encontraron diferencias en base a la presencia o no de mutación en *ASXL1* (datos no mostrados).



**Figura 21.** Dismorfias de hematíes y plaquetas en sangre periférica. Tinción de MGG x1000. Hematíes con anisopoikilocitosis. Plaquetas grandes e hipogranulares.



**Figura 22.** Micromegacariocitos en médula ósea. Tinción de MGG x1000.

El subtipo morfológico más frecuente en los pacientes con LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> fue monocítico (M5 de la FAB) o mielomonocítico (M4 de la FAB), presente en 14/22 (63,6%) pacientes dentro de las LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> frente a 13/58 (22,4%) en LMA-CRM *ASXL1*<sup>-</sup> ( $p < 0,01$ ).

En relación con los hallazgos citogenéticos, la presencia de mutación en *ASXL1* se asoció con un cariotipo normal: 16/22 (72,7%) casos con cariotipo normal en LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> comparado con 17/57 (29,8%) casos con cariotipo normal en LMA-CRM *ASXL1*<sup>-</sup> ( $p = 0,001$ ). Los seis pacientes con mutación en *ASXL1* que no tenían un cariotipo normal presentaron: trisomía 8 en 3/6 casos, trisomía 21 en 1/6, der(7;15)(q10;q10) en 1/6 y delección (7q) en 1/6 casos. Se observó una asociación negativa de la mutación en *ASXL1* con la presencia de anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia: solo 1/22 (4,5%) pacientes con LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> presentó una anomalía citogenética relacionada con mielodisplasia que fue una delección (7q), frente a 32/57 (56,1%) casos con alteraciones relacionadas con mielodisplasia entre los pacientes con LMA-CRM *ASXL1*<sup>-</sup>, ( $p = 0,001$ ).

Respecto al resto de mutaciones, la mutación en *ASXL1* mostró una correlación negativa con la mutación en *TP53*: 0/12 casos con *TP53* mutado en LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> frente a 16/35 (45,7%) casos con *TP53* mutado en LMA-CRM *ASXL1*<sup>-</sup> ( $p = 0,004$ ); y una asociación positiva con la mutación en *SRSF2*: 4/9 (44%) casos con mutación en *SRSF2* dentro de los casos con LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> frente a 3/28 (3,7%) casos con mutación en *SRSF2* en LMA-CRM *ASXL1*<sup>-</sup> ( $p = 0,04$ ). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con mutaciones en otros genes (datos no mostrados).

Las diferencias observadas entre los pacientes con LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> y LMA-CRM *ASXL1*<sup>-</sup> se resumen en la Tabla 24.

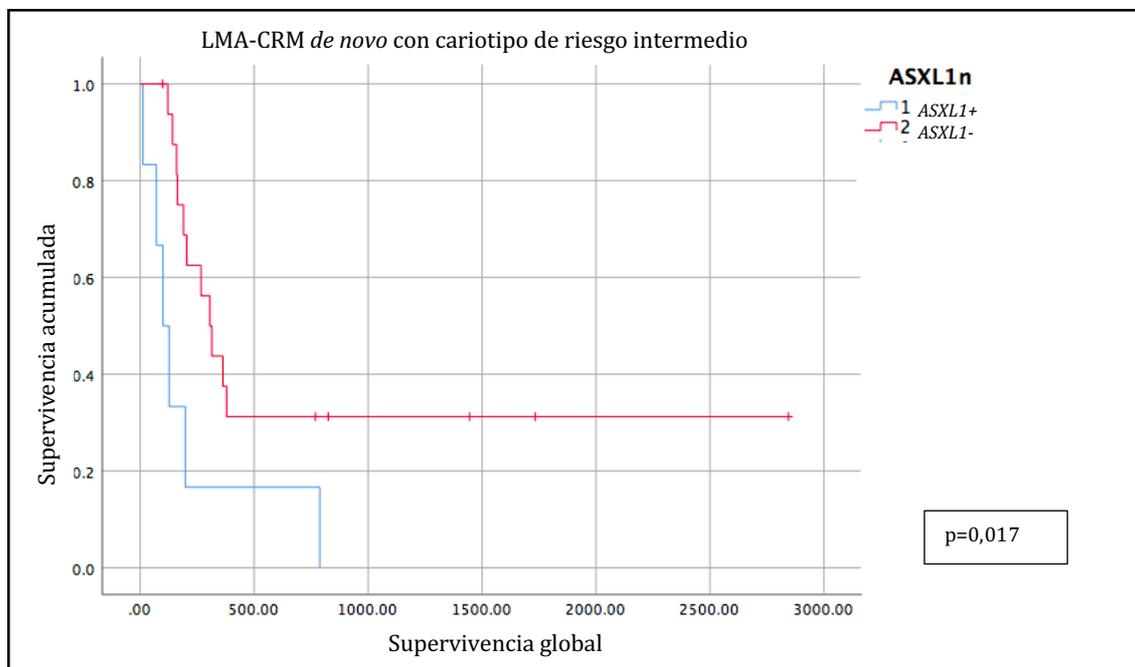
**Tabla 24.** Diferencias entre los pacientes con LMA-CRM *ASXLI+* y LMA-CRM *ASXLI-*

Parámetro	LMA-CRM <i>ASXLI+</i> (N=22)	LMA-CRM <i>ASXLI-</i> (N=58)	p-valor	
Edad (media, años ± ES)	70,5±2,7	67,2± 1,8	0,3	
Historia de SMD o SMD/NMP (casos+/N, %)	15/22 (68,2%)	18/58 (31%)	<b>0,005</b>	
Hemoglobina (g/l media ± ES)	86,9±3,4	84,7±2,9	0,6	
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /l media ± ES)	30,4 ± 7,1	19,5 ± 5	0,2	
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l media ± ES)	57,3 ± 11,8	90,8 ± 12,6	0,1	
Dismorfias en hematíes, SP (casos+/N,%)	19/19 (100%)	41/52 (77,4%)	<b>0,03</b>	
Dismorfias en neutrófilos, SP (casos+/N,%)	17/20 (85%)	35/42 (83,3%)	1	
Dismorfias en plaquetas, SP (casos+/N,%)	13/16 (81,3%)	19/41 (46,3%)	<b>0,02</b>	
Subtipo morfológico monocítico/mielomonocítico (casos+/N, %)	14/22 (63,6%)	13/58 (22,4%)	<b>0,001</b>	
Blastos en MO (% , media ± ES)	42,6 ± 4,7	51,4 ± 2,8	0,1	
Micromegacariocitos en MO (casos+/N)	12/17 (70,6%)	18/45 (40%)	<b>0,04</b>	
Cariotipo normal (N, %)	16/22 (72,7%)	17/57 (29,8%)	<b>0,001</b>	
Anomalías citogenéticas relacionadas con SMD (N, %)	1/22 (4,5%)	32/57 (56,1%)	<b>0,001</b>	
<i>TP53</i> (casos mutados/N)	0/12 (0%)	16/35 (45,7%)	<b>0,004</b>	
<i>SRSF2</i> (casos mutados/N)	4/9 (44%)	3/28 (3,7%)	<b>0,04</b>	
Supervivencia global en LMA-CRM <i>de novo</i> con cariotipo de riesgo intermedio	Mediana, 95% IC	100 (34,3-167,2)	306 (213,9-398,1)	<b>0,017</b>
		N=6		
	HR, 95% IC	3,2 (1,2-8,8)		0,024

Abreviaturas: LMA-CRM: leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; LMA-NE: leucemia mieloide aguda no especificada de otra manera; ES: error estándar de la media; SMD: síndrome mielodisplásico; SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa; SP: sangre periférica; MO: médula ósea; IC: intervalo de confianza; HR: hazard ratio.

Respecto a la supervivencia global, considerando el total de casos secuenciados para *ASXL1* (N=80) no se encontraron diferencias entre los pacientes *ASXL1+* frente a los *ASXL1-*: mediana de supervivencia de 198 días, IC 95% (43,3-352,7, N=22) en LMA-CRM *ASXL1+*, frente a 195 días, IC 95% (127,8-262,2, N=58) en LMA-CRM *ASXL1-*, ( $p=0,9$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas al analizar los casos con citogenética de riesgo intermedio: mediana de supervivencia de 198 días, IC 95% (36,4-359,6; N=21), para los casos con citogenética de riesgo intermedio *ASXL1+*, frente a 204 días, IC 95% (120,2-287,8; N= 26) en los casos *ASXL1-*, ( $p=0,7$ ).

Sin embargo, al seleccionar dentro del grupo con cariotipo de riesgo intermedio los casos de LMA-CRM *de novo*, es decir, excluyendo el antecedente de SMD o SMD/NMP, se observó una supervivencia significativamente inferior en el grupo con mutación en *ASXL1*: mediana de supervivencia de los pacientes con LMA-CRM *de novo* con cariotipo de riesgo intermedio *ASXL1+* de 100 días, IC 95% (32,8-167,2; N=6), frente a 306 días, IC 95% (213,9-398,1; N=17), en los *ASXL1-*, ( $p=0,017$ ); lo que representa un hazard ratio para la mutación en *ASXL1* de 3,2 IC 95% (1,2-8,8), ( $p=0,024$ ) (Tabla 24) (Figura 23).



**Figura 23.** Supervivencia global de los pacientes con LMA-CRM *de novo* con citogenética de riesgo intermedio en función de la presencia de mutación en *ASXL1*.

#### **2.4. Características de los pacientes con LMA-NE con mutación en *ASXL1***

Dentro del grupo control con diagnóstico de LMA-NE, solo dos pacientes tenían una mutación en *ASXL1*. Los dos eran hombres con edades de 80 y 86 años, respectivamente. El primero tenía un recuento de leucocitos de  $30,9 \times 10^9/L$  mientras que el segundo tenía  $26,8 \times 10^9/L$ . Ambos habían sido diagnosticados de LMA mielomonocítica según criterios citomorfológicos e inmunofenotípicos. También compartían una disgranulopoyesis severa (cuantitativamente  $>50\%$ ) en la médula ósea, no habiendo sido evaluables la displasia en las series eritroide y megacariocítica por estar muy reducidas en ambos casos en el momento del diagnóstico. Uno de los pacientes tenía un cariotipo normal y el segundo presentaba trisomías 8 y 13. La supervivencia media de estos pacientes *ASXL1+* (N=2) fue de 21 días, IC 95% (20-22) frente a los 909 días, IC 95% (590-1228) del resto de los pacientes *ASXL1-* de este grupo (N=45), (p=0,01), HR: 6,25 (1,25-31,25), (p=0,025).

## PARTE III

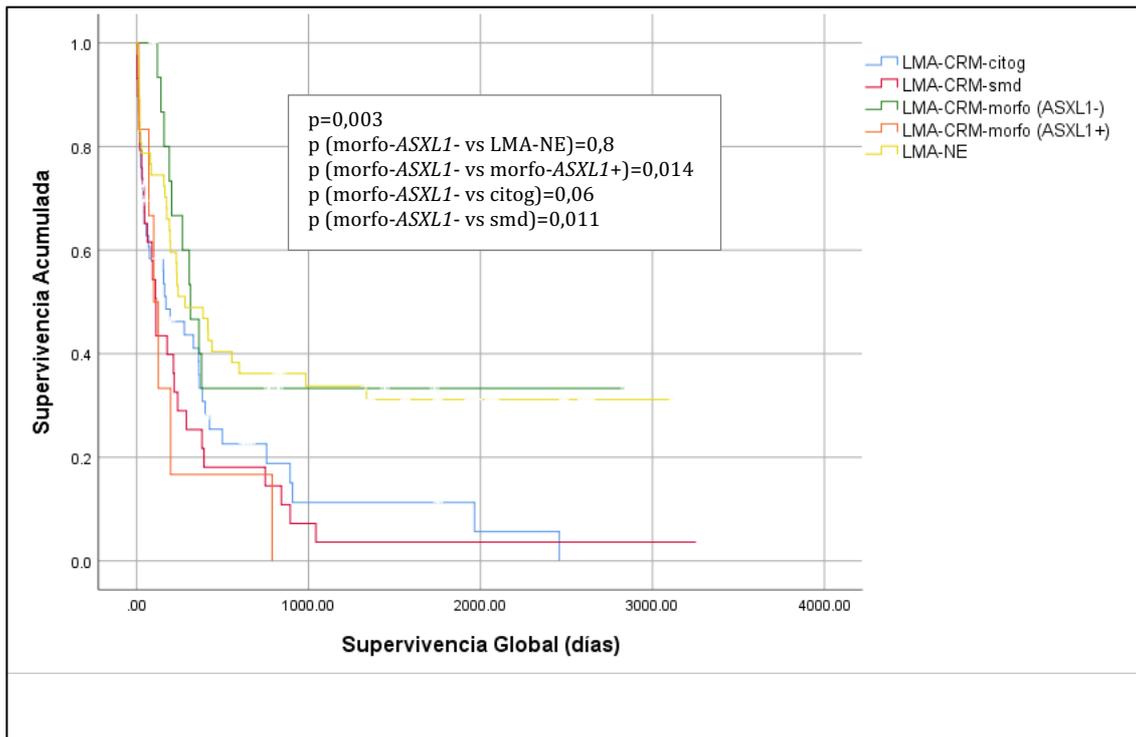
### ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA DISPLASIA

#### 3.1. Evaluación del valor pronóstico independiente de la displasia multilínea

En el primer bloque de resultados, la cohorte de pacientes con LMA-CRM mostró una supervivencia global inferior a la del grupo control con LMA-NE (Figura 20, resultados parte I). En este tercer apartado, el estudio se centra en el subgrupo de pacientes con LMA-CRM diagnosticados solo por la presencia de displasia multilínea (LMA-CRM-morfo, N=27) con el objetivo de evaluar si este criterio diagnóstico de LMA-CRM tiene valor pronóstico independiente. Dentro de las LMA-CRM, este subgrupo mostró una supervivencia ligeramente superior a la de los pacientes con LMA-CRM-citog y LMA-CRM-smd, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 19 resultados parte I). Con esta premisa, y tras haber identificado la mutación en *ASXLI* como una mutación prevalente en LMA-CRM con impacto pronóstico desfavorable en el grupo de pacientes con citogenética de riesgo intermedio y sin antecedente de SMD-SMD/NMP (Figura 23, resultados parte II), se estudió el grupo de LMA-CRM-morfo estratificándolo en función de la presencia o no de mutación en *ASXLI*, y se realizó el mismo análisis para el resto de las mutaciones detectadas con mayor frecuencia.

A) En el caso de la mutación en *ASXLI*, cuando el grupo LMA-CRM-morfo se dividió según su estado mutacional, los pacientes *ASXLI+* (N= 6) mostraron una supervivencia global significativamente inferior a la de los pacientes *ASXLI-* (N= 16) ( $p=0,014$ ) (Figura 24), con una diferencia en la mediana de supervivencia de 100 días (32,8-167,2) frente a 314 días (192,8-435,2) entre los pacientes con y sin mutación en *ASXLI*, respectivamente.

De esta manera, el grupo LMA-CRM-morfo *ASXLI-*, mostró una supervivencia significativamente superior no solo que la de los casos con LMA-CRM-morfo *ASXLI+*, sino también que la de los casos con LMA-CRM-smd [mediana 314 días (192,8-435,2) frente a 113 días (83,8-142,2),  $p$  de Kaplan-Meier =0,01] y que la de los casos con LMA-CRM-citog [mediana 314 días (192,8-435,2) frente a 171 días (23,1-318,9),  $p$  de Kaplan-Meier =0,06]; equiparándose su supervivencia global a la del grupo control con LMA-NE [mediana de 314 días (192,8-435,2) en LMA-CRM-morfo *ASXLI-* frente a 282 días (37,5-526,5) en LMA-NE,  $p$  de Kaplan-Meier =0,8].



**Figura 24.** Diferencias en la supervivencia global entre los pacientes con LMA-CRM y LMA-NE, separando los casos de LMA-CRM en función del criterio diagnóstico y diferenciando dentro del grupo LMA-CRM-morfo los pacientes con y sin mutación en *ASXL1*.

En resumen, la supervivencia global fue similar para los pacientes con LMA-CRM-morfo *ASXL1+*, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-citog, mientras que los pacientes con LMA-CRM-morfo sin mutación en *ASXL1* tuvieron una supervivencia global significativamente mejor que estos tres subgrupos y similar a la de la cohorte control de LMA-NE (Figura 24).

En el resto de las categorías diagnósticas de LMA-CRM (LMA-CRM-citog y LMA-CRM-smd), no se observó que la mutación en *ASXL1* contribuyera a un peor pronóstico, si bien dentro de las LMA-CRM-citog solo se detectó mutación de *ASXL1* en un caso.

B) Respecto a la mutación de *TP53*, ningún caso con LMA-CRM-morfo presentó esta mutación. En el subgrupo con LMA-CRM-smd solo se detectó en 2/17 casos, mientras que entre los pacientes con LMA-CRM-citog se observó en 14/22. Dentro de este último

grupo los pacientes con mutación de *TP53* tuvieron una mediana de supervivencia inferior, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística: mediana de supervivencia de 46 días 95% IC (0-96,3; N=14) frente a 382 días (161,8-602,2; N=8) entre pacientes con y sin mutación de *TP53* respectivamente (p de Kaplan-Meier = 0,22).

C) Este mismo análisis se realizó para el resto de las mutaciones que se habían detectado con mayor frecuencia en LMA-CRM: *RUNX1*, *TET2*, *SRSF2*, *NRAS*, *DNMT3A* y *SF3B1*. En el caso de *TET2* y *NRAS* no había ningún paciente con mutaciones en estos genes dentro del grupo LMA-CRM-morfo y, para el resto de los genes, aunque no se observaron diferencias en términos de supervivencia, los resultados son poco valorables por ser el número de pacientes muy bajo al realizar la estratificación (mutados frente a no mutados) dentro del subgrupo LMA-CRM-morfo (Tabla 25).

**Tabla 25.** Número de casos mutados y no mutados en el grupo de pacientes con LMA-CRM-morfo para *RUNX1*, *TET2*, *SRSF2*, *NRAS*, *DNMT3A* y *SF3B1*

<b>Mutación</b>	<b>Mutados/no mutados</b>
<i>RUNX1</i>	2/6
<i>TET2</i>	0/8
<i>SRSF2</i>	2/5
<i>NRAS</i>	0/8
<i>DNMT3A</i>	2/6
<i>SF3B1</i>	1/6

### **3.2. Asociación de rasgos citomorfológicos de displasia con pronóstico en LMA-CRM**

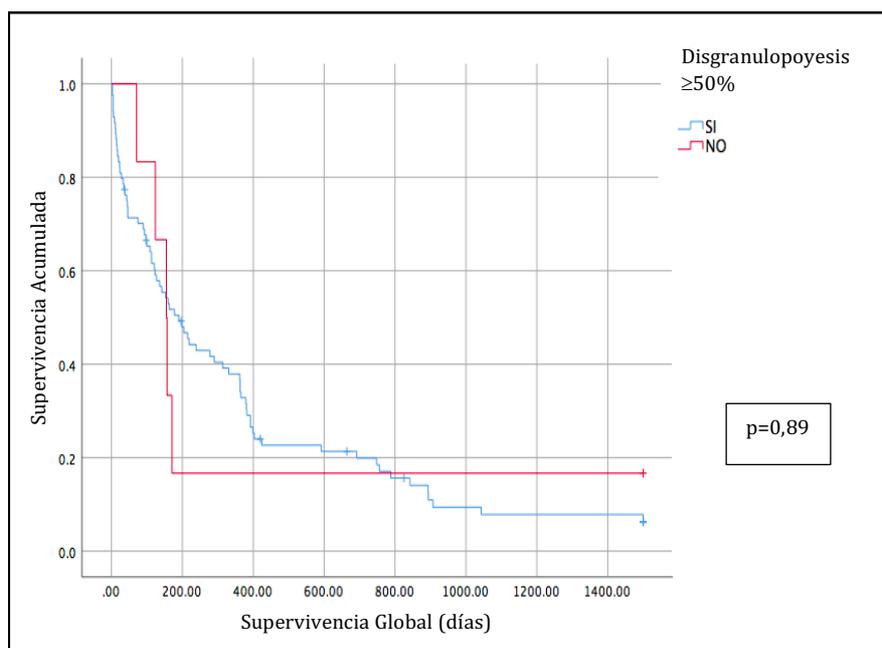
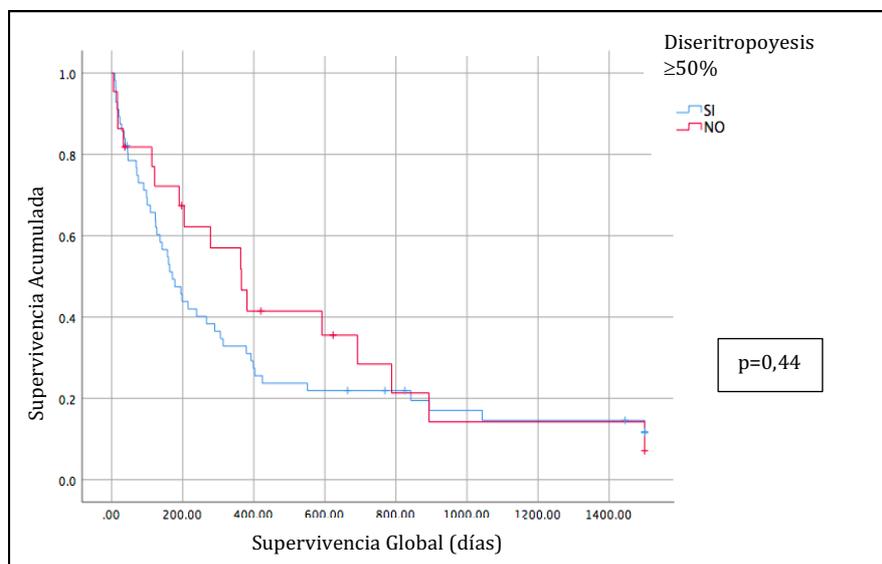
Adicionalmente se estudió si alguna característica citomorfológica individual de displasia mostraba asociación con el pronóstico en los pacientes con LMA-CRM. Para ello se realizó un estudio de variables con impacto en la supervivencia global por el método de Kaplan-Meier. Los signos citomorfológicos de displasia evaluados se recogen en la Tabla

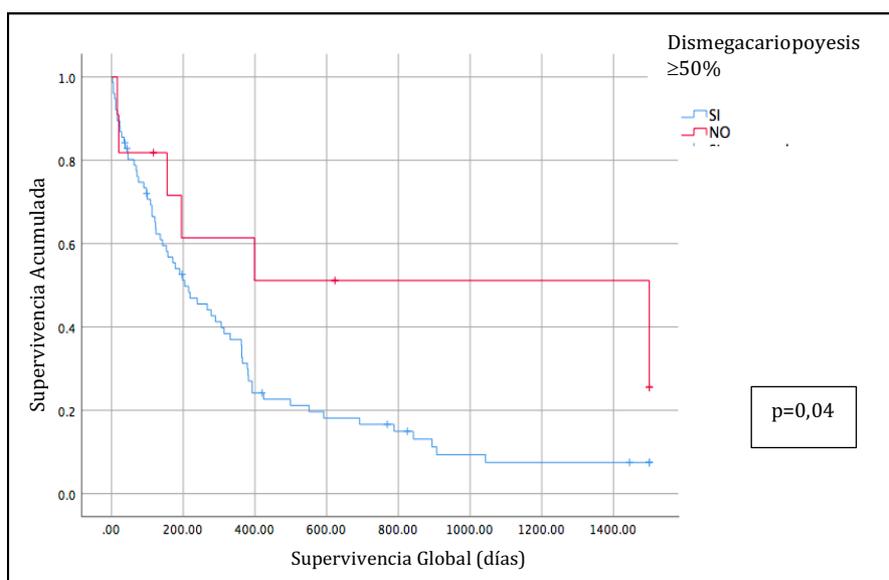
26. En resumen, de manera individual, ninguno de los signos de displasia estudiados demostró tener un impacto significativo en la supervivencia de los pacientes con LMA-CRM.

**Tabla 26.** Impacto en la supervivencia global de signos citomorfológicos de displasia

		Variable	p-valor
Sangre periférica		Dismorfias en hematíes	0,34
		Dismorfias en neutrófilos	0,67
		Dismorfias en plaquetas	0,46
Médula ósea	Serie eritroide	Multinuclearidad	0,92
		Otros defectos nucleares	0,29
		Macrocitosis	0,9
		Sideroblastos en anillo	0,06
		PAS positividad	0,91
	Serie granulocítica	Hipogranularidad	0,34
		Vacuolas	0,09
		Gigantismo	0,58
		Anomalia de pseudo-Pelger-Hüet	0,74
		Presencia de bastones de Auer	0,62
	Serie megacariocítica	Micromegacariocitos	0,31
		Megacariocitos pequeños	0,15
		Talla grande	0,16
		Núcleos hipolobulados	0,8
		Núcleos múltiples separados	0,18
Diseritropoyesis $\geq 50\%$ (N= 81)			0,44
Disgranulopoyesis $\geq 50\%$ (N= 94)			0,89
Dismegacariopoyesis $\geq 50\%$ (N= 89)			<b>0,04</b>
Número de líneas displásicas (0,1,2,3)			0,57
Criterio de displasia multilínea (N=93)			0,46

Asimismo, se analizó el papel de la presencia de diseritropoyesis en porcentaje  $\geq 50\%$ , disgranulopoyesis en porcentaje  $\geq 50\%$  y dismegacariopoyesis en porcentaje  $\geq 50\%$ , encontrando que los pacientes con dismegacariopoyesis  $\geq 50\%$  presentaban una supervivencia global significativamente inferior: mediana de 204 días, IC 95% (106,6-301,4; N=76), frente a 1500 días, IC 95% (426,6-2573,4; N=12) en los casos con y sin dismegacariopoyesis respectivamente ( $p=0,04$ ). Ni la presencia de diseritropoyesis  $\geq 50\%$  ni de disgranulopoyesis  $\geq 50\%$  mostraron ningún impacto en la supervivencia global (Figura 25).





**Figura 25.** Curvas de Kaplan-Meier para la presencia de disgranulopoyesis, diseritropoyesis y dismegacariopoyesis  $\geq$  al 50% en pacientes con LMA-CRM.

Tampoco se observaron diferencias significativas en función de tener una, dos o tres líneas displásicas (Tabla 26). Y, respecto al criterio de displasia multilínea (tener dos o más líneas con displasia en el 50% o más de sus elementos), considerando los casos evaluables, ni en el global de la serie (N=93) (Tabla 26), ni específicamente al analizar los pacientes con LMA-CRM-citog y LMA-CRM-smd, su detección demostró tener un impacto adverso en la supervivencia global: mediana de supervivencia en LMA-CRM-citog y LMA-CRM-smd con displasia multilínea de 178 días IC 95% (97,1-258,9; N=49) frente a 195 días IC 95% (0-999,8, N=8), en los casos sin displasia, (p=0,36).

### 3.3. Otras variables con impacto pronóstico en LMA-CRM

Por último, se realizaron análisis univariante y multivariante con el fin de evaluar otros factores clínicos y genéticos con impacto en la supervivencia global en los pacientes con LMA-CRM.

En el análisis univariante se observó que tanto la edad (HR=1,03;  $p<0,01$ ) como el antecedente hematológico de SMD o SMD/NMP previo (HR=1,77;  $p=0,012$ ) constituían factores de riesgo adverso. Otras variables significativamente asociadas con supervivencia global fueron la cifra de leucocitos (HR=1,02;  $p<0,01$ ), la LDH (HR=1,001;  $p<0,01$ ), el porcentaje de blastos en la médula ósea (HR=1,01;  $p=0,04$ ) y la mutación en *TP53* (HR=2;  $p=0,04$ ), (Tabla 27).

En el análisis multivariante, solo la edad y la mutación de *TP53* mantuvieron un impacto negativo en la supervivencia global de los pacientes con LMA-CRM, con HR de 1,1 ( $p=0,014$ ) en el caso de la edad y 8,4 en el caso de la mutación en *TP53* ( $p=0,03$ ) (Tabla 28).

**Tabla 27.** Análisis univariante de factores con impacto en la supervivencia global en pacientes con LMA-CRM

Variable (N)	HR (95% IC)	p-valor
Edad (111)	1,03 (1,01-1,04)	<b>&lt;0,01</b>
Antecedente SMD-SMD/NMP (111)	1,77 (1,14-2,8)	<b>0,01</b>
LDH (97)	1,001 (1-1,002)	<b>&lt;0,01</b>
Hemoglobina (111)	0,99 (0,99-1,004)	0,25
Leucocitos (111)	1,02 (1,009-1,023)	<b>&lt;0,01</b>
Plaquetas (111)	0,99 (0,99-1,00)	0,08
Blastos (% en MO) (111)	1,01 (1,002-1,023)	<b>0,02</b>
Grupo de riesgo citogenético (102)	1,04 (0,67-1,62)	0,84
<i>ASXL1</i> (mutado/no mutado) (22/58)	0,98 (0,57-1,69)	0,96
<i>TP53</i> (16/31)	2 (1,0 -4)	<b>0,04</b>
<i>RUNX1</i> (8/39)	1,4 (1,6-3,3)	0,39
<i>TET2</i> (9/38)	1,6 (0,7-3,8)	0,24

Abreviaturas: HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza; SMD: síndrome mielodisplásico; SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica mieloproliferativa; MO: médula ósea.

**Tabla 28.** Análisis multivariante de factores con impacto en la supervivencia global en pacientes con LMA-CRM

Variable (N)	HR (95% IC)	p-valor
Edad (111)	1,1 (1,02 – 1,19)	<b>0,01</b>
Antecedente SMD-SMD/NMP (111)	1,89 (0,56 -6,38)	0,31
LDH (97)	1,002 (1 – 1,004)	0,02
Hemoglobina (111)	1,017 (0,98 – 1,05)	0,34
Leucocitos (111)	1,003 (0,97 – 1,03)	0,84
Plaquetas (111)	1,005 (0,99 – 1,02)	0,33
Blastos (% en MO) (111)	1,001 (0,97 – 1,03)	0,97
Grupo de riesgo citogenético (102)	0,92 (0,24 – 3,63)	0,91
<i>ASXL1</i> (mutado/no mutado) (22/58)	0,78 (0,16 – 3,89)	0,77
<i>TP53</i> (16/31)	8,4 (1,16 – 62,5)	<b>0,03</b>
<i>RUNX1</i> (8/39)	1,49 (0,35 – 641)	0,59
<i>TET2</i> (9/38)	0,42 (0,06 – 3,08)	0,39

Abreviaturas: HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza; SMD: síndrome mielodisplásico; SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica mieloproliferativa; MO: médula ósea.

# **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### PARTE I: CARACTERÍSTICAS CITOMORFOLÓGICAS, CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES DE LOS PACIENTES CON LMA-CRM AL DIAGNÓSTICO

Las leucemias mieloides agudas con cambios relacionados con mielodisplasia constituyen una categoría de LMA que se introdujo por primera vez en la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS de 2001 con la denominación de LMA con displasia multilinea (16). Es un grupo que supone un porcentaje muy importante de las LMA del adulto, en algunas series de hasta el 48% (61). La base inicial de su definición fue agrupar aquellas LMA que, de manera similar a los SMD, se caracterizaban por la presencia de rasgos de mielodisplasia, compartiendo también con estos el tipo de alteraciones citogenéticas. Esta categoría se ha mantenido desde su creación, incorporándose modificaciones tanto en su denominación como en su definición en cada una de las actualizaciones que la OMS ha realizado de la clasificación de las LMA para, en la revisión de 2017, agrupar las LMA que debutaban con displasia multilinea y/o presencia de anomalías citogenéticas relacionadas con SMD, y/o que provenían de un SMD o un SMD/NMP (8).

Comenzando por las características citomorfológicas, este es un tipo de leucemia en el que la presencia de mielodisplasia es un rasgo habitual. En la serie de 111 casos de LMA-CRM estudiados en el presente proyecto, un 76,6% presentaba displasia multilinea, porcentaje cercano al 80% descrito en la serie de Xu y colaboradores (63). Y esta no solo se observa en los pacientes diagnosticados exclusivamente por criterio citomorfológico, sino que afecta al 63% de los casos con LMA-CRM-citog y al 69% de los casos con LMA-CRM-smd. Pese a ello, son pocas las publicaciones en las que se describe el tipo de alteraciones citomorfológicas más frecuentemente observadas. En este estudio, la mayoría de los casos correspondieron a LMA con maduración (subtipo morfológico M2 de la FAB), y la línea hematopoyética afectada en un mayor número de pacientes (con dismorfias en porcentaje  $\geq 50\%$  de las células) fue la granulocítica. En la médula ósea los signos de displasia observados con mayor frecuencia fueron: en la serie eritroide (excluyendo los defectos citoplasmáticos que estaban presentes de manera generalizada), la macrocitosis y los defectos nucleares (tipo lobulación/constricciones, puentes internucleares, cambios megaloblásticos); en la serie granulocítica, la hipogranularidad;

y en la serie megacariocítica, el tamaño pequeño y las formas hipolobuladas (observadas con frecuencia similar), seguidas por los micromegacariocitos. Estos hallazgos se aproximan a los reportados por Weinberg y colaboradores (84), que describieron como alteración más habitual en la serie eritroide las irregularidades en el núcleo, en la serie granulocítica la hipogranularidad, y en la megacariocítica los micromegacariocitos y las formas con núcleos separados (como aclaración en este trabajo no se recogió el tamaño pequeño entre los signos de displasia de los megacariocitos). Asimismo, coincidiendo con la serie de Weinberg, donde se describe un 17% de casos sin hematopoyesis suficiente para valorar la displasia, objetivamos un 16,2% de casos en los que la displasia multilínea no fue evaluable. Con respecto a los hallazgos en sangre periférica, si bien estos no constituyen un criterio diagnóstico de LMA-CRM, encontramos que la presencia de dismorfias en sangre es también habitual, observándose con frecuencia en hematíes (86,1% de los casos), neutrófilos (79,5% de los casos) y plaquetas (54,3% de los casos).

Respecto a las alteraciones citogenéticas, un 45,1% de los casos de la serie presentaron anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia, siendo las más frecuentes el cariotipo complejo y las alteraciones cromosómicas en desequilibrio afectando a los cromosomas 7 y 5, concretamente -7/del(7q) y del(5q). Ninguno de los casos de la serie presentó alteraciones en equilibrio de las consideradas diagnósticas de esta categoría según la OMS de 2017 (48). Estos hallazgos coinciden con lo descrito de manera generalizada en LMA-CRM (48,62,63,73,74,85). El perfil molecular de las LMA-CRM también se diferencia del observado en otros subtipos de LMA, habiéndose reportado una alta prevalencia de mutaciones en *TP53* y *ASXL1* (85,87-90). En nuestra serie, estas fueron las alteraciones detectadas con mayor frecuencia, identificándose un 34% de casos con mutación en *TP53* y un 27,5% de casos con mutación en *ASXL1*. El resto de las mutaciones observadas por orden de frecuencia fueron *TET2* (19,1%), *SRSF2* (18,9%), *RUNX1* (17%), *NRAS* (14,9%), *SF3B1* (13,5%), *DNMT3A* (12,8%), *NF1* (10,8%), *IDH2* (10,6%) y *CBL* (10,6%). De estas, la mutación en *SRSF2*, también ha mostrado tener una frecuencia significativamente superior en LMA-CRM frente a otros subtipos de LMA (87,89,91); y las mutaciones en *SRSF2*, *SF3B1* y *ASXL1* se han asociado a LMA secundarias a SMD o SMD/NMP (93).

Por último, en cuanto al antecedente de SMD o SMD/NMP, en esta serie fueron más frecuentes los casos diagnosticados *de novo* (63,1%) que como progresión de un SMD o un SMD/NMP previo (36,9%), dato que concuerda con lo publicado en la literatura (56,62,76).

En relación a las diferencias observadas en función del criterio diagnóstico de LMA-CRM (LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo), observamos que los pacientes diagnosticados como progresión de un SMD o un SMD/NMP presentaron una edad superior a la de los casos con LMA-CRM-citog, así como una cifra de leucocitos más elevada que la de los pacientes con LMA-CRM-citog y LMA-CRM-morfo. Tanto la presencia de un cariotipo de riesgo adverso como de mutaciones en *TP53* se asociaron de manera significativa al grupo de LMA-CRM-citog. Las mutaciones en *ASXL1* y *TET2* se asociaron significativamente al grupo con LMA-CRM-smd y las mutaciones en *IDH2* al grupo de LMA-CRM-morfo. De todos estos factores es reseñable que tanto la edad como la leucocitosis son variables que se han asociado a un peor pronóstico en pacientes con LMA, e igualmente, la presencia de un cariotipo de riesgo adverso, así como de mutaciones en *TP53* y *ASXL1* constituyen factores de riesgo desfavorable (18,19,21,22,26,35,148), presentándose mayoritariamente estas características en los grupos de LMA-CRM-citog y LMA-CRM-smd.

La supervivencia global de los 111 pacientes con LMA-CRM fue significativamente inferior a la del grupo control con LMA-NE, dato que concuerda con lo publicado en estudios previos cuando se analiza de manera global el conjunto de pacientes con LMA-CRM (56,61,63,94). Al analizar en nuestra serie los diferentes subgrupos diagnósticos dentro de las LMA-CRM (LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo) no se observaron diferencias significativas en cuanto a supervivencia global, si bien esta fue algo mayor en los pacientes con LMA-CRM-morfo (sobre este punto se profundiza en el último apartado de la discusión).



## PARTE II

### ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN EN *ASXL1* A LMA-CRM

Las mutaciones en el exón 12 de *ASXL1* de tipo *nonsense* y *frame-shift* dan lugar a una proteína truncada en el homeodominio PHD carboxi-terminal. Estas mutaciones de pérdida de función se han asociado con diferentes tipos de neoplasias mieloides, sugiriendo un papel de la pérdida de *ASXL1* en la leucemogénesis y, de manera general están ligadas a un pronóstico desfavorable. En LMA se ha descrito una frecuencia de mutaciones en *ASXL1* que varía entre el 5,3 y el 25% de los casos según las series (131,141-145), mientras que, específicamente en LMA-CRM se detecta hasta en el 35% de los pacientes (87,88). La búsqueda de características clínico-biológicas asociadas a la presencia de esta mutación en LMA se ha abordado en diferentes estudios con resultados variables, en parte posiblemente debido a las diferentes cohortes de pacientes analizadas (88,142,144). En esta segunda parte de la tesis el estudio se centra en evaluar la asociación de la mutación en *ASXL1* a LMA-CRM y en la identificación de características asociadas a la presencia de esta mutación en este grupo de pacientes.

Los resultados obtenidos confirman una frecuencia de mutaciones en *ASXL1* en los pacientes con LMA-CRM significativamente superior a la detectada en LMA-NE: 27,5% de casos con mutación en *ASXL1* en LMA-CRM frente a 4,2% en LMA-NE ( $p=0,001$ ). La mayoría de las mutaciones encontradas fueron mutaciones de tipo *frame-shift*, en 20 pacientes, mientras que solo en 4 casos se detectaron mutaciones de tipo *nonsense*. Tres de estas mutaciones no habían sido descritas previamente en la base de datos COSMIC (p.I641fs\*15, p.I641fs\*16 y p.Q1201\*). La mutación más frecuente fue p.G646fs\*12, detectada en 8 pacientes con LMA-CRM, que es la mutación que se ha descrito con mayor prevalencia en las neoplasias mieloides (122,141).

Al comparar los pacientes con LMA-CRM con mutación en *ASXL1* frente a los no mutados, observamos algunas diferencias significativas. Dentro de las LMA-CRM, las mutaciones en *ASXL1* se asociaron principalmente con el antecedente de SMD o SMD/NMP. Esta asociación se ha reportado previamente en LMA (144,145), si bien, concretamente en el estudio de Devillier y colaboradores, centrado en LMA-CRM (88),

no observaron esta correlación. En los SMD y las LMMC, la presencia de mutaciones en *ASXL1* se ha relacionado con menor tiempo de transformación a LMA (133,135). Otras de las características que en diferentes series se han asociado a la presencia de mutación de *ASXL1* en LMA son la edad avanzada, la leucocitosis y un menor porcentaje de blastos en la médula ósea (142,144,145). Los pacientes con LMA-CRM *ASXL1*+ estudiados en nuestra serie tenían más edad, una cifra de leucocitos más elevada, y un porcentaje de blastos en la médula ósea inferior a los pacientes con LMA-CRM *ASXL1*-, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Entre las características citomorfológicas, la mutación en *ASXL1* se asoció a casos con diferenciación monocítica y mielomonocítica (subtipos M5 y M4 de la FAB). Además, encontramos diferencias entre los pacientes con LMA-CRM *ASXL1*+ frente a los *ASXL1*- respecto a determinados signos morfológicos de displasia, destacando la mayor frecuencia de micromegacariocitos en la médula ósea en los pacientes *ASXL1*+. Los casos con *ASXL1* mutado también presentaron en mayor número dismorfias en los hematíes y las plaquetas en la sangre periférica. A este respecto, si bien en el trabajo de Devillier y colaboradores (88) se estableció la asociación de la mutación *ASXL1* con una mayor presencia de disgranulopoyesis en pacientes con LMA-CRM, no hemos encontrado referencias sobre la relación de esta mutación con signos específicos de displasia como la presencia de micromegacariocitos. A pesar de que el número de pacientes de esta serie es limitado, la mayor presencia de algunos signos morfológicos de displasia en los casos *ASXL1*+ frente a los *ASXL1*- podría apoyar el posible papel de esta mutación como marcador molecular asociado a mielodisplasia (88,127).

En relación con los hallazgos citogenéticos y moleculares, la mutación en *ASXL1* se ha asociado previamente con la ausencia de anomalías citogenéticas relacionadas con SMD y con un cariotipo de riesgo intermedio en pacientes con LMA-CRM (88). Además, en LMA se ha vinculado con cariotipo normal y con la presencia de determinadas alteraciones como la trisomía 8 y alteraciones en el cromosoma 11 (131,142,144). En la serie estudiada, confirmamos la asociación de la mutación de *ASXL1* con un cariotipo normal, detectándose hasta en el 48,5% de los pacientes con LMA-CRM y cariotipo normal mutaciones en *ASXL1*. De seis pacientes *ASXL1*+ que tenían alteraciones en el cariotipo, tres correspondían a trisomías 8. En el caso de las alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia la asociación fue negativa: solo un paciente *ASXL1*+

presentó una alteración relacionada con SMD [del(7q)], y en ningún caso la mutación se presentó asociada a un cariotipo complejo, lo que podría sugerir que ambos hallazgos pudieran ser mutuamente excluyentes. Tampoco se observó ningún caso de LMA-CRM *ASXLI*<sup>+</sup> con mutación de *TP53*. Con respecto a mutaciones en otros genes, solo se encontró asociación positiva de la mutación en *ASXLI* con mutaciones en *SRSF2*.

La observación de estas características vinculadas a la presencia de la mutación *ASXLI* en LMA-CRM, como el antecedente de SMD o SMD/NMP, el cariotipo normal o determinados signos morfológicos de displasia como los micromegacariocitos, podría ser de utilidad para anticipar el estado mutacional de *ASXLI* en este grupo de pacientes.

Centrándonos en el valor pronóstico de *ASXLI*, en el trabajo de Devillier y colaboradores que incluía 125 pacientes con LMA-CRM, la presencia de esta mutación se asoció globalmente a una menor tasa de remisiones completas y, dentro del grupo de riesgo citogenético intermedio, a una menor supervivencia global a dos años (88). En nuestra serie solo se observaron diferencias en términos de supervivencia global, entre los casos de LMA-CRM *ASXLI*<sup>+</sup> frente a LMA-CRM *ASXLI*<sup>-</sup> tras excluir las alteraciones citogenéticas de riesgo adverso y el antecedente de SMD o SMD/NMP. En este subgrupo de pacientes (LMA-CRM *de novo* con cariotipo de riesgo intermedio) la mutación en *ASXLI* sí mostró impacto pronóstico, presentado los pacientes con mutación una supervivencia global significativamente inferior a la de los pacientes sin mutación (HR=3,2 p=0,024). Es de destacar que, en nuestra cohorte, a diferencia de la de Devillier publicada en 2015, se excluyeron los casos con mutación de *NPM1* y mutación bialélica de *CEBPA* en ausencia de anomalías citogenéticas relacionadas con SMD, siguiendo las recomendaciones de la OMS de 2017. Estos son pacientes de pronóstico favorable y normalmente *ASXLI* negativos. En cualquier caso, es posible que sea necesario incluir un mayor número de pacientes para confirmar estas diferencias.

Finalmente, y aunque hay solo dos pacientes *ASXLI*<sup>+</sup> en el grupo control de LMA-NE, observamos que estos presentaban algunas características comunes con los pacientes con LMA-CRM *ASXLI*<sup>+</sup>, destacando el subtipo morfológico mielomonocítico y la presencia de leucocitosis en ambos. Los dos pacientes con LMA-NE *ASXLI*<sup>+</sup> compartían la

presencia de disgranulopoyesis severa, afectando a más del 50% de los elementos de la serie granulocítica en el aspirado medular. Coincidían también ambos en que la displasia en las otras líneas hematopoyéticas no había sido evaluable por estar escasamente representadas al diagnóstico. Los dos pacientes tuvieron una supervivencia corta. Estas características comunes llevan a plantear la posibilidad de que estos dos pacientes con LMA-NE y mutación en *ASXL1* pudieran estar erróneamente categorizados, estando más cercanos estos casos a las LMA-CRM.

En conjunto todos estos hallazgos nos permiten sugerir el posible papel de la mutación en *ASXL1* como marcador molecular subrogado de LMA-CRM, cuya detección podría facilitar el diagnóstico de los pacientes dentro de este grupo, especialmente en ausencia de otros criterios diagnósticos de LMA-CRM, como en los casos sin alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia, en aquellos en los que no se ha identificado un antecedente previo de SMD o SMD/NMP, o cuando es difícil la evaluación de la displasia.

Esta hipótesis y resultados, publicados en el artículo “*ASXL1* mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype” (Prats-Martín y colaboradores, Cancer Medicine, 2020), están en consonancia con el cambio propuesto recientemente por la OMS en la definición de las LMA-CRM. En la quinta edición de la clasificación de la OMS, publicada como artículo en junio de 2022 (151) y aún pendiente de su publicación definitiva como libro azul, se introducen una serie de modificaciones en la categoría de LMA-CRM, que pasa a denominarse ahora LMA relacionada con mielodisplasia (LMA-RM). Entre otros, destaca la incorporación de un panel de ocho mutaciones que pasan a ser definitorias de LMA-RM y que se incorporan como criterios diagnósticos de esta categoría. Entre estas mutaciones se encuentra *ASXL1*. El resto de las mutaciones incluidas son *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *EZH2*, *BCOR* y *STAG2*. Estas mutaciones provienen del estudio de Lindsley y colaboradores (93) en el que se identificaron como mutaciones altamente específicas de LMA secundarias. En el anexo 1 se incluye la nueva definición de LMA-RM según la OMS de 2022 y los criterios actuales para su diagnóstico. En el anexo 2 se describe la clasificación de las LMA de la OMS de 2022.

Coincidiendo con la clasificación de la OMS de 2022, se ha publicado además la Clasificación de Consenso Internacional (ICC, por sus siglas en inglés *International Consensus Classification*) (161) en la que un grupo de expertos, muchos de ellos implicados en ediciones anteriores de la OMS, desarrollan una clasificación alternativa que presenta algunas diferencias con la OMS. En la ICC se establece una nueva categoría de LMA denominada LMA con mutaciones génicas relacionadas con mielodisplasia definida por la presencia de mutaciones, entre las que también se incluye *ASXL1*. El resto de mutaciones definitorias de esta categoría son *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, y *ZRSR2*. La ICC, a diferencia de la OMS, separa este grupo con mutaciones relacionadas con mielodisplasia del de las LMA con alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia y de un tercer subtipo de LMA de nueva creación con mutaciones en *TP53*, desglosando así la categoría clásica de las LMA-CRM que quedaría eliminada como tal. La clasificación de las LMA de la ICC, incluidos los cambios que esta introduce en relación a la categoría previa de LMA-CRM, se describen en el anexo 3.



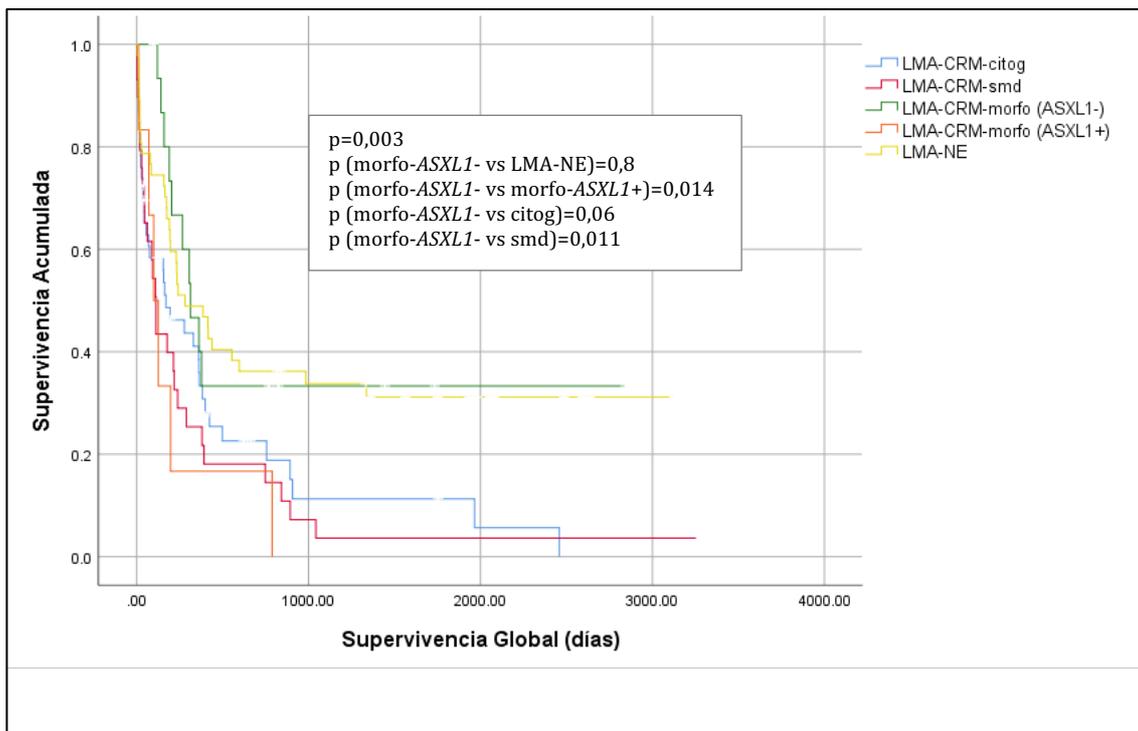
### PARTE III

#### ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA DISPLASIA

En la clasificación de las LMA de la OMS, la identificación de anomalías citogenéticas recurrentes y de determinadas mutaciones somáticas permite clasificar las leucemias en grupos específicos que comparten características biológicas y un pronóstico similar. Sin embargo, las LMA-CRM constituyen un grupo heterogéneo cuyo diagnóstico además de en alteraciones citogenéticas se ha sustentado en criterios clínicos (antecedente de SMD o SMD/NMP) y citomorfológicos (presencia de displasia multilínea) (48). Esta categoría se estableció bajo la premisa de que estos criterios agrupaban casos con características similares y pronóstico adverso (48). Sin embargo, si todos los pacientes con LMA-CRM comparten un pronóstico análogo independientemente del criterio de diagnóstico, es algo que ha sido muy cuestionado desde la definición de esta entidad. En particular, numerosos estudios han establecido el impacto pronóstico negativo tanto del perfil citogenético como de la historia previa de SMD o SMD/NMP (62,63,76,85,94). Sin embargo, el valor pronóstico independiente de la displasia multilínea en los pacientes con LMA-CRM ha sido muy discutido (56-59,61,62,67,76,85,94). Por otro lado, la generalización de los estudios de NGS ha permitido la identificación de mutaciones frecuentes en LMA-CRM, contribuyendo a un mejor conocimiento de esta categoría; algunas, como *TP53* y *ASXL1*, con relevancia pronóstica (87-89,93). Concretamente en la segunda parte de resultados de esta tesis se muestra el valor pronóstico de la mutación de *ASXL1* en los pacientes con LMA-CRM con cariotipo de riesgo intermedio una vez excluido el antecedente de SMD o SMD/MPN. En esta tercera parte, el estudio se centra en evaluar el valor pronóstico de la displasia multilínea, en ausencia de otras variables asociadas al riesgo en LMA-CRM, como el antecedente de SMD, las alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia, y nuevos factores de riesgo identificados, como las alteraciones moleculares y específicamente la mutación en *ASXL1*. Para ello, centramos el estudio en el grupo de pacientes diagnosticados exclusivamente por criterio citomorfológico (LMA-CRM-morfo), considerando la posible influencia de las mutaciones en el pronóstico de este subgrupo.

De manera similar a lo que se ha descrito en estudios previos (56,61,63,94), en la serie presentada, la supervivencia global del conjunto de pacientes con LMA-CRM fue inferior

a la de los pacientes del grupo control con LMA-NE [mediana de 178 días 95% IC (123,1-232,9) en pacientes con LMA-CRM, frente a 282 días, 95% IC (37,5-526,5) en pacientes con LMA-NE;  $p=0,004$ ]. Las diferentes categorías diagnósticas dentro de las LMA-CRM: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia global en nuestra serie. Ambos hallazgos podrían respaldar la consideración de las LMA-CRM como una categoría de LMA de alto riesgo, tal y como quedaba definida en la OMS de 2017. Sin embargo, al introducir los resultados del estudio mutacional en el análisis y considerar su impacto por categorías diagnósticas sí se observaron diferencias. Dentro de las mutaciones detectadas con mayor prevalencia en la serie, *ASXL1* mostró un impacto significativo en la supervivencia del grupo con LMA-CRM-morfo, observándose dos perfiles claramente diferenciados según el estado mutacional de *ASXL1* (Figura 24, resultados parte III).



**Figura 24.** Diferencias en la supervivencia global entre los pacientes con LMA-CRM y LMA-NE, separando los casos de LMA-CRM en función del criterio diagnóstico y diferenciando dentro del grupo LMA-CRM-morfo los pacientes con y sin mutación en *ASXL1*.

Los pacientes con LMA-CRM-morfo *ASXL1*<sup>+</sup> mostraron una supervivencia significativamente inferior a la de los pacientes con LMA-CRM-morfo *ASXL1*<sup>-</sup>; equiparándose la supervivencia de las LMA-CRM-morfo *ASXL1*<sup>+</sup> a la de las LMA-CRM-smd y las LMA-CRM-citog, y diferenciándose estas tres de la supervivencia de las LMA-CRM-morfo *ASXL1*<sup>-</sup>, grupo que mostró un pronóstico claramente mejor y comparable a la del grupo control de LMA-NE.

En el caso de *TP53*, ninguno de los pacientes secuenciados dentro del grupo con LMA-CRM-morfo presentó mutaciones en este gen. Y, para las restantes mutaciones más frecuentes en la serie (*TET2*, *SRSF2*, *RUNX1*, *NRAS*, *DNMT3A* y *SF3B1*) si bien no se observaron diferencias en supervivencia en función de la presencia o no de mutaciones en estos genes en el grupo de pacientes con LMA-CRM-morfo, el número de casos mutados frente a no mutados para cada una de ellas en este grupo fue muy bajo, lo que limita la validez de estos resultados.

Respecto a la displasia multilínea, ni en el global de la serie ni específicamente al analizar los subgrupos con LMA-CRM-citog y LMA-CRM-smd, su detección demostró tener un impacto adverso en la supervivencia global de los pacientes, en línea con lo publicado en series como la de Montalban Bravo y colaboradores (85) o Miesner y colaboradores (62). Considerando signos individuales de displasia, en la serie estudiada ninguno mostró asociación con pronóstico de manera independiente, si bien la presencia de dismegacariopoyesis en porcentaje  $\geq 50\%$  se asoció a una menor supervivencia en el conjunto de pacientes con LMA-CRM. En el trabajo de Weinberg y colaboradores que incluyó 48 casos de LMA-CRM (84), entre los signos de displasia analizados, solo la presencia de micromegacariocitos y de hipogranularidad en serie granulocítica se asociaron con una menor supervivencia libre de evento. El hallazgo de micromegacariocitos también se ha relacionado con peor pronóstico en LMA en otra publicación de Weinberg y colaboradores (95), en la que se sugiere que la detección de micromegacariocitos podría ser un marcador de agresividad en LMA mejor que el concepto clásico de displasia multilínea de la OMS, que incluye la presencia de disgranulopoyesis y de diseritropoyesis, alteraciones que en esta publicación no afectaron

al pronóstico de los pacientes. Es remarcable que en nuestra serie la mutación en *ASXL1* se asoció a la presencia de micromegacariocitos.

Por último, se estudiaron otras variables con posible impacto en la supervivencia global de la serie, incluyendo el grupo de riesgo citogenético y los genes mutados con más frecuencia. En el análisis multivariante solo la edad (HR: 1,1; p=0,014) y la mutación en *TP53* (HR: 8,4; p=0,036) mostraron un valor pronóstico adverso. Es destacable que la frecuencia de mutación en *TP53* en los pacientes con LMA-CRM-citog fue del 63,6%, mientras que no hubo ningún paciente con esta mutación entre los evaluados dentro del grupo de LMA-CRM-morfo (N=8), y solo se detectó en 2/15 casos dentro del grupo con LMA-CRM-smd (Tabla 21, resultados bloque I).

En conjunto, estos resultados respaldan que la displasia multilínea tal y como está definida por la OMS no tiene un valor pronóstico relevante en LMA-CRM en ausencia de otros factores de riesgo adverso, como la historia de SMD o SMD/NMP, las anomalías citogenéticas relacionadas con SMD y la presencia de determinadas mutaciones patogénicas como *ASXL1*. En consecuencia, los criterios diagnósticos de LMA-CRM empleados en la clasificación OMS de 2017 podrían no ser del todo adecuados para reconocer a los pacientes de riesgo adverso. Es posible que la diversidad en el perfil mutacional subyacente en los pacientes con LMA-CRM diagnosticados por criterio citomorfológico justificara los resultados dispares reportados históricamente por diferentes estudios en relación al pronóstico de este grupo. Curiosamente, en algunos de los estudios en los que los pacientes con LMA-CRM diagnosticados solo por la presencia de displasia multilínea tuvieron peores resultados comparados con LMA-NE, como el de Weinberg y colaboradores (61) o más recientemente Fang y colaboradores (94), la mutación en *ASXL1* no se testó y, por tanto, no se consideró en el análisis. Si la presencia de dismegacariopoyesis o específicamente de micromegacariocitos, constituyen mejores marcadores de riesgo que la displasia multilínea en LMA, y si verdaderamente estos hallazgos tienen relevancia pronóstica independiente, o pueden también estar relacionados con factores genético-moleculares subyacentes, es un aspecto que requiere de estudios en series más amplias de pacientes.

Estos resultados, que cuestionan la validez de la displasia multilínea como criterio diagnóstico único de LMA-CRM se han visto respaldados por el cambio propuesto por la OMS en la definición de las LMA relacionadas con mielodisplasia en su quinta edición de la clasificación de las neoplasias hematológicas (151). En esta reciente revisión de la clasificación de la OMS se introducen de nuevo cambios en la categoría de las LMA-CRM (ahora denominadas LMA-RM), entre los que se incluye la eliminación de la displasia multilínea como criterio diagnóstico de esta categoría. Según su nueva definición las LMA-RM incluirían los casos con  $\geq 20\%$  de blastos mieloides que presentan alteraciones citogenéticas y/o moleculares específicas relacionadas con SMD, surgidas *de novo* o como progresión de un SMD o un SMD/NMP. Por tanto, para su diagnóstico se requiere además de la presencia de un porcentaje de blastos  $\geq 20\%$ , la detección de una o más anomalías citogenéticas o moleculares relacionadas con SMD y/o la historia previa de SMD o SMD/NMP. El cambio incluye la actualización del listado de anomalías citogenéticas relacionadas con SMD (de las que se han excluido las alteraciones citogenéticas equilibradas) y la introducción de un panel de mutaciones que pasan a ser definitorias de LMA-RM. En esta nueva clasificación el grupo pasa a formar parte de las LMA con anomalías citogenéticas definitorias. En el anexo 1 se incluye la nueva definición de LMA-RM según la OMS de 2022. En el anexo 2 se describe la clasificación completa de las LMA de la OMS de 2022.

En el caso de la Clasificación Internacional de Consenso, la displasia queda también eliminada como criterio de clasificación de las LMA (161). Además, a diferencia de la OMS, este grupo elimina también el antecedente de SMD o SMD/NMP como criterio clasificatorio, pasando este a ser un "calificador" que se añadiría a cualquiera de las entidades definidas genéticamente por este grupo. Los detalles de la clasificación de las LMA propuesta por la ICC y los cambios que esta introduce en relación a la categoría previa de las LMA-CRM se resumen en el anexo 3.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El estudio de las características citomorfológicas, citogenéticas y moleculares de los pacientes con LMA-CRM muestra que:

- Las LMA-CRM tienen como rasgos habituales mielodisplasia; un elevado porcentaje de cariotipos complejos y/o alteraciones en desequilibrio, especialmente -7/del(7q) o del(5q); y una alta prevalencia de mutaciones en *TP53* y *ASXL1*.
- Por subgrupos diagnósticos, destaca la asociación de leucocitosis y mutaciones en *ASXL1* y *TET2* a LMA-CRM-smd, de cariotipo de riesgo adverso y mutación en *TP53* al grupo LMA-CRM-citog, y de la mutación *IDH2* a LMA-CRM-morfo.
- Globalmente la supervivencia de los pacientes con LMA-CRM es inferior a la de un grupo control de LMA-NE de riesgo intermedio.

2. El estudio de la asociación de la mutación en *ASXL1* a LMA-CRM muestra que:

- En pacientes con LMA-CRM la frecuencia de mutaciones en *ASXL1* es significativamente superior a la encontrada en LMA-NE.
- La mutación de *ASXL1* en LMA-CRM se asocia a historia de SMD o SMD/NMP, morfología monocítica/mielomonocítica, micromegacariocitos en médula ósea y cariotipo normal; hallazgos que podrían anticipar el estado mutacional de *ASXL1*. Su asociación al antecedente de SMD y a mielodisplasia y su elevada frecuencia en este tipo de leucemia sugieren el papel de *ASXL1* como marcador subrogado de LMA-CRM con posible utilidad diagnóstica.
- La mutación en *ASXL1* muestra impacto pronóstico adverso en los pacientes con LMA-CRM *de novo* y cariotipo de riesgo intermedio.

3. El estudio del valor pronóstico independiente de la displasia multilínea en LMA-CRM muestra que:

- La displasia multilínea en ausencia de otros criterios de riesgo adverso como las alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia, el antecedente de SMD o SMD/NMP y la mutación en *ASXL1*, no tiene impacto pronóstico independiente en LMA-CRM.

- La presencia de dismegacariopoyesis en porcentaje  $\geq 50\%$  se asocia a una menor supervivencia en LMA-CRM, si bien de manera aislada ningún signo de displasia muestra valor pronóstico independiente.
- La edad y la mutación de *TP53* muestran impacto negativo en la supervivencia global del grupo.

# **ANEXOS**



## **ANEXO 1: LMA RELACIONADA CON MIELODISPLASIA, DEFINICIÓN DE LA OMS 2022**

La 5ª edición de la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS introduce cambios relevantes en la categoría de las LMA-CRM (151). Esta pasa a denominarse LMA relacionada con mielodisplasia e incluye los casos de LMA con un porcentaje de blastos mieloides  $\geq 20\%$  que presentan alteraciones citogenéticas y/o moleculares específicas relacionadas con mielodisplasia, ya sean *de novo* o secundarias a un SMD o un SMD/NMP. Para su diagnóstico son requisitos la detección de  $\geq 20\%$  de blastos, más la presencia de una o más anomalías citogenéticas o moleculares relacionadas con mielodisplasia (Tabla 29) y/o la historia previa de SMD o SMD/NMP.

Los principales cambios respecto a la definición previa son:

- La eliminación de la displasia multilínea como criterio diagnóstico único de LMA-RM.
- La actualización de las anomalías citogenéticas definatorias de LMA-RM, de las que se han eliminado las alteraciones equilibradas.
- La introducción de un panel de mutaciones definatorias de LMA-RM que incluye 8 genes: *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2*. La detección de mutaciones en estos genes ha demostrado ser altamente específica de LMA secundarias a SMD o SMD/NMP (93).

Esta modificación en la clasificación de la OMS probablemente responde a un intento de eliminar la variabilidad reflejada en el pronóstico de los pacientes con LMA-CRM según su definición previa, especialmente en el grupo diagnosticado solo por criterios citomorfológicos, y a una mejor clasificación de los mismos basada en la presencia de alteraciones citogenéticas y/o moleculares.

Aunque la displasia multilínea queda excluida como criterio diagnóstico de esta categoría sigue siendo una característica habitual en este tipo de LMA, cuya observación puede anticipar la presencia de alteraciones citogenéticas y/o moleculares subyacentes.

**Tabla 29.** Anomalías citogenéticas y moleculares definitorias de LMA-RM (OMS 2022)

<p><b>Alteraciones citogenéticas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>– Cariotipo complejo (<math>\geq 3</math> anomalías)</li><li>– Deleción 5q o pérdida de 5q debido a translocación en desequilibrio</li><li>– Monosomía 7, deleción 7q, o pérdida de 7q debida a translocación en desequilibrio</li><li>– Deleción 11q</li><li>– Deleción 12p o pérdida de 12p debido a translocación en desequilibrio</li><li>– Monosomía 13 o deleción 13q</li><li>– Deleción 17p o pérdida de 17p debido a translocación en desequilibrio</li><li>– Isocromosoma 17q</li><li>– <math>\text{idic(X)(q13)}</math></li></ul>
<p><b>Mutaciones somáticas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>– <i>ASXL1</i></li><li>– <i>BCOR</i></li><li>– <i>EZH2</i></li><li>– <i>SF3B1</i></li><li>– <i>SRSF2</i></li><li>– <i>STAG2</i></li><li>– <i>U2AF1</i></li><li>– <i>ZRSR2</i></li></ul>

Abreviaturas: LMA-RM: leucemia mieloide aguda relacionada con mielodisplasia; OMS: Organización Mundial de la Salud.

## ANEXO 2: CLASIFICACIÓN DE LAS LMA DE LA OMS 2022

En la 5ª edición de la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS quedan establecidos dos grandes grupos diagnósticos dentro de las LMA: 1) las LMA con anomalías genéticas definitorias y 2) las LMA definidas por la diferenciación (sustituye al previo de LMA-NE) (151). El grupo de las LMA-CRM, redefinido como LMA relacionadas con mielodisplasia, se introduce dentro de la categoría de LMA con alteraciones citogenéticas definitorias. Además, se mantiene la definición de sarcoma mielode como manifestación de LMA y se define un grupo de neoplasias mieloides secundarias que incluye las neoplasias mieloides post-terapia citotóxica y las neoplasias mieloides asociadas con predisposición germinal (Tabla 30).

Otra modificación relevante afecta al porcentaje mínimo de blastos necesario para el diagnóstico de una LMA, que se elimina para todos los casos de LMA con alteraciones genéticas definitorias con la excepción de las LMA con fusión *BCR::ABL1*, las LMA con mutación en *CEBPA*, y las LMA-RM, para las que se mantiene el 20%.

**Tabla 30.** Clasificación de las LMA de la OMS 2022

### LMA con anomalías genéticas definitorias

- Leucemia aguda promielocítica con fusión *PML::RARA*
- Leucemia mielode aguda con fusión *RUNX1::RUNXIT1*
- Leucemia mielode aguda con fusión *CBFB::MYH11*
- Leucemia mielode aguda con fusión *DEK::NUP214*
- Leucemia mielode aguda con fusión *RBM15::MRTFA*
- Leucemia mielode aguda con fusión *BCR::ABL1*
- Leucemia mielode aguda con reordenamiento *KMT2A*
- Leucemia mielode aguda con reordenamiento *MECOM*
- Leucemia mielode aguda con reordenamiento *NUP98*
- Leucemia mielode aguda con mutación *NPM1*
- Leucemia mielode aguda con mutación *CEBPA*
- Leucemia mielode aguda relacionada con mielodisplasia
- Leucemia mielode aguda con otras alteraciones genéticas definidas

Continúa

Tabla 30. Continúa

<b>LMA definida por la diferenciación</b> <ul style="list-style-type: none"><li>– LMA con mínima diferenciación</li><li>– LMA sin maduración</li><li>– LMA con maduración</li><li>– Leucemia aguda de basófilos</li><li>– Leucemia aguda mielomonocítica</li><li>– Leucemia aguda monocítica</li><li>– Leucemia aguda eritroide</li><li>– Leucemia aguda megacarioblástica</li></ul>
<b>Sarcoma mieloide</b>
<b>Neoplasias mieloides secundarias</b> <ul style="list-style-type: none"><li>– Neoplasias mieloides post-terapia citotóxica</li><li>– Neoplasias mieloides asociadas con predisposición germinal</li></ul>

Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda; OMS: Organización Mundial de la Salud. Nota: para la descripción de los genes de fusión en esta tabla se siguen las recomendaciones del *HUGO Gene Nomenclature Committee*, publicadas en 2021 (162).

### ANEXO 3: CLASIFICACIÓN DE LAS LMA DE LA ICC 2022

La Clasificación de Consenso Internacional de las LMA presenta algunas diferencias con la establecida por la OMS. Con respecto a las LMA-CRM, la ICC elimina la entidad tal y como estaba definida en la OMS de 2017. En este nuevo sistema, se mantiene una categoría de LMA definida por alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia y se definen dos nuevas, las LMA con mutaciones génicas relacionadas con mielodisplasia y las LMA con *TP53* mutado; entre las que quedarían agrupados los casos "clásicos" de LMA-CRM. La displasia multilinea se elimina como criterio de diagnóstico y, a diferencia de la OMS, se elimina también el antecedente de SMD o SMD/NMP como criterio de clasificación, pasando este a ser un "calificador" que se añadiría a cualquiera de las entidades definidas genéticamente por este grupo. Para el diagnóstico de LMA en estas tres categorías se requiere la presencia de un porcentaje de blastos mieloides igual o superior al 20%. Pero además, este grupo define una nueva entidad intermedia denominada SMD/LMA que se diagnosticaría en aquellos casos con estas alteraciones genéticas y moleculares que presentaran una blastosis entre el 10 y el 19%. Los criterios diagnósticos de estas tres categorías junto al resto de subtipos de LMA definidos por la ICC y el porcentaje de blastos requeridos para su diagnóstico se recogen en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Clasificación de las LMA según la ICC de 2022 y porcentaje de blastos requeridos para su diagnóstico

- Leucemia aguda promielocítica (LPA) con t(15;17)(q24.1;q21.2)/*PML::RARA*  $\geq 10\%$
- LPA con otros reordenamientos de *RARA*<sup>1</sup>  $\geq 10\%$
- LMA con t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1::RUNX1T1*  $\geq 10\%$
- LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFB::MYH11*  $\geq 10\%$
- LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3::KMT2A*  $\geq 10\%$
- LMA con otros reordenamientos de *KMT2A*<sup>2</sup>  $\geq 10\%$
- LMA con t(6;9)(p22.3;q34.1)/*DEK::NUP214*  $\geq 10\%$
- LMA con inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2)/*GATA2; MECOM(EV11)*  $\geq 10\%$
- LMA con otros reordenamientos de *MECOM*<sup>3</sup>  $\geq 10\%$
- LMA con otras traslocaciones recurrentes raras  $\geq 10\%$
- LMA con t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1*  $\geq 20\%$
- LMA con *NPM1* mutado  $\geq 10\%$
- LMA con mutación in-frame en bZIP de *CEBPA*  $\geq 10\%$

Continúa

Tabla 31. Continúa

- LMA y SMD/LMA con *TP53* mutado; 10-19% (SMD/LMA) y  $\geq 20\%$  (LMA)
- LMA y SMD/LMA con mutaciones génicas relacionadas con mielodisplasia; 10-19% (SMD/LMA) y  $\geq 20\%$  (LMA):
  - o Definidas por mutaciones en *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* o *ZRSR2*
- LMA con anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia; 10-19% (SMD/LMA) y  $\geq 20\%$  (LMA):
  - o Definidas por la detección de un cariotipo complejo ( $\geq 3$  anomalías cromosómicas clonales no relacionadas en ausencia de otras anomalías genéticas recurrentes definitorias de una categoría), o de las siguientes alteraciones clonales: del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) o del(17p), del(20q), y/o idic(X)(q13).
- LMA no especificada de otra manera; 10-19% (SMD/LMA) y  $\geq 20\%$  (LMA)
- Sarcoma mieloide

<sup>1</sup>Incluye las LMA con: t(1;17)(q42.3;q21.2)/*IRF2BP2::RARA*; t(5;17)(q35.1;q21.2)/*NPM1::RARA*; t(11;17)(q23.2;q21.2)/*ZBTB16::RARA*; inv(17q) críptica o del(17)(q21.2q21.2)/*STAT5B::RARA*, *STAT3::RARA*; Otros genes raramente reordenados con *RARA*: *TBL1XR1* (3q26.3), *FIP1L1* (4q12), *BCOR* (Xp11.4). <sup>2</sup>Incluye LMA con: t(4;11)(q21.3;q23.3)/*AFF1::KMT2A*; t(6;11)(q27;q23.3)/*AFDN::KMT2A*; t(10;11)(p12.3;q23.3)/*MLLT10::KMT2A*; t(10;11)(q21.3;q23.3)/*TET1::KMT2A*; t(11;19)(q23.3;p13.1)/*KMT2A::ELL*; t(11;19)(q23.3;p13.3)/*KMT2A::MLLT1*. <sup>3</sup>Incluye LMA con: t(2;3)(p11~23;q26.2)/*MECOM::?*; t(3;8)(q26.2;q24.2)/*MYC,MECOM*; t(3;12)(q26.2;p13.2)/*ETV6::MECOM*; t(3;21)(q26.2;q22.1)/*MECOM::RUNX1*. Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplásico; ICC: Clasificación de Consenso Internacional.

## **ANEXO 4: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

### **Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis**

Prats-Martín C, Burillo-Sanz S, Morales-Camacho RM, Pérez-López O, Suito M, Vargas MT, Caballero-Velázquez T, Carrillo-Cruz E, González J, Bernal R, Pérez-Simón JA. *ASXL1* mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype. *Cancer Med.* 2020 Jun;9(11):3637-3646. doi: 10.1002/cam4.2947. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32216059; PMCID: PMC7286456.



**ANEXO 5: RELACIÓN DE TABLAS**

**Tabla 1.** Clasificación FAB de las leucemias mieloides agudas: M1-M6 (1976), M3 variante (1980), M4 Eo (1985), M7 (1985) y M0 (1991).

**Tabla 2.** Clasificación MIC de las leucemias mieloides agudas.

**Tabla 3.** Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de las leucemias mieloides agudas y neoplasias de precursores relacionadas (2017).

**Tabla 4.** Estratificación pronóstica de la *European LeukemiaNet* (2017).

**Tabla 5.** Clasificación de riesgo genético de la *European LeukemiaNet* (2022).

**Tabla 6.** Alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (OMS 2017).

**Tabla 7.** Alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (OMS 2008).

**Tabla 8.** Principales manifestaciones morfológicas de displasia en SMD (OMS 2017).

**Tabla 9.** Mutaciones descritas en LMA-CRM con frecuencia  $\geq 6\%$ .

**Tabla 10.** Criterios diagnósticos de LMA-CRM (OMS 2017).

**Tabla 11.** Criterios diagnósticos de LMA-NE (OMS 2017).

**Tabla 12.** Panel de anticuerpos monoclonales empleado para el diagnóstico de LMA (años 2008 a junio de 2012).

**Tabla 13.** Panel de anticuerpos monoclonales empleado para el diagnóstico de LMA (desde junio de 2012) (basado en protocolos EuroFlow).

**Tabla 14.** Tipos de sondas de FISH empleadas para el estudio de las LMA-CRM.

**Tabla 15.** Características clínicas y biológicas de los pacientes con LMA-CRM.

**Tabla 16.** Subtipos morfológicos FAB dentro de los casos de LMA-CRM.

**Tabla 17.** Rasgos de displasia observados en los casos con LMA-CRM.

**Tabla 18.** Alteraciones citogenéticas identificadas en los pacientes con LMA-CRM.

**Tabla 19:** Mutaciones detectadas en los pacientes con LMA-CRM.

**Tabla 20.** Comparación de las características clínicas y biológicas entre los subgrupos diagnósticos de LMA-CRM: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo.

**Tabla 21.** Comparación del perfil mutacional entre los tres subgrupos diagnósticos de LMA-CRM: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo.

**Tabla 22.** Características clínicas y biológicas del grupo control de LMA-NE y comparación con LMA-CRM.

**Tabla 23.** Lista de pacientes (LMA-CRM) y controles (LMA-NE) con mutaciones en *ASXL1*, ordenados por posición de aminoácido mutado.

**Tabla 24.** Diferencias entre pacientes con LMA-CRM *ASXL1*<sup>+</sup> y LMA-CRM *ASXL1*<sup>-</sup>.

**Tabla 25.** Número de casos mutados y no mutados en el grupo de pacientes con LMA-CRM-morfo para *RUNX1*, *TET2*, *SRSF2*, *NRAS*, *DNMT3A* y *SF3B1*.

**Tabla 26.** Impacto en la supervivencia global de signos citomorfológicos de displasia.

**Tabla 27.** Análisis univariante de factores con impacto en la supervivencia global en pacientes con LMA-CRM.

**Tabla 28.** Análisis multivariante de factores con impacto en la supervivencia global en pacientes con LMA-CRM.

**Tabla 29.** Anomalías citogenéticas y moleculares definitorias de LMA-RM (OMS 2022).

**Tabla 30.** Clasificación de las LMA de la OMS 2022.

**Tabla 31.** Clasificación de las LMA según la ICC de 2022 y porcentaje de blastos requeridos para su diagnóstico.

**ANEXO 6: RELACIÓN DE FIGURAS**

**Figura 1.** Incidencia anual de LMA por 100000 habitantes según edad y sexo en Suecia (1997 a 2006), en el registro SEER (EE. UU., 2004-2008) y en el Reino Unido.

**Figura 2.** Supervivencia relacionada con la edad en pacientes con LMA en Inglaterra, Suecia y EE. UU.

**Figura 3.** Signos de diseritropoyesis.

**Figura 4.** Signos de diseritropoyesis.

**Figura 5.** Signos de diseritropoyesis.

**Figura 6.** Signos de disgranulopoyesis.

**Figura 7.** Signos de disgranulopoyesis.

**Figura 8.** Signos de dismegacariopoyesis.

**Figura 9.** Cariotipo complejo.

**Figura 10.** Anomalías en desequilibrio en LMA-CRM.

**Figura 11.** Translocación equilibrada en LMA-CRM.

**Figura 12.** Representación del gen *ASXL1* en el locus 20q11.

**Figura 13.** El complejo Polycomb PRC2.

**Figura 14.** Esquema de la técnica de citogenética con bandas G.

**Figura 15.** Imagen de una metafase y un cariotipo con patrón de bandas G.

**Figura 16.** Esquema de la técnica de FISH.

**Figura 17.** Representación descriptiva de las mutaciones detectadas por NGS en los pacientes con LMA-CRM.

**Figura 18.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los 111 pacientes con LMA-CRM.

**Figura 19.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los pacientes con LMA-CRM en función del subgrupo diagnóstico: LMA-CRM-citog, LMA-CRM-smd y LMA-CRM-morfo.

**Figura 20.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global del grupo control de LMA-NE comparada con LMA-CRM.

**Figura 21.** Dismorfias de hematíes y plaquetas en sangre periférica.

**Figura 22.** Micromegacariocitos en médula ósea.

**Figura 23.** Supervivencia global de los pacientes con LMA-CRM *de novo* con citogenética de riesgo intermedio en función de la presencia de mutación en *ASX11*.

**Figura 24.** Diferencias en la supervivencia global entre los pacientes con LMA-CRM y LMA-NE, separando los casos de LMA-CRM en función del criterio diagnóstico y diferenciando dentro del grupo LMA-CRM-morfo los pacientes con y sin mutación en *ASX11*.

**Figura 25.** Curvas de Kaplan-Meier para la presencia de disgranulopoyesis, diseritropoyesis y dismegacariopoyesis  $\geq$  al 50% en pacientes con LMA-CRM.

# **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.
2. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006 Nov 25;368(9550):1894–907.
3. National Cancer Institute. Bethesda MD. SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
4. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt AS, Hagberg O, Höglund M, Swedish Acute Leukemia Registry Group. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012 Apr 26;119(17):3890–9.
5. Sanvisens A, Ameijide A, Carulla M, Marcos-Gragera R, en representación de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Estimates of the incidence of hematological neoplasms in Spain, 2021: Study of the Spanish Network of Cancer Registries (REDECAN). *Med Clin (Barc)*. 2022 Mar 25;158(6):284–90.
6. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006 Nov 1;107(9):2099–107.
7. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 10;2:16010.
8. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th. IARC: Lyon; 2017.
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33(4):451–8.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. A variant form of hypergranular promyelocytic leukaemia (M3). *Br J Haematol*. 1980 Jan;44(1):169–70.

11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985 Oct;103(4):620–5.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985 Sep;103(3):460–2.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol.* 1991 Jul;78(3):325–9.
14. Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, September 15-17, 1986. Second MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988 Jan;30(1):1–15.
15. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999 Dec;17(12):3835–49.
16. Jaffe ES, Harris NL, Stein H. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 3rd ed. Lyon: IARC Press; 2001.
17. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.
18. Grimwade D, Hills RK, Moorman A v, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010 Jul 22;116(3):354–65.
19. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016 Jan 7;127(1):29–41.

20. Shah A, Andersson TML, Racht B, Björkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol*. 2013 Aug;162(4):509–16.
21. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E, et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer*. 2006 Mar 1;106(5):1090–8.
22. Walter RB, Othus M, Borthakur G, Ravandi F, Cortes JE, Pierce SA, et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: a novel paradigm for treatment assignment. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 20;29(33):4417–23.
23. Østgård LSG, Nørgaard JM, Sengeløv H, Severinsen M, Friis LS, Marcher CW, et al. Comorbidity and performance status in acute myeloid leukemia patients: a nation-wide population-based cohort study. *Leukemia*. 2015 Mar;29(3):548–55.
24. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1312–20.
25. Hulegårdh E, Nilsson C, Lazarevic V, Garelius H, Antunovic P, Rangert Derolf Å, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Am J Hematol*. 2015 Mar;90(3):208–14.
26. 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 Jun 9;374(23):2209–21.
27. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Aug 4;128(5):686–98.
28. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. 2017 Mar 20;35(9):934–46.

29. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453–74.
30. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424–47.
31. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 10;29(20):2758–65.
32. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 20;30(36):4515–23.
33. Boddu PC, Kadia TM, Garcia-Manero G, Cortes J, Alfayez M, Borthakur G, et al. Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-internal tandem duplication genotypes. *Cancer*. 2019 Apr 1;125(7):1091–100.
34. Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald V v, Janke H, Goerlich D, Sauerland MC, et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020 Dec;34(12):3161–72.
35. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345–77.
36. Walter RB, Kantarjian HM, Huang X, Pierce SA, Sun Z, Gundacker HM, et al. Effect of complete remission and responses less than complete remission on survival in acute myeloid leukemia: a combined Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and M. D. Anderson Cancer Center Study. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1766–71.

37. Buccisano F, Maurillo L, del Principe MI, del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):332–41.
38. Yin JAL, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012 Oct 4;120(14):2826–35.
39. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3889–97.
40. Vidriales MB, Pérez-López E, Pegenaute C, Castellanos M, Pérez JJ, Chandía M, et al. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2016 Jan;40:1–9.
41. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018 Mar 29;378(13):1189–99.
42. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic J v, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 2016 Feb 4;374(5):422–33.
43. Short NJ, Zhou S, Fu C, Berry DA, Walter RB, Freeman SD, et al. Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2020 Dec 1;6(12):1890–9.
44. Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease-Based Definition of Complete Remission? *J Clin Oncol*. 2016 Feb 1;34(4):329–36.

45. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):53–61.
46. Tallman MS. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;143–50.
47. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018 Sep 10;36(26):2684–92.
48. Arber DA, Brunning RD, Orazi A, Bain BJ, Porwit A, le Beau MM, et al. Acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes. In: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4th. Lyon: IARC; 2017.
49. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982 Jun;51(2):189–99.
50. Jinnai I, Tomonaga M, Kuriyama K, Matsuo T, Nonaka H, Amenomori T, et al. Dysmegakaryocytopoiesis in acute leukaemias: its predominance in myelomonocytic (M4) leukaemia and implication for poor response to chemotherapy. *Br J Haematol*. 1987 Aug;66(4):467–72.
51. Goasguen JE, Matsuo T, Cox C, Bennett JM. Evaluation of the dysmyelopoiesis in 336 patients with de novo acute myeloid leukemia: major importance of dysgranulopoiesis for remission and survival. *Leukemia*. 1992 Jun;6(6):520–5.
52. Gahn B, Haase D, Unterhalt M, Drescher M, Schoch C, Fonatsch C, et al. De novo AML with dysplastic hematopoiesis: cytogenetic and prognostic significance. *Leukemia*. 1996 Jun;10(6):946–51.
53. Tamura S, Takemoto Y, Wada H, Itoh T, Mori A, Saheki K, et al. Significance of trilineage myelodysplasia in de novo acute myeloid leukaemia during remission rather than at diagnosis. *Br J Haematol*. 1998 Jun;101(4):743–8.

54. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2292–302.
55. Brunning RD, Matutes E, Harris NL, Flandrin G, Vardiman J, Bennett J, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon ; 2001. 88–89 p.
56. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol*. 2003 May;119(5):672–80.
57. Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, et al. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):256–65.
58. Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, Kiyoi H, Kinoshita T, Emi N, et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol*. 2005 May;74(5):418–23.
59. Wandt H, Schäkel U, Kroschinsky F, Prange-Krex G, Mohr B, Thiede C, et al. MLD according to the WHO classification in AML has no correlation with age and no independent prognostic relevance as analyzed in 1766 patients. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1855–61.
60. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937–51.
61. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD, et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1906–8.
62. Miesner M, Haferlach C, Bacher U, Weiss T, Maciejewski K, Kohlmann A, et al. Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-

related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as “AML not otherwise specified” (AML-NOS) or “AML with myelodysplasia-related changes” (AML-MRC). *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2742–51.

63. Xu XQ, Wang JM, Gao L, Qiu HY, Chen L, Jia L, et al. Characteristics of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes: A retrospective analysis in a cohort of Chinese patients. *Am J Hematol*. 2014 Sep;89(9):874–81.
64. Bacher U, Schnittger S, Maciejewski K, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, et al. Multilineage dysplasia does not influence prognosis in CEBPA-mutated AML, supporting the WHO proposal to classify these patients as a unique entity. *Blood*. 2012 May 17;119(20):4719–22.
65. Falini B, Maciejewski K, Weiss T, Bacher U, Schnittger S, Kern W, et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). *Blood*. 2010 May 6;115(18):3776–86.
66. Díaz-Beyá M, Rozman M, Pratcorona M, Torreadell M, Camós M, Aguilar JL, et al. The prognostic value of multilineage dysplasia in de novo acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics is dependent on NPM1 mutational status. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):6147–8.
67. Rozman M, Navarro JT, Arenillas L, Aventín A, Giménez T, Alonso E, et al. Multilineage dysplasia is associated with a poorer prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia with intermediate-risk cytogenetics and wild-type NPM1. *Ann Hematol*. 2014 Oct;93(10):1695–703.
68. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
69. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):3024–32.

70. Schlenk RF, Taskesen E, van Norden Y, Krauter J, Ganser A, Bullinger L, et al. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood*. 2013 Aug 29;122(9):1576–82.
71. Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, Hata T, Taniwaki M, Ohtake S, et al. Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol. *Int J Hematol*. 2008 Mar;87(2):144–51.
72. Bao L, Wang X, Ryder J, Ji M, Chen Y, Chen H, et al. Prospective study of 174 de novo acute myelogenous leukemias according to the WHO classification: subtypes, cytogenetic features and FLT3 mutations. *Eur J Haematol*. 2006 Jul;77(1):35–45.
73. Davis KL, Marina N, Arber DA, Ma L, Cherry A, Dahl G v, et al. Pediatric acute myeloid leukemia as classified using 2008 WHO criteria: a single-center experience. *Am J Clin Pathol*. 2013 Jun;139(6):818–25.
74. Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Yabe M, Taki T, Watanabe T, et al. Acute myeloid leukaemia with myelodysplastic features in children: a report of Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol*. 2014 Oct;167(1):80–6.
75. Manola KN, Panitsas F, Polychronopoulou S, Daraki A, Karakosta M, Stavropoulou C, et al. Cytogenetic abnormalities and monosomal karyotypes in children and adolescents with acute myeloid leukemia: correlations with clinical characteristics and outcome. *Cancer Genet*. 2013 Mar;206(3):63–72.
76. Jiang G, Capo-Chichi JM, Liu A, Atenafu EG, Guo R, Tierens A, et al. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes diagnosed with multilineage dysplasia alone demonstrates a superior clinical outcome. *Hum Pathol*. 2020 Oct;104:117–26.
77. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1999 Sep 30;341(14):1051–62.
78. Hasserjian RP, Orazi A, Brunning RD, Germing U, le Beau MM, Porwit A, et al. Myelodysplastic syndromes: Overview. In: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4th. Lyon: IARC; 2017.

79. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Dyserythropoiesis in the diagnosis of the myelodysplastic syndromes and other myeloid neoplasms: problem areas. *Br J Haematol*. 2018 Aug;182(4):526–33.
80. Florensa L, Arenillas L, Calvo X, Pérez-Vila E, Montesdeoca S, Ferrer A, et al. The importance of adequate recognition of normal and dysplastic myelopoiesis for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Histol Histopathol*. 2019;34(8):857–73.
81. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2014 Apr;38(4):447–53.
82. Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Lepelley P, et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia*. 1995;9(3):370–81.
83. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning RD, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: Difficulties in the assessment of dysplasia. *Leuk Res*. 2016 Jun;45:75–81.
84. Weinberg OK, Pozdnyakova O, Campigotto F, DeAngelo DJ, Stone RM, Neuberg D, et al. Reproducibility and prognostic significance of morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia. *Modern Pathology*. 2015 Jul;28(7):965–76.
85. Montalban-Bravo G, Kanagal-Shamanna R, Class CA, Sasaki K, Ravandi F, Cortes JE, et al. Outcomes of acute myeloid leukemia with myelodysplasia related changes depend on diagnostic criteria and therapy. *Am J Hematol*. 2020 Jun 20;95(6):612–22.
86. Mrózek K, Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Carroll AJ, Walker CJ, Nicolet D, et al. Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically. *Leukemia*. 2019 Jul 8;33(7):1620–34.
87. Devillier R, Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Carbuccia N, Murati A, Vey N, et al. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes are characterized by a specific molecular pattern with high frequency of ASXL1 mutations. *Am J Hematol*. 2012 Jul;87(7):659–62.

88. Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, Demur C, Murati A, Corre J, et al. Role of *ASXL1* and *TP53* mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*. 2015 Apr 10;6(10):8388–96.
89. Gao Y, Jia M, Mao Y, Cai H, Jiang X, Cao X, et al. Distinct Mutation Landscapes Between Acute Myeloid Leukemia With Myelodysplasia-Related Changes and De Novo Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2022 May 4;157(5):691–700.
90. Baer C, Walter W, Stengel A, Hutter S, Meggendorfer M, Kern W, et al. Molecular Classification of AML-MRC Reveals a Distinct Profile and Identifies MRC-like Patients with Poor Overall Survival. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement\_1):2735–2735.
91. Yu J, du Y, Jalil A, Ahmed Z, Mori S, Patel R, et al. Mutational profiling of myeloid neoplasms associated genes may aid the diagnosis of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes. *Leuk Res*. 2021;
92. Badar T, Szabo A, Sallman D, Komrojki R, Lancet J, Padron E, et al. Interrogation of molecular profiles can help in differentiating between MDS and AML with MDS-related changes. *Leuk Lymphoma*. 2020 May 11;61(6):1418–27.
93. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman P v., Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015 Feb 26;125(9):1367–76.
94. Fang H, He R, Chiu A, Viswanatha DS, Ketterling RP, Patnaik MS, et al. Genetic Factors in Acute Myeloid Leukemia With Myelodysplasia-Related Changes. *Am J Clin Pathol*. 2020 Apr 15;153(5):656–63.
95. Weinberg OK, Gibson CJ, Blonquist TM, Neuberg D, Pozdnyakova O, Kuo F, et al. Association of mutations with morphological dysplasia in *de novo* acute myeloid leukemia without 2016 WHO Classification-defined cytogenetic abnormalities. *Haematologica*. 2018 Apr;103(4):626–33.
96. Duchmann M, Wagner-Ballon O, Boyer T, Cheok M, Fournier E, Guerin E, et al. Machine learning identifies the independent role of dysplasia in the prediction of response to chemotherapy in AML. *Leukemia*. 2022 Mar 6;36(3):656–63.

97. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2018 Sep 10;36(26):2684–92.
98. Lim WS, Tardi PG, dos Santos N, Xie X, Fan M, Liboiron BD, et al. Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts. *Leuk Res*. 2010 Sep;34(9):1214–23.
99. Tardi P, Johnstone S, Harasym N, Xie S, Harasym T, Zisman N, et al. In vivo maintenance of synergistic cytarabine:daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. *Leuk Res*. 2009 Jan;33(1):129–39.
100. Ryan DH, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Ritchie EK, Stuart RK, et al. Efficacy and Safety of CPX-351 Versus 7+3 in a Subgroup of Older Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-Related Changes (AML-MRC) Enrolled in a Phase 3 Study. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):1425–1425.
101. Lancet JE, Uy GL, Laura F, Newell LF. Five-Year Final Results of a Phase 3 Study of CPX-351 Versus 7+3 in Older Adults with Newly Diagnosed High-Risk/Secondary Acute Myeloid Leukemia (AML): Outcomes By Age Subgroup and Among Responders. In: ASH meeting. 2020.
102. Chiche E, Rahmé R, Bertoli S, Dumas PY, Micol JB, Hicheri Y, et al. Real-life experience with CPX-351 and impact on the outcome of high-risk AML patients: a multicentric French cohort. *Blood Adv*. 2021 Jan 12;5(1):176–84.
103. Rautenberg C, Stölzel F, Röllig C, Stelljes M, Gaidzik V, Lauseker M, et al. Real-world experience of CPX-351 as first-line treatment for patients with acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2021 Oct 4;11(10):164.
104. Ikegawa S, Doki N, Kurosawa S, Yamaguchi T, Sakaguchi M, Harada K, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant overcomes poor prognosis of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes. *Leuk Lymphoma*. 2016 Jan 2;57(1):76–80.
105. Lee Y, Ichiki T, Okabe M, Kawaguchi Y, Ohbiki M, Osaki M, et al. Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-Related Changes Was Not a Prognostic Factor Under Allogenic

- Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019 Mar;25(3):S117.
106. Castaigne S, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie JN, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2012 Apr;379(9825):1508–16.
107. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017 Aug 3;377(5):454–64.
108. Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory *FLT3* -Mutated AML. *New England Journal of Medicine*. 2019 Oct 31;381(18):1728–40.
109. Seymour JF, Döhner H, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. Azacitidine improves clinical outcomes in older patients with acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes compared with conventional care regimens. *BMC Cancer*. 2017 Dec 14;17(1):852.
110. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019 Jan 3;133(1):7–17.
111. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT04269213. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04269213>.
112. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT04231851. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04231851>.
113. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT03978364. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03978364>.

114. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT03330821. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03330821>.
115. Fisher C. A human homolog of Additional sex combs, ADDITIONAL SEX COMBS-LIKE 1, maps to chromosome 20q11. *Gene*. 2003 Mar 13;306:115–26.
116. Fisher CL, Randazzo F, Humphries RK, Brock HW. Characterization of *Asxl1*, a murine homolog of Additional sex combs, and analysis of the *Asx*-like gene family. *Gene*. 2006 Mar;369:109–18.
117. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of ASXL2 gene in silico. *Int J Oncol*. 2003;
118. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of ASXL3 gene in silico. *Int J Oncol*. 2004;24(6).
119. ASXL1 (additional sex combs like 1 (*Drosophila*)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2011;15(5):391–4.
120. Milne TA, Sinclair DAR, Brock HW. The Additional sex combs gene of *Drosophila* is required for activation and repression of homeotic loci, and interacts specifically with Polycomb and super sex combs. *Mol Gen Genet*. 1999 Jun;261(4–5):753–61.
121. Fisher CL, Lee I, Bloyer S, Bozza S, Chevalier J, Dahl A, et al. Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with *Cbx2* in mice. *Dev Biol*. 2010 Jan;337(1):9–15.
122. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012 Dec 21;5(1):12.
123. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccioni N, et al. Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 Jun;145(6):788–800.
124. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):343–9.

125. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell*. 2012 Aug;22(2):180–93.
126. Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, et al. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation—altering ASXL1 mutations. *Journal of Clinical Investigation*. 2013 Nov 1;123(11):4627–40.
127. Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M, Dey A, Trimarchi T, Chung YR, et al. Deletion of *Asxl1* results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2013 Nov 18;210(12):2641–59.
128. Wang J, Li Z, He Y, Pan F, Chen S, Rhodes S, et al. Loss of *Asxl1* leads to myelodysplastic syndrome–like disease in mice. *Blood*. 2014 Jan 23;123(4):541–53.
129. Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, Lohse I, Durante MA, Li J, et al. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood*. 2018 Jan 18;131(3):328–41.
130. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2011 Jun 30;364(26):2496–506.
131. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 May 25;24(5):1062–5.
132. Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer*. 2010 Dec 2;10(1):401.
133. Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, et al. Prognostic Significance of *ASXL1* Mutations in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Jun 20;29(18):2499–506.

134. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Jul 1;25(7):1200–2.
135. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccia N, Esterni B, et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010 Nov;151(4):365–75.
136. Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, Haferlach C, Kern W, Cross NCP, et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia*. 2011 May 22;25(5):877–9.
137. Jankowska AM, Makishima H, Tiu R v., Szpurka H, Huang Y, Traina F, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3932–41.
138. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, et al. Mutation analysis of *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *MPL*, *NF1*, *SF3B1*, *SUZ12*, and *TET2* in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Aug;51(8):743–55.
139. Stein BL, Williams DM, O’Keefe C, Rogers O, Ingersoll RG, Spivak JL, et al. Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica*. 2011 Oct 1;96(10):1462–9.
140. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia*. 2014 Jul 5;28(7):1494–500.
141. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*. 2012 Mar 1;97(3):388–92.

142. Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4086–94.
143. Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adélaïde J, et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010 Feb 29;24(2):469–73.
144. Kakosaiou K, Panitsas F, Daraki A, Pagoni M, Apostolou P, Ioannidou A, et al. *ASXL1* mutations in AML are associated with specific clinical and cytogenetic characteristics. *Leuk Lymphoma*. 2018 Oct 3;59(10):2439–46.
145. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*. 2015 Mar 1;100(3):324–30.
146. Ohgami RS, Ma L, Merker JD, Gotlib JR, Schrijver I, Zehnder JL, et al. Next-generation sequencing of acute myeloid leukemia identifies the significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 mutations. *Modern Pathology*. 2015 May;28(5):706–14.
147. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2012 Mar 22;366(12):1079–89.
148. Lipilkin PV, Kulaeva ED, Mashkina EV. Prognostic value of ASXL1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Leuk Res*. 2022 Sep;120:106910.
149. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6920–9.
150. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013 Jan 11;27(1):82–91.

151. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul 22;36(7):1703–19.
152. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep 3;26(9):1908–75.
153. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012 Sep 5;26(9):1986–2010.
154. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. 2019 Aug 29;33(8):1851–67.
155. Willatt L, Morgan SM, Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009 an international system for human cytogenetic nomenclature. *Hum Genet*. 2009;
156. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel; New York: Karger; 2013.
157. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: Paris, France: Karger; 2016.
158. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S. ISCN 2020. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger; 2020.
159. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015 May;17(5):405–24.
160. Skidmore ZL, Wagner AH, Lesurf R, Campbell KM, Kunisaki J, Griffith OL, et al. GenVisR: Genomic Visualizations in R. *Bioinformatics*. 2016 Oct 1;32(19):3012–4.
161. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias:

integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200-1228.

162. Bruford EA, Antonescu CR, Carroll AJ, Chinnaiyan A, Cree IA, Cross NCP, et al. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) recommendations for the designation of gene fusions. *Leukemia*. 2021 Nov 6;35(11):3040–3.



