

## Leucemia aguda

COORDINADORES: J. ESTEVE. *Barcelona*  
J. DÍAZ-MEDIAVILLA. *Madrid*

### Resumen del simposio

El conocimiento biológico de la leucemia aguda ha experimentado un gran avance en los últimos años, que está permitiendo dilucidar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Además, este progreso tiene implicaciones clínicas evidentes, como una mayor precisión en el establecimiento del pronóstico de las diversas formas de leucemia, que es la base sobre la que se desarrollan estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo. Un beneficio adicional es el descubrimiento de dianas terapéuticas frente a las que puedan desarrollarse fármacos específicos (*molecularly targeted therapy*). En este simposio hemos querido reunir cinco ejemplos de este progreso en la biología de la leucemia desde distintas perspectivas.

Hasta hace poco, la leucemia linfoblástica T (LLA-T) se consideraba una entidad relativamente homogénea cuyos mecanismos leucemogénicos apenas se conocían. El descubrimiento de la activación anómala de la vía de señalización NOTCH, debida a diversas mutaciones de varios de sus componentes, constituye una de las anomalías más comúnmente presentes en la LLA-T, hallazgo al que ha contribuido de manera fundamental el Dr. Adolfo Ferrando y su grupo. Así, en la actualidad se reconocen diversas subentidades en la LLA-T con pronóstico diferenciado, para los que empiezan a proponerse tratamientos diversos. Por otra parte, el descubrimiento de trastornos en la regulación de determinadas vías de señalización celular permite el diseño de nuevos fármacos, como es el caso de los inhibidores de gamma-secretasas, que contrarrestarían la activación anómala de NOTCH.

Las diversas anomalías citogenéticas reconocidas en la leucemia mieloide aguda (LMA) constituían, hasta hace poco, el campo primordial de conocimiento biológico de la enfermedad y el principal criterio pronóstico. El reconocimiento de diversas mutaciones genéticas, que afectan a factores de transcripción o vías de señalización reguladoras del ciclo celular, en muchos pacientes sin alteraciones citogenéticas ha cambiado la perspectiva de la LMA en los últimos años, a la vez que ha permitido refinar la categorización pronóstica de la LMA. Con todo, son muchas las incertidumbres alrededor de estas mutaciones, sus interacciones y los factores moduladores de su efecto. La Dra. Mireia Camós abordará en su charla el significado clínico de las principales anomalías moleculares en la LMA.

El reconocimiento del impacto pronóstico de estas lesiones moleculares debe repercutir, lógicamente, en el diseño de las estrategias terapéuticas de la LMA. Una consecuencia fundamental de ello es el establecimiento más preciso de las indicaciones de trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (TPH), para lo que son esenciales los análisis de los resultados del TPH basados en criterios biológicos, a lo que el Dr. Jan Cornelissen ha contribuido abundantemente. El estudio del papel de las nuevas modalidades de TPH a la luz de categorías biológicas de LMA nos debe permitir una utilización más racional de dicho procedimiento terapéutico.

Los mecanismos epigenéticos, que conllevan cambios en la expresión génica a través de procesos como la metilación de ADN o las modificaciones de las histonas, han irrumpido muy recientemente en la comprensión de la fisiopatología de la leucemia aguda. El desarrollo de herramientas tecnológicas con gran capacidad para el conocimiento del estado de metilación nos ha aportado una nueva visión de la LMA, con marcadas diferencias en el estado de metilación entre diversas subentidades, en parte conocidas gracias al trabajo de la Dra. María Figueroa. La disponibilidad de fármacos con capacidad de revertir el estado de metilación confiere todavía un interés mayor al conocimiento de las anomalías de metilación en las neoplasias mieloides.

Si bien es cierto que todo este avance de conocimiento de la biología de la LMA no ha tenido todavía una gran repercusión en el tratamiento, es evidente que se han revelado numerosas potenciales dianas moleculares y ello ha generado el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra dichas dianas. Alguno de estos fármacos, como los inhibidores FLT3, se encuentran en fases avanzadas de desarrollo clínico, y sus frutos clínicos se conocerán en los próximos años. La gran expectación generada por estos nuevos agentes terapéuticos será revisada por el Dr. Jordi Sierra, desde su experiencia prolongada en el diseño de protocolos terapéuticos.

## IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES RELEVANTES EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA. IMPACTO CLÍNICO

M. CAMÓS<sup>1</sup>, M. TORREBADELL<sup>2</sup>,  
M. PRATCORONA<sup>2,3</sup>, M. ROZMAN<sup>2</sup>, J. ESTEVE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departament d'Hematologia. Laboratori Clínic. Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat (Barcelona). <sup>2</sup>Unitat d'Hematopatologia y <sup>3</sup>Departament d'Hematologia. IDIPABS. Hospital Clínic de Barcelona

### Introducción

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) es una enfermedad clonal heterogénea, producida por el acúmulo en las células progenitoras hematopoyéticas de anomalías genéticas que alteran los mecanismos normales de proliferación, diferenciación y autorrenovación celular. Estas lesiones afectan a la función de diferentes moléculas de señalización, factores de transcripción y receptores de factores de crecimiento y determinan el fenotipo de la leucemia (Dohner *et al.*, 2008). El cariotipo en el momento del diagnóstico constituye, junto con la edad del paciente, el principal factor pronóstico en cuanto a la respuesta al tratamiento, riesgo de recidiva y supervivencia global (Dohner *et al.*, 2008). De esta forma, la citogenética segrega unas categorías de diferente riesgo pronóstico: favorable, con una supervivencia global superior al 60%, que incluye las LMA que afectan al *core binding factor* (LMA-CBF) y la leucemia promielocítica (LPA); desfavorable, que incluye los cariotipos complejos y, particularmente, los pacientes con monosomías como marcadores de muy mal pronóstico, con una supervivencia inferior al 10% (Breems *et al.*, 2008). Aproximadamente la mitad de casos de LMA presentan una citogenética normal (LMA-CN) y quedan englobados en una heterogénea categoría de riesgo intermedio. En los últimos años se han descrito en los casos de LMA-CN múltiples alteraciones moleculares, que incluyen mutaciones y alteraciones en la expresión de diferentes genes. La detección de alteraciones moleculares en la LMA es relevante en la práctica clínica por diferentes motivos: 1) permite el diagnóstico específico de diferentes subtipos de LMA no definidos por la citogenética convencional; 2) permite delimitar el pronóstico para cada subtipo de LMA y aplicar una terapia ajustada al riesgo específico de cada caso; 3) algunas de las alteraciones moleculares identificadas pueden constituir una diana terapéutica específica, y 4) determinadas lesiones moleculares pueden ser útiles en el seguimiento de los pacientes como marcadores de enfermedad residual mínima (ERM).

### Identificación y pronóstico de las alteraciones moleculares en la LMA-CN

Las características de las principales alteraciones moleculares descritas en pacientes con LMA se encuentran resumidas en la Tabla 1.

1. **Mutaciones de FLT3:** El gen *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3), localizado en 13q12, codifica una proteína de clase III de los receptores tirosincinasa (RTK). Mediante la unión a su ligando FLT3 activa las vías de STAT5a, RAS/MAP-K y PI3-K, que incrementan la proliferación y supervivencia de las células. FLT3 se expresa en dos tercios de los casos de LMA, a niveles superiores a los observados en los progenitores hematopoyéticos normales (Renneville *et al.*, 2008). En la LMA, las mutaciones de FLT3 producen una activación constitutiva del receptor independiente de ligando y, por tanto, un aumento de la proliferación y supervivencia de las células, aunque también provocan un bloqueo de la diferenciación mieloide a través de la inhibición de CEBPA y PU.1. Se han identificado mutaciones de FLT3 en dos dominios funcionales: en el dominio yuxtamembrana en forma de duplicaciones internas en tándem (FLT3-ITD), y como mutaciones puntuales en el dominio de activación de cinasas (FLT3-TKD) (Renneville *et al.*, 2008).

La FLT3-ITD se observa en el 30-35% de los pacientes con LMA-CN y se asocia a hiperleucocitosis y a un mayor porcentaje de blastos en la médula ósea. Múltiples estudios han demostrado un impacto clínico desfavorable de la FLT3-ITD debido a un aumento del riesgo de recidiva y a una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y menor supervivencia global (SG) (Gale *et al.*, 2008; Schlenk *et al.*, 2008). El pronóstico de la FLT3-ITD parece estar modulado por el nivel de alelo mutado y no depender solamente de la presencia o ausencia de la mutación. En este sentido, se ha descrito que los pacientes con FLT3-ITD y pérdida de expresión del alelo germinal tienen peor evolución (Gale *et al.*, 2008). Por otro lado, la cuantificación del nivel relativo del alelo mutado permite definir distintos subgrupos pronósticos: aquellos pacientes con una baja ratio alélica de mutación presentan una supervivencia equiparable a aquellos pacientes sin FLT3-ITD (Gale *et al.*, 2008; Torreadell *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha sugerido que el tamaño de la duplicación también influye en el pronóstico, aunque diferentes estudios muestran resultados contradictorios (Gale *et al.*, 2008).

Las mutaciones puntuales en el dominio tirosincinasa (FLT3-TKD) se presentan en el 11-14% de los pacientes con LMA-CN, y su impacto pronóstico resulta controvertido: algunos estudios no observaron valor pronóstico de las FLT3-TKD; por el contrario, otros trabajos han señalado un impacto desfavorable o incluso favorable en la evolución de los pacientes (Bacher *et al.*, 2008; Whitman *et al.*, 2008).

Tabla 1. Características de las principales alteraciones moleculares detectadas en pacientes con LMA

		Frecuencia (%)		Leucocitos	Asociación a alteraciones citogenéticas	Asociación a alteraciones moleculares		Pronóstico	Comentarios
		Todas LMA	LMA-CN			Positiva	Negativa		
1	FLT3-ITD	20	28-34	↑	CN t(15;17) t(6;9)	NPM1 PML-RARalfa	c-KIT RAS CEBPA	Peor SG y SLE, mayor RR	Peor si mutación homocigota; valor pronóstico de la ratio alelo mutado/germinal
2	FLT3-TKD	5-10	11-14	↑	CN 14-24% inv(16)	NPM1 CBFB-MYH11		Controvertido	Importancia nivel de alelo mutado
3	NPM1	25-35	45-65	↑	CN 35-40% del9q 15% trisomía 8	FLT3-ITD (40%) FLT3-TKD	CEBPA	Genotipo favorable: NPM1mut/ FLT3wt: mejor SG y SLE	No beneficio TPH alogénico en 1.ª RC
4	CEBPA	4-9	10-18	NS	CN 40% del9q	↑ expresión BAALC	NPM1 FLT3-ITD	Mejor SG y SLE	Pronóstico favorable sólo si mutación bialélica
5	MLL-PTD	5-10	5-10	NS	50% trisomía 11		CEBPA NPM1	Mayor RR	
6	KIT	2-8	baja	↑	30% CBF	RUNX1-RUNX1T1		Peor pronóstico*	
7	N-RAS	10-15	9-14	NS	40% CBF	CBFB-MYH11	FLT3-ITD	No impacto pronóstico	Mayor sensibilidad a citarabina
8	K-RAS	5	3	NS	25% inv(3) 5-17% CBF		FLT3-ITD	No impacto pronóstico	Mayor sensibilidad a citarabina
9	WT1	10	10	↑ si FLT3-ITD asociada	CN	CEBPA FLT3-ITD ↑ expresión BAALC ↑ expresión ERG		Controvertido	Peor pronóstico si asociado a FLT3-ITD

CN: cariotipo normal; ITD: internal tandem duplication; NS: no significativo; RC: remisión completa; RR: riesgo de recidiva; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; TKD: tyrosine kinase domain; TPH: trasplante de progenitores hemopoyéticos. \* Controvertido, no en todos los estudios.

El estado mutacional de FLT3 puede variar durante la evolución del paciente: algunos casos no presentan la mutación original en la recidiva y otros la adquieren en ese momento. Esta inestabilidad dificulta el uso de FLT3 como marcador de ERM y sugiere que se trata de un evento genético secundario aparecido en una subclona de blastos y no en la *stem-cell* leucémica (Renneville *et al.*, 2008).

**2. Mutaciones de NPM1:** El gen nucleofosmina (NPM1, B23, numatrin, NO38), en el cromosoma 5q35, codifica una proteína con funciones oncogénicas o antioncogénicas, dependiendo del nivel de expresión, de la interacción con otras proteínas y de su localización. En condiciones normales, interviene en el transporte entre el núcleo y el citoplasma de diferentes partículas, regula la progresión del ciclo celular, la respuesta al estrés celular y la vía de arf-p53 a múltiples niveles (Dohner *et al.*, 2008; Renneville *et al.*, 2008). Las mutaciones a nivel del exón 12 del gen NPM1 representan la anomalía genética más frecuente en la LMA, ya que se observan en el 30% de LMA y en el 50-60% de LMA-CN. Aunque se han descrito más de 40 mutaciones diferen-

tes, más del 95% resultan en una inserción de 4 pb en la posición 960; esto provoca una señal adicional de salida nuclear y la pérdida de los residuos de triptófano 290 y 288, que determinan la localización nucleolar. Como consecuencia, se produce una deslocalización citoplasmática aberrante de la proteína y alteración de sus funciones. Las mutaciones de tipo A (TCTG) representan el 70-80% de los casos, mientras que las de tipo B y D suponen el 15-20% de los casos. Las mutaciones de NPM1 son estables durante la evolución de la enfermedad, lo que posibilita su uso como marcador de ERM. Se presentan preferentemente en mujeres y en leucemias hiperleucocitósicas. Morfológicamente los blastos suelen presentar un núcleo hendido (*cuplike* o signo de la impronta de dedo), y en el fenotipo destaca la negatividad para CD34 de los blastos (Dohner *et al.*, 2008; Renneville *et al.*, 2008). Las mutaciones de NPM1 son mutuamente excluyentes de las translocaciones t(8;21), inv(16) y t(15;17) y también son infrecuentes en cariotipos complejos. Respecto a otras alteraciones moleculares, se asocian a FLT3-ITD o FLT3-TKD, pero no a mutaciones de CEBPA ni del gen MLL. Se ha con-

firmado un pronóstico favorable de las mutaciones de NPM1 siempre y cuando no se acompañen de FLT3-ITD, con una supervivencia equiparable a la de pacientes de riesgo genético favorable.

**3. Mutaciones de CEBPA:** El gen *CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$*  (CEBPA), en el cromosoma 19q13.1, codifica un factor de transcripción implicado en la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia la línea mieloide madura. CEBPA inhibe la proliferación celular, disminuye la expresión de c-myc y aumenta la expresión de genes específicos de la línea granulocítica, en sinergia con otros genes como el complejo CBF y PU.1 (Lin *et al.*, 2005). CEBPA es una proteína de 42 kDa con cuatro dominios: en su parte C-terminal contiene un dominio (bZIP) que media la dimerización de la proteína y un dominio de unión a DNA; en la parte N-terminal se encuentran los dominios de regulación y transactivación TAD1 y TAD2. Las mutaciones de CEBPA pueden ser de dos tipos: las mutaciones que afectan a la parte C-terminal resultan en una deficiente dimerización y/o unión al DNA; las mutaciones en la parte N-terminal llevan al aumento de traducción de una isoforma truncada de la proteína de 30 kDa con actividad inhibitoria sobre la proteína de 42 kDa. Aunque algunos pacientes sólo presentan una mutación, otros casos presentan dobles lesiones, la mayoría bialélicas. Las mutaciones de CEBPA (9% LMA; 20% LMA-CN) se asocian a los subtipos M1-M2, y presentan un fenotipo característico (CD7+, CD34+, HLA-DR+ y CD15+) (Lin *et al.*, 2005; Marcucci *et al.*, 2008a). Se han descrito como mecanismos alternativos de inactivación de CEBPA la disminución de su expresión en las t(8;21) y el silenciamiento del promotor del gen por hipermetilación en un nuevo subgrupo de LMA identificado por su perfil de expresión génica (Figueroa *et al.*, 2009). Existe una correlación negativa con las mutaciones de NPM1 y FLT3-ITD, aunque muy infrecuentemente se han descrito casos asociados a estas lesiones. Las mutaciones de CEBPA confieren un pronóstico favorable, con una supervivencia similar a la de los pacientes de bajo riesgo citogenético. Sin embargo, el impacto pronóstico favorable parece limitarse a los casos con dobles mutaciones de CEBPA y sin FLT3-ITD (Pabst *et al.*, 2009; Renneville *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2009b).

**4. MLL-PTD:** El gen MLL, localizado en 11q23, se encuentra reordenado en la LMA mediante translocaciones recíprocas o duplicaciones parciales en tándem de los exones 5 a 11 del gen (MLL-PTD). A diferencia de las proteínas quiméricas de fusión de MLL, las MLL-PTD conservan todos los dominios funcionales de la proteína y silencian el alelo MLL germinal a través de mecanismos epigenéticos. Esta alteración se detecta en el 5-11% de LMA-CN y se asocia a una menor duración de la remisión completa y menor SLE (Dohner *et al.*, 2008).

**5. Mutaciones de WT1:** El gen del tumor de Wilms (WT1), en 11p13, es un importante regulador de la transcripción de genes implicados en el crecimiento y metabolismo celular. La alteración de su función promueve la proliferación de los precursores hematopoyéticos y bloquea la diferenciación celular. WT1 se expresa en el 75-100% de las LMA y se ha utilizado como marcador de ERM en diferentes estudios. Se han descrito mutaciones de WT1 en un 10-15% de LMA-CN, preferentemente en los exones 7 y 9. A nivel molecular se han observado alteraciones concomitantes como la FLT3-ITD, mutaciones de CEBPA y de NPM1 y una elevada expresión de ERG y BAALC. El impacto pronóstico de las mutaciones de WT1 es controvertido y se ha sugerido que sólo los casos asociados a FLT3-ITD presentan un mal pronóstico (Gaidzik *et al.*, 2009; Paschka *et al.*, 2008).

**6. Mutaciones de KIT:** El protooncogén KIT, en el cromosoma 4q12, es un receptor tirosin-cinasa de clase III implicado en la transducción de señales en vías de proliferación, diferenciación y supervivencia. Se han descrito mutaciones de KIT en el 2-8% de LMA, a nivel de los exones 8 y 17 del gen. En las LMA-CBF las mutaciones de KIT representan el 12-20% de los casos y se asocian a hiperleucocitosis y a un mayor riesgo de recidivas (Mrozek *et al.*, 2008).

**7. Mutaciones de RAS:** Los oncogenes RAS regulan la transducción de señales a través de la unión a diferentes receptores de membrana como c-KIT y FLT3. Las mutaciones de N-RAS producen una activación constitutiva de la proteína y se observan en el 10-15% de LMA-CN, sin haberse demostrado un impacto pronóstico en estos casos (Neubauer *et al.*, 2008).

**8. Alteración en el nivel de expresión génica:** Diversos estudios han analizado en la LMA-CN el papel pronóstico de la elevada o baja expresión de determinados genes, como ERG, BAALC, WT1, MN1, PRAME, EVI1 o FOXO3a (Santamaria *et al.*, 2009a; Santamaria *et al.*, 2009b). La combinación de la expresión de estos genes permitiría refinar el pronóstico de los pacientes, aportando información adicional al estado mutacional de NPM1, FLT3 y CEBPA.

---

### Cooperación entre alteraciones moleculares

La multiplicidad de lesiones genómicas que frecuentemente coexisten en una célula leucémica refleja la sucesiva acumulación de eventos durante la leucemogénesis. Probablemente se produce en primer lugar una disregulación de genes implicados en el mantenimiento celular y reparación de DNA, lo que lleva a una inestabilidad genómica que predispone a la aparición de nuevas alteraciones moleculares (Renneville *et al.*, 2008). Estos eventos moleculares pertenecen a dos grupos complementarios: los denominados

de tipo I, que activan vías de transducción de señales y producen un aumento de proliferación y/o supervivencia de los progenitores hematopoyéticos y los eventos de tipo II, que afectan a factores de transcripción y producen un bloqueo de la diferenciación celular. Generalmente coexisten alteraciones de los dos grupos en un mismo caso y raramente coinciden dos alteraciones del mismo tipo en un mismo paciente, quizás porque esto daría lugar a una redundancia funcional (Renneville *et al.*, 2008). En la Tabla 1 se reflejan las principales asociaciones entre alteraciones moleculares en la LMA.

### Alteraciones moleculares como dianas terapéuticas

El conocimiento de las vías implicadas en las alteraciones moleculares descubiertas ha posibilitado el uso de terapias dirigidas. Así, muchas de las alteraciones moleculares descritas han sido consideradas potenciales dianas terapéuticas, a través de terapia única dirigida o bien asociada a la quimioterapia convencional. Las mutaciones que afectan a RTK (FLT3, c-KIT), pueden beneficiarse de inhibidores específicos de tirosín-cinasas. A su vez, las proteínas RAS requieren un proceso de farnesilación para ser activas, por lo que se ha estudiado el tratamiento con inhibidores de la farnesil-transferasa en casos de LMA con mutaciones de RAS. También se ha analizado el papel de la terapia epigenética con agentes hipometilantes e inhibidores de histona-deacetilasas en los casos de LMA y MLL-PTD, tratamiento bajo el cual se consiguió reactivar la transcripción del alelo MLL germinal y una mayor muerte de los blastos. En las LMA con pérdida de función de CEBPA existen datos clínicos con resultados muy favorables con regímenes de quimioterapia con altas dosis de citarabina (Renneville *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha descrito que los pacientes con genotipo NPM1mut/FLT3wt presentan una evolución aún más favorable cuando se añade ácido *all*-trans retinoico a la quimioterapia (Schlenk *et al.*, 2009).

### Aportaciones de las nuevas tecnologías de análisis genómico

En los últimos años la introducción de nuevas tecnologías de análisis global como los *microarrays* de DNA y la secuenciación completa del genoma humano han aportado nuevos conocimientos en el estudio de la LMA. Desde el primer estudio de perfil de expresión génica (PEG) en cáncer en 1999, que confirmó una firma génica diferente de la LMA de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), se han realizado múltiples estudios del transcriptoma en diferentes poblaciones y

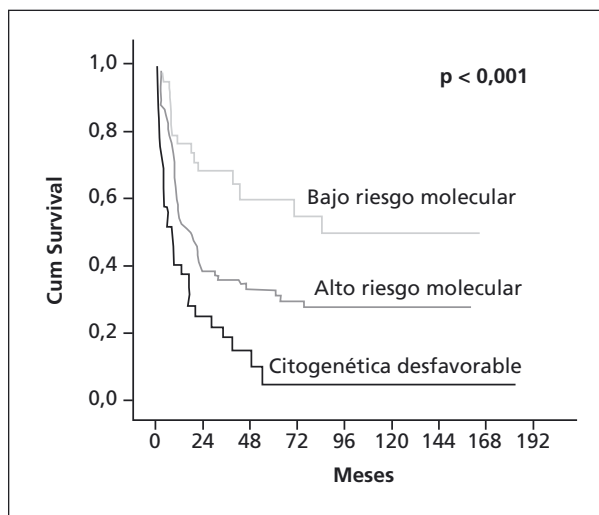


Figura 1. Supervivencia global de una serie de 181 pacientes con LMA de riesgo intermedio o desfavorable tratados homogéneamente en un solo centro (Torrebadell *et al.*, 2009). Categorías definidas por la combinación de datos genéticos y moleculares. La categoría de bajo riesgo molecular incluye los pacientes con genotipo favorable: citogenética de riesgo intermedio y NPM1mut/FLT3germinal o NPM1/FLT3-ITD con ratio alelo mutado/germinal (m/wt)  $\leq 0,31$ ; la categoría de alto riesgo molecular engloba los pacientes con citogenética de riesgo intermedio y NPM1germinal o FLT3-ITD con ratio m/wt  $> 0,31$ .

con diferentes finalidades: 1) predecir subtipos definidos por características genéticas/moleculares o por su pronóstico; 2) identificar nuevos subgrupos de LMA, y 3) identificar los genes o vías implicadas en la leucemogénesis en determinados subtipos de LMA (Wouters *et al.*, 2009a). Mediante el estudio del PEG se pueden identificar de forma consistente los casos de LMA y citogenética favorable (t(15;17), LMA-CBF). Las mutaciones de CEBPA bialélicas también presentan una firma génica distintiva, a diferencia de las mutaciones heterocigotas únicas (Marcucci *et al.*, 2008a; Verhaak *et al.*, 2009). Las LMA con mutación de NPM1 presentan un perfil de sobreexpresión de genes HOX y TALE característico pero no específico, ya que las LMA con alteración en el gen MLL o las t(6;9) muestran un perfil similar. Por el contrario, las mutaciones que afectan a vías de señalización (FLT3-ITD, RAS) no mostraron un PEG específico (Verhaak *et al.*, 2009). Por otro lado, los estudios de PEG han servido para identificar, dentro de las LMA-CBF, subgrupos con diferente evolución clínica, en los que se han podido identificar distintas vías patogénicas implicadas (Mrozek *et al.*, 2008). Recientemente, el estudio de PEG ha permitido definir un nuevo subtipo de leucemia caracterizado por un silenciamiento de CEBPA por hipermetilación de su promotor, un fenotipo inmaduro mielóide/linfóide T y frecuentes mutaciones del gen NOTCH1 (Figueroa *et al.*, 2009). Diferentes estudios han intentado identificar firmas génicas predictivas del pronóstico

en la LMA: Bullinger *et al.* seleccionaron 133 genes que diferenciaban dos subgrupos de LMA-CN con diferente pronóstico, en parte relacionado con la presencia de FLT3-ITD (Wouters *et al.*, 2009a). En nuestro grupo hemos identificado una serie de genes relacionados con un peor pronóstico en pacientes con LMA-CN sin anomalías moleculares asociadas, relacionados con vías de proliferación y apoptosis (Camos *et al.*, 2009).

Recientemente se han incorporado otras técnicas de análisis, como el estudio de niveles de microRNA (miRNA), *arrays* para análisis de cambios en el número de copias de DNA (SNP-*arrays*, CGH-*arrays*), estudios epigenéticos y la secuenciación del DNA genómico. De forma similar al mRNA, se han identificado perfiles de miRNA para algunos subtipos de LMA (Garzon *et al.*, 2008; Marcucci *et al.*, 2008b). Diferentes estudios de SNP-*arrays* han demostrado un patrón de inestabilidad genómica y una presencia relativamente común de pérdida de heterocigosidad a través de un mecanismo de disomía uniparental parcial en LMA (Wouters *et al.*, 2009a).

## Conclusiones

En los últimos años se han realizado en amplias series de pacientes diversos análisis del valor pronóstico individual de las diferentes alteraciones moleculares descritas, así como de la combinación de diferentes anomalías en un mismo caso (Gaidzik *et al.*, 2009; Marcucci *et al.*, 2008a; Renneville *et al.*, 2009; Santamaria *et al.*, 2009b; Schlenk *et al.*, 2008; Torrebadell *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2009b). Todos los trabajos confirman que el genotipo NPM1mut/FLT3wt y el genotipo CEBPAmut se asocian a una evolución favorable, con una supervivencia similar a la de la LMA-CBF. Además, estos casos no parecen beneficiarse del tratamiento con trasplante alogénico en primera remisión completa. Por tanto, los pacientes con LMA y genotipo favorable (NPM1mut/FLT3wt o CEBPAmut) deberían clasificarse dentro de la categoría de riesgo favorable (Dohner *et al.*, 2008; Schlenk *et al.*, 2008). En el resto de pacientes de genotipo no favorable se ha analizado el impacto pronóstico de otras variables moleculares, como la ratio de la mutación de FLT3 (Figura 1) o la presencia concomitante de otras alteraciones moleculares (Gaidzik *et al.*, 2009; Langer *et al.*, 2009; Marcucci *et al.*, 2008a; Paschka *et al.*, 2008; Santamaria *et al.*, 2009a; Santamaria *et al.*, 2009b; Torrebadell *et al.*, 2009).

En resumen, en la LMA las alteraciones moleculares son importantes factores predictivos de la respuesta al tratamiento y la supervivencia. Por tanto, en el diagnóstico de la LMA se deben realizar estudios citogenéticos y moleculares, ya que la combinación de los hallazgos de ambas técnicas posibilita una mejor pre-

dicción de la evolución del paciente y permite seleccionar el tratamiento más apropiado según el riesgo de cada caso, especialmente en la LMA-CN.

## Bibliografía

- Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008; 111: 2527-37.
- Breems, DA; van Putten, WL; De Greef, GE; Van Zelder-Bholla, SL; Gerssen-Schoorl, KB; Mellink, CH; Nieuwint, A; Jotterand, M; Hagemeyer, A; Beverloo, HB, and Lowenberg, B. (2008). Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J. Clin. Oncol.* (26) 4791-4797.
- Camos, M; Kalko, SG; Torrebadell, M; Pratcorona, M; Rozman, M; Díaz-Beyá, M; Costa, D; Carrio, A; Campo, E; Montserrat, E, and Esteve, J. (2009). Gene expression profile might predict prognosis in patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML) lacking NPM1 and FLT3 mutations. Comunicación personal, EHA 14th Congress, Berlin (abstract 0292).
- Dohner, K and Dohner, H. (2008). Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* (93) 976-982.
- Figuerola, ME; Wouters, BJ; Skrabanek, L; Glass, J; Li, Y; Erpelinck-Verschueren, CA; Langerak, AW; Lowenberg, B; Fazzari, M; Grealley, JM; Valk, PJ; Melnick, A, and Delwel, R. (2009). Genome-wide epigenetic analysis delineates a biologically distinct immature acute leukemia with myeloid/T-lymphoid features. *Blood* (113) 2795-2804.
- Gaidzik, VI; Schlenk, RF; Moschny, S; Becker, A; Bullinger, L; Corbacioglu, A; Krauter, J; Schlegelberger, B; Ganser, A; Dohner, H, and Dohner, K. (2009). Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* (113) 4505-4511.
- Gale, RE; Green, C; Allen, C; Mead, AJ; Burnett, AK; Hills, RK, and Linch, DC. (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* (111) 2776-2784.
- Garzon, R; Volinia, S; Liu, CG; Fernandez-Cymering, C; Palumbo, T; Pichiorri, F; Fabbri, M; Coombes, K; Alder, H; Nakamura, T; Flomenberg, N; Marcucci, G; Calin, GA; Kornblau, SM; Kantarjian, H; Bloomfield, CD; Andreeff, M, and Croce, CM. (2008). MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* (111) 3183-3189.
- Langer, C; Marcucci, G; Holland, KB; Radmacher, MD; Maharry, K; Paschka, P; Whitman, SP; Mrozek, K; Baldus, CD; Vij, R; Powell, BL; Carroll, AJ; Kollitz, JE; Caligiuri, MA; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2009). Prognostic Importance of MN1 Transcript Levels, and Biologic Insights From MN1-Associated Gene and MicroRNA Expression Signatures in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.*
- Lin, LI; Chen, CY; Lin, DT; Tsay, W; Tang, JL; Yeh, YC; Shen, HL; Su, FH; Yao, M; Huang, SY, and Tien, HF. (2005). Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin. Cancer Res.* (11) 1372-1379.
- Marcucci, G; Maharry, K; Radmacher, MD; Mrozek, K; Vukosavljevic, T; Paschka, P; Whitman, SP; Langer, C; Baldus, CD; Liu, CG; Ruppert, AS; Powell, BL; Carroll, AJ; Caligiuri, MA; Kollitz, JE; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2008a). Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically

- normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* (26) 5078-5087.
- Marcucci, G; Radmacher, MD; Maharry, K; Mrozek, K; Ruppert, AS; Paschka, P; Vukosavljevic, T; Whitman, SP; Baldus, CD; Langer, C; Liu, CG; Carroll, AJ; Powell, BL; Garzon, R; Croce, CM; Kolitz, JE; Caligiuri, MA; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2008b). MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* (358) 1919-1928.
- Mrozek, K; Marcucci, G; Paschka, P, and Bloomfield, CD. (2008). Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* (20) 711-718.
- Neubauer, A; Maharry, K; Mrozek, K; Thiede, C; Marcucci, G; Paschka, P; Mayer, RJ; Larson, RA; Liu, ET, and Bloomfield, CD. (2008). Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* (26) 4603-4609.
- Pabst, T; Eyholzer, M; Fos, J, and Mueller, BU. (2009). Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br. J. Cancer* (100) 1343-1346.
- Paschka, P; Marcucci, G; Ruppert, AS; Whitman, SP; Mrozek, K; Maharry, K; Langer, C; Baldus, CD; Zhao, W; Powell, BL; Baer, MR; Carroll, AJ; Caligiuri, MA; Kolitz, JE; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2008). Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol.* (26) 4595-4602.
- Renneville, A; Boissel, N; Gachard, N; Naguib, D; Bastard, C; de, BS; Nibourel, O; Pautas, C; Reman, O; Thomas, X; Gardin, C; Terre, C; Castaigne, S; Preudhomme, C, and Dombret, H. (2009). The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia (AML) is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication (FLT3-ITD). *Blood*
- Renneville, A; Roumier, C; Biggio, V; Nibourel, O; Boissel, N; Fenaux, P, and Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* (22) 915-931.
- Santamaria, CM; Chillon, MC; Garcia-Sanz, R; Perez, C; Caballero, MD; Ramos, F; de Coca, AG; Alonso, JM; Giraldo, P; Bernal, T; Queizan, JA; Rodriguez, JN; Fernandez-Abellan, P; Barez, A; Penarrubia, MJ; Vidriales, MB; Balanzategui, A; Sarasquete, ME; Alcoceba, M; az-Mediavilla, J; San Miguel, JF, and Gonzalez, M. (2009a). High FOXO3a expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics. *Leuk. Res.*
- Santamaria, CM; Chillon, MC; Garcia-Sanz, R; Perez, C; Caballero, MD; Ramos, F; Garcia de, CA; Alonso, JM; Giraldo, P; Bernal, T; Queizan, JA; Rodriguez, JN; Fernandez-Abellan, P; Barez, A; Penarrubia, MJ; Balanzategui, A; Vidriales, MB; Sarasquete, ME; Alcoceba, M; az-Mediavilla, J; San Miguel, JF, and Gonzalez, M. (2009b). Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia (CN-AML). *Blood*
- Schlenk, RF; Dohner, K; Kneba, M; Gotze, K; Hartmann, F; Del, VF; Kirchen, H; Koller, E; Fischer, JT; Bullinger, L; Habdank, M; Spath, D; Groner, S; Krebs, B; Kayser, S; Corbacioglu, A; Anhalt, A; Benner, A; Frohling, S, and Dohner, H. (2009). Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* (94) 54-60.
- Schlenk, RF; Dohner, K; Krauter, J; Frohling, S; Corbacioglu, A; Bullinger, L; Habdank, M; Spath, D; Morgan, M; Benner, A; Schlegelberger, B; Heil, G; Ganser, A, and Dohner, H. (2008). Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* (358) 1909-1918.
- Torrebadell, M; Camos, M; Pratorcorona, M; Rozman, M; Rovira, M; Martínez, C; Fernández-Avilés, F; Carrio, A; Costa, D; Montserrat, E; Carreras, E, and Esteve, J. (2009). Prognostic risk assessment based on combined cytogenetics and molecular screening for optimal choice of post-remission therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* (43) S1 (abstract O280)-
- Verhaak, RG; Wouters, BJ; Erpelinck, CA; Abbas, S; Beverloo, HB; Lugthart, S; Lowenberg, B; Delwel, R, and Valk, PJ. (2009). Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica* (94) 131-134.
- Whitman, SP; Ruppert, AS; Radmacher, MD; Mrozek, K; Paschka, P; Langer, C; Baldus, CD; Wen, J; Racke, F; Powell, BL; Kolitz, JE; Larson, RA; Caligiuri, MA; Marcucci, G, and Bloomfield, CD. (2008). FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood* (111) 1552-1559.
- Wouters, BJ; Lowenberg, B, and Delwel, R. (2009a). A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects. *Blood* (113) 291-298.
- Wouters, BJ; Lowenberg, B; Erpelinck-Verschueren, CA; van Putten, WL; Valk, PJ, and Delwel, R. (2009b). Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* (113) 3088-3091.

## EPIGENETIC Deregulation IN MYELOID Malignancies

M.E. FIGUEROA<sup>1</sup>, A. MELNICK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Supported by an ASH Fellow Scholar Award.

<sup>2</sup>Supported by NCI R01 CA104348, the Chemotherapy Foundation, the Sam Waxman Cancer Research Foundation, and the G&P Foundation and is a Leukemia and Lymphoma Society Scholar

The term “epigenetics” refers to heritable changes in gene expression patterns that are mediated by a mechanism other than a change in the underlying nucleotide sequence of the genes involved. Epigenetic regulation of gene expression is achieved through a series of chemical modifications to either the DNA itself or its associated histone proteins. Epigenetic modifications include DNA cytosine methylation and post-translational modifications of the histone tails at specific residues, including acetylation, methylation, phosphorylation and sumoylation<sup>1,2</sup>. These epigenetic modifications help to determine chromatin structure, and contribute to regulate gene expression by determining accessibility of transcription factors and other regulatory proteins to gene promoters and regulatory regions.

DNA methylation in mammals occurs at the cytosine residue of CpG dinucleotides and is involved in development, cell differentiation, X chromosome im-

printing and silencing of repetitive elements<sup>3,5</sup>. Methylation of CpG dinucleotides at promoter regions is associated with silencing of the corresponding gene<sup>6</sup>. DNA methylation exerts its effect on gene expression by creating binding sites for repressor proteins which recognize these methylated cytosines<sup>7,8</sup>, or by disrupting the ability of transcription factors to bind to their target sequences<sup>9,10</sup>. However, regulation of gene expression through DNA methylation and other epigenetic marks is more complex, since not only is the presence of these marks important, but their localization and density also seem to play a crucial role<sup>11-13</sup>.

DNA methylation plays a critical role in tissue differentiation and homeostasis during normal development<sup>3,4</sup>. Disruption of epigenetic regulation can profoundly alter a cellular phenotype resulting in aberrant cellular proliferation and survival, both of which are associated with the process of malignant transformation of cells. Epigenetic dysregulation is currently recognized as one of the hallmarks of cancer<sup>14,15</sup>. While normal cells present with hypermethylation of CpG dinucleotides located at repetitive elements and gene bodies, and almost complete absence of methylation at promoter associated CpG islands, the distribution of DNA methylation is completely disrupted in the malignant cell. Neoplastic cells show a redistribution of their DNA methylation pattern, presenting with a global reduction in the total content of 5-methylcytosine in their genomes with an aberrant increase in methylation of promoter associated CpG islands. This altered pattern in DNA methylation can result in genomic instability, aberrant silencing of tumor suppressors, and on occasion, activation of oncogenes<sup>6,14</sup>. Abnormal epigenetic silencing through DNA methylation at promoter regions of key negative cell cycle regulators and DNA repair genes has been demonstrated in many neoplasms, including myelodysplastic syndromes and acute leukemias<sup>16-22</sup>. However, epigenetic deregulation involves not only aberrant DNA methylation patterns but also chromatin remodeling factors and changes in histone modifications<sup>23,24</sup>.

In the last decade, gene expression profiling studies have been performed with the aim of dissecting the molecular subtypes of several neoplasms, in an effort to predict accurately tumor behavior and to identify important oncogenic genes and biological pathways. These studies have revealed the presence of unique gene expression signatures distinguishing specific subgroups of cancers and have served to improve our understanding of the biology of these diseases<sup>25,26</sup>. However, as mentioned above, only part of the cellular information is contained at the messenger RNA level, and the information contained in heritable epigenetic marks is therefore missed by gene expression studies. We hypothesized that epigenetic marks distribute into specific patterns in human disease, and that these

epigenetic profiles reflect critical biological differences. Using a genome wide DNA methylation profiling method we have been able to explore the nature of aberrant epigenetic programming in AML.

Several different methods for profiling genome-wide DNA methylation patterns have been developed in the past years. We use a method called HELP (**H**paII tiny fragment enrichment by **I**gitation-mediated **P**CR). HELP quantifies the abundance of CpG methylation throughout the genome by comparing the hypomethylated fraction of a given patient's genome to an unselected representation of the same patient's genome. The measurement of these genome fractions can be performed using high-density oligonucleotide microarrays or by deep sequencing<sup>29-31</sup>. A pilot study integrating information from gene expression, histone modifications (measured by Chromatin Immunoprecipitation microarrays) and DNA methylation by HELP demonstrated that the amount of biologically relevant information captured by gene expression arrays could be significantly increased when all three platforms were carried out in conjunction and the information from all three was integrated. Using this approach we were capable of detecting changes in gene expression levels that were missed by gene expression arrays but were detected by changes in epigenetic marks<sup>32</sup>.

More recently we used a similar approach to epigenetically characterize a subtype of acute leukemia within a cohort of patients that could not be readily distinguished based solely on their gene expression profiles. In this study, we determined the DNA methylation profiles of a group of patients that had been identified as sharing a common gene expression profile in a previous study<sup>27</sup>. Patients in this group were shown to present with either mutations of the *CEBPA* locus and expression of a mutant protein, or with silencing of this gene's expression through hypermethylation of its promoter region of this gene<sup>33</sup>. Genome-wide DNA methylation analysis could readily distinguish between these two groups in an unsupervised analysis, indicating that differences in their DNA methylation profiles were robust enough to segregate the two types of leukemia. Comparison of the two DNA methylation profiles, revealed that cases that with hypermethylation of the *CEBPA* promoter presented with an aberrantly methylated gene signature that consisted almost entirely of hypermethylated genes<sup>34</sup>. Based on their DNA methylation profiles, we could therefore distinguish two forms of leukemia within our cohort, a *CEBPA*-mutant and a *CEBPA*-silenced form. We further compared each of these two forms to normal CD34+ hematopoietic cells and found them to have distinct aberrant DNA methylation profiles. *CEBPA*-silenced leukemias displayed extensive hypermethylation when compared to nor-

mal CD34 cells, while CEBPA-mutant cases presented an equal proportion of aberrantly hyper and hypomethylated promoters. These CEBPA-silenced leukemias which also presented with aberrant expression of T cell markers were associated with a significantly worse clinical outcome than CEBPA-mutant cases and should be considered as a distinct clinical entity<sup>34</sup>.

Epigenomic studies have now become feasible within the context of clinical trials, thus opening a new window of opportunity for us to increase our understanding of the biology of acute leukemias. Early studies by our group and others have demonstrated that epigenomic profiling approaches can be used to classify leukemias<sup>32,35</sup>. Furthermore, epigenomic studies can help identify further levels of heterogeneity by characterizing the epigenetic variability of this disease. More comprehensive studies including larger cohorts of patients will allow us to identify specific epigenomic patterns associated with the different forms of the disease and will lead to a more accurate and biologically relevant molecular classification of leukemias.

## References

- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):6-21.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):915-26.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):247-57.
- Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*. 2001;293(5532):1086-9.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003 Nov 20;349(21):2042-54.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):187-91.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998 May 28;393(6683):386-9.
- Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*. 1988 Sep;2(9):1136-43.
- Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, et al. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol*. 2000 Jul 13;10(14):853-6.
- Brinkman AB, Pennings SW, Braliou GG, Rietveld LE, Stunnenberg HG. DNA methylation immediately adjacent to active histone marking does not silence transcription. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan 3.
- Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, Herman JG. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):194-201.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, et al. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8695-700.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006 Feb;6(2):107-16.
- Agrawal S, Hofmann WK, Tidow N, Ehrich M, van den Boom D, Koschmieder S, et al. The C/EBP[delta] tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Jan 18.
- Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood*. 1999 Oct 1;94(7):2445-51.
- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003;17(9):1813-9.
- Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 1999 Aug 1;59(15):3730-40.
- Tessema M, Langer F, Dingemann J, Ganser A, Kreipe H, Lehmann U. Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia*. 2003 May;17(5):910-8.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):793-7.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6870-5.
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1):103-7.
- McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3541-9.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*. 2002 Jan;30(1):41-7.
- Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Apr 15;350(16):1617-28.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937-47.
- Khulan B, Thompson R, Ye K, Fazzari Mj, Suzuki M, Stasiak E, et al. Comparative isoschizomer profiling of cytosine

- methylation: the HELP assay. *Genome Research*. 2006 August 2006;16(8):1046-55.
30. Figueroa ME, Melnick A, Grealley JM. Genome-wide determination of DNA methylation by Hpa II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) for the study of acute leukemias. *Methods Mol Biol*. 2009;538:395-407.
  31. Oda M, Glass JL, Thompson RF, Mo Y, Olivier EN, Figueroa ME, et al. High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Res*. 2009 Apr 22.
  32. Figueroa ME, Reimers M, Thompson RF, Ye K, Li Y, Selzer RR, et al. An integrative genomic and epigenomic approach for the study of transcriptional regulation. *PLoS ONE*. 2008;3(3):e1882.
  33. Wouters BJ, Jorda MA, Keeshan K, Louwers I, Erpelinck-Verschueren CA, Tielemans D, et al. Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3706-14.
  34. Figueroa ME, Wouters BJ, Skrabanek L, Glass J, Li Y, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Genome-wide epigenetic analysis delineates a biologically distinct immature acute leukemia with myeloid/T-lymphoid features. *Blood*. 2009 March 19, 2009;113(12):2795-804.
  35. Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, et al. H3K79 Methylation Profiles Define Murine and Human MLL-AF4 Leukemias. *Cancer Cell*. 2008;14(5):355-68.

## **ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN YOUNGER PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN FIRST COMPLETE REMISSION: APPLICATION OF SIBLING AND MATCHED UNRELATED DONORS**

J.J. CORNELISSEN

*Department of Hematology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, the Netherlands*

### **Introduction**

Several prospective studies have addressed the role of alloSCT in patients with AML in first remission in each of the 3 commonly accepted cytogenetic subcategories. Randomized controlled trials (RCT) are generally the gold standard for the evaluation of treatment efficacy, but a randomized comparison of alloSCT versus chemotherapy or autologous SCT has so far not been performed in patients with AML in first remission. Alternatively, a genetic randomization has been proposed and has been applied by different cooperative groups. As the availability of a matched sibling donor is essentially a random process, the presence or absence of a donor can be used as a surrogate for randomization. These studies obviously require considerable numbers of patients as well as mature follow-up in order to evaluate the net effect of (long-term)

adverse and favorable effects with sufficient power. Furthermore, in order to study alloSCT in a sufficient number of patients, combining prospective studies of similar design in a meta-analysis may add to the conclusions and interpretation of each individual study.

### **AlloSCT using sibling donors for younger AML patients in first CR**

Although several individual studies had shown a significant reduction of relapse by alloSCT, no beneficial effect on overall survival was demonstrated. However, the first meta-analysis of 5 earlier studies by Yanada *et al.* clearly showed improved outcome for patients with poor-risk cytogenetics. The role of alloSCT in intermediate risk AML, however, was less clear<sup>1</sup>. The MRC study<sup>2</sup> had suggested improved survival in patients with an intermediate risk AML, but the EORTC/GIMEMA study<sup>3</sup> rather suggested a beneficial effect restricted to AML with a poor risk profile. The more recent BGMT study, using an adapted risk-index, however, showed an advantage for intermediate risk patients<sup>4</sup>. The recent study performed by the HOVON/SAKK consortium showed improved DFS in both intermediate and poor-risk patients<sup>5</sup>. Given these not entirely concordant results, the absence of a significant overall benefit in survival in intermediate risk AML, and the availability of new data from studies of similar design, a new meta-analysis was performed using the combined dataset of the HOVON/SAKK, MRC, EORTC and BGMT studies<sup>5</sup>. Relapse, NRM, DFS and OS results were analyzed by donor availability for all patients and then broken down for cytogenetic risk category. The findings from all four studies proved fairly similar with a statistically significant OS benefit of 12% (HR=0.84, CI 0.74-0.95, p=0.01) for all patients without favorable cytogenetics. While relapse was also strongly reduced in patients with a favorable risk profile, a counterbalancing NRM of approximately 20% prevented an improvement of alloSCT on survival to emerge. Therefore, myeloablative alloSCT cannot generally be recommended for patients in first complete remission with cytogenetic favorable subtypes of AML where the relapse probability is 35% or less. Collectively, these results demonstrate that in the context of a NRM of 20%, the beneficial effect of alloSCT becomes apparent as soon as the risk of relapse exceeds approximately 30-40%, irrespective of the specific type of underlying cytogenetic abnormality, that causes the higher relapse rate. Moreover, it indicates that the immunotherapeutic effect (graft versus leukemia) is similarly exerted in all those subcategories of AML.

Most patients with AML in first CR are characterized by an intermediate risk profile. While most of these leukemias lack a specific karyotypic abnormality

ty, molecular genetic markers such as gene mutations and deregulated gene expression can be identified. Approximately 50% of cytogenetically normal AML may carry a mutation in the nucleophosmin (NPM1) gene<sup>6</sup>. The prognostic value of the presence of the NPM1 mutation appeared to depend on the additional presence of the internal tandem duplication (ITD) in the FLT3 tyrosine kinase receptor (FLT3/ITD)<sup>7-10</sup>. Myeloid leukemia's characterized by the NPM1 mutation but without FLT3/ITD, appeared to exhibit a more favorable prognosis with relapse rates less than 30%. In contrast, the presence of the FLT3/ITD, either with or without mutated NPM1, identified a subset of AML clearly associated with an unfavorable prognosis. What is the role of alloSCT in these newer molecular categories of AML? First, as outlined above, in favorable cytogenetic subgroups of AML characterized by a relapse risk of less than 35%, the beneficial effect of alloSCT on relapse was offset by NRM and meta-analysis of donor versus no donor studies failed to show a beneficial effect of alloSCT<sup>(4,5)</sup>. Accordingly, it may be argued that it will be difficult, if not impossible, to show a beneficial effect of alloSCT in the newer (molecular) categories of AML that are also associated with a low relapse rate. Patients with these types of AML may then be offered an alloSCT in case of relapse, as is currently the approach for patients with cytogenetic favorable subtypes. That approach could be adhered in AML with a normal karyotype but with a NPM1 mutation without FLT3/ITD and in case of mutation of the CCAAT/enhancer binding protein (CEBPA), which also has been associated with a favorable prognosis<sup>11,12</sup>. The role of alloSCT in the treatment of FLT3/ITD positive patients is currently subject of debate<sup>13-15</sup>. Three cooperative groups have recently reported on outcome after alloSCT in FLT3/ITD-positive AML<sup>13-15</sup>. While all three studies showed a strong reduction of relapse with hazard ratio's of approximately 50%, only the German study by Schlenk *et al.* showed significantly improved survival by donor availability<sup>15</sup>. Similar to the above-described cooperative studies focusing on the cytogenetic intermediate group, these results would require a meta-analysis in a sufficient number of FLT3/ITD-positive patients. Meanwhile, it seems reasonable to offer alloSCT to all AML patients with a relapse risk exceeding 35%, because so far, these and other results do not indicate that the immunotherapeutic effect of alloSCT on relapse differs among cytogenetic<sup>5</sup> or molecular<sup>13-15</sup> subcategories of AML associated with a higher risk of relapse.

### **AlloSCT in younger AML patients in first CR using matched unrelated donors**

Currently, more than 10 million HLA-typed volunteer donors from approximately 50 registries around the

world appear in the Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) file ([www.bmdw.org](http://www.bmdw.org)). It has resulted in a high probability (70-80%) of finding at least one HLA-A, -B, and -DR-matched donor for any Caucasian patient. The probability of finding a match for HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ, however, is considerably less (35-40%). Recent report confirmed that the risk of GVHD, graft failure, and mortality increases progressively with the number of HLA disparities, emphasizing the importance of high-resolution HLA typing and the selection of donors with, preferably, no more than one mismatched allele out of 8. Despite improvements in supportive care and HLA matching, outcome following unrelated donor alloSCT seems still inferior to that after HLA-identical sibling transplantation<sup>18-20</sup>. However, as a result of a number of developments, NRM following unrelated donor alloSCT has gradually declined the last decades and such transplants are now also offered to AML patients in first CR<sup>19,20</sup>. Preliminary results of the German Multicenter AML 01/099 trial were reported by Krauter *et al.*<sup>21</sup>. Patients with AML in first CR and a high risk profile were in principle eligible for an unrelated donor search if no HLA-identical sibling donor was available. First results showed better overall survival in recipients of an alloSCT as compared to autologous SCT, irrespective of donor type. Importantly, while unrelated donor alloSCT may be associated with more NRM, the anti-leukemic effect may also be more pronounced as a result of the higher degree of HLA-incompatibility as compared to matched sibling donors and thereby stronger GVL-effect. As a result, net results of sibling and properly matched unrelated donor alloSCT may come very close as suggested by several studies comparing sibling and unrelated donor SCT<sup>22-24</sup>.

While it is beyond doubt that high resolution HLA typing has considerably improved matching between donor and recipient and thereby outcome<sup>25</sup>, NRM following myeloablative unrelated donor alloSCT may still be somewhat higher as compared to sibling alloSCT. The risk of NRM progressively increases with the number of HLA disparities, emphasizing the importance of high-resolution HLA typing and the selection of donors with, preferably, no more than one mismatched allele out of 8<sup>26</sup>. In the latter study, rates of NRM were estimated at 36% in recipients with low-risk disease, who received a fully 8/8 allele matched graft as compared to 45% in recipients of one allele mismatched graft. Lee *et al.* also showed that younger patients with early stage disease and 8/8 donors had excellent survival and their NRM was estimated at less than 20%<sup>26</sup>. These results show that apart from allele matching other variables such as age significantly predict for NRM, as is the case following sibling alloSCT. In our recent meta-analysis of sibling alloSCT in 4 larger AML-studies<sup>5</sup>, age significantly predicted outcome,

which effect was mainly exerted by higher NRM in patients older than 40 years. Apart from age, other variables such as CMV, cytokine polymorphism, gendercombination, and especially comorbidities may significantly predict for NRM. The Seattle group recently demonstrated the relevance of comorbidity indices for predicting outcomes in patients undergoing allogeneic SCT<sup>27-31</sup>. The hematopoietic cell transplantation (HCT) comorbidity index (CI), based on a number of comorbidities was developed in a training set of 708 SCT recipients and validated in 346 patients. In the training set a HCT-CI of 0, 1 or 2 resulted in a 2 yr NRM rate of 9, 14 and 27%, respectively, which proved equivalent to results in the validation set. A higher CI score of 3 or  $\geq 4$  resulted in NRM rates of 40-43%<sup>29</sup>. Collectively, these studies suggest that acceptable rates of NRM following myeloablative conditioning and allele matched unrelated donor SCT can be expected in younger patients or those with low comorbidity scores. Therefore, it may be argued that patients, whose AML is characterized by a relapse risk  $> 50\%$  and for whom NRM can be estimated  $< 25\%$ , qualify for an unrelated donor search and subsequent alloSCT, even in first CR, if an allele matched donor can be identified and no other risk factors for NRM are present.

## Conclusion

It has become clear that a risk adapted approach should be adhered in decision making for alloSCT in AML. Apart from risk factors associated with the underlying leukemia, also risk factors that predict for NRM should be weighed and taken into account. Patients with intermediate or poor risk AML in first CR qualify for an alloSCT from an HLA-identical sibling donor, especially in younger patients. Matched unrelated donor alloSCT may be applied in those patients if the risk of NRM, as can be estimated by age, comorbidities and degree of matching, does not exceed 25% in intermediate risk AML and 30-35% in poor-risk AML. Patients in first CR with a very high risk of relapse but without a matched unrelated donor may alternatively qualify for alloSCT using cord blood, or haploidentical family donors, but preferably within the context of prospective studies.

## References

1. Yanada M, Matsuo K, Emi N, et al. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* 103:1652-1658, 2005.
2. Burnett AK, Wheatley AH, Goldstone RF et al. The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML10 Trial: *Br J Haematol* 118:385-400, 2002.
3. Suci S, Mandelli F, De Witte T, et al. Allogeneic compared to autologous stem cell transplantation in the treatment of patients  $< 46$  years old with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention to treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial: *Blood* 102:1232-1240, 2003.
4. Jourdan E, Boiron JM, Dastague N, et al. Early allogeneic stem-cell transplantation for young adults with acute myeloblastic leukemia in first complete remission: an intent-to-treat long-term analysis of the BGMT experience. *J Clin Oncol* 23:7676-7684, 2005.
5. Cornelissen JJ, van Putten WLJ, Verdonck LF, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* 109:3658-3666, 2007.
6. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype (Erratum in: *N Engl J Med.* 352: 740, 2005). *N Engl J Med* 352:254-266, 2005.
7. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106:3740-3746, 2005.
8. Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106:3733-3739, 2005.
9. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107:4011-4020, 2006.
10. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106:3747-3754, 2005.
11. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22:624-633, 2004.
12. Van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 4:31-40, 2003.
13. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients excluding acute promyelocytic leukemia from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 106:3658-3665, 2005.
14. Bornhäuser M, Illmer T, Schaich M, et al. Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML (letter). *Blood* 109:2264, 2007.
15. Schlenk RF, Corbacioglu A, Krauter J, et al. Gene mutations as predictive markers for postremission therapy in younger adults with normal karyotype AML. *Blood* 108:6a, 2006 (abstr).
16. Kern W, Schoch C, Haferlach T, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 56:283-309, 2005.
17. Laane E, Derolf AS, Björklund E, et al. The effect of allogeneic stem cell transplantation on outcome in younger acute myeloid leukemia patients with minimal residual disease detected by flow cytometry at the end of post-remission chemotherapy. *Haematologica* 91:833-836, 2006.
18. Sierra J, Storer B, Hansen JA, et al. Unrelated donor marrow transplantation for acute myeloid leukemia: an update for the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant* 26:397-404, 2000.

19. Appelbaum FR Hematopoietic cell transplantation from unrelated donors for treatment of patients with acute myeloid leukemia in first complete remission. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 20:67-75, 2007.
20. Zuckerman T, Rowe JM. Alternative donor transplantation in acute myeloid leukemia: which source and when? *Curr Opin Hematol* 14:152-161, 2007.
21. Krauter J, Heil G, Hoelzer D, et al. Role of consolidation therapy in the treatment of patients up to 60 years with high risk AML. *Blood* 106:172, 2005 (abstr).
22. Moore J, Nivison-Smith I, Goh K, et al. Equivalent survival for sibling and unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:601-607, 2007.
23. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol* 24:5695-5702, 2006.
24. Cutler C, Li S, Ho VT, et al. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 109: 3108-3114, 2007.
25. Petersdorf EW. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 11:386-391, 2004.
26. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. Prepublished on September 4, 2007, as DOI 10.1182/blood-2007-06-097386.
27. Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, et al. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared to myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA matched related donors. *Blood* 104: 1550-1558, 2004.
28. Sorror ML, Maris MB, Storer B, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* 104:961-968, 2004.
29. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risks assessment before allogeneic HCT. *Blood* 106:2912-2919, 2005.
30. Sorror ML, Giral S, Sandmaier BM, et al. Hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index as an outcome predictor for patients with acute myeloid leukemia in first remission: combined FHCRC and MDACC experiences. Prepublished on September 14, 2007, as DOI 10.1182/blood-2007-06-096966.
31. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, et al. Comorbidity and disease status based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation: *J Clin Oncol* 25:4246-4254, 2007.

## NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

J. SIERRA, S. BRUNET

*Servicio de Hematología.*

*Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona*

*Universitat Autònoma de Barcelona*

## Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad heterogénea con gran diversidad clínica y biológica. Esta afirmación se basa en los nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de esta enfermedad<sup>1</sup>, de modo particular en los aspectos de genética molecular. Así, se han identificado más de 100 mutaciones y/o reordenamientos de genes en la LMA<sup>2-6</sup>. Su caracterización es importante, ya que permite establecer el pronóstico con más precisión.

La leucemogénesis en la LMA es, en la mayoría de los casos, el resultado de mutaciones que cooperan entre sí y que son potenciales dianas terapéuticas<sup>(2)</sup>. La relevancia conceptual y el significado pronóstico de muchas de estas alteraciones en el genotipo han hecho que se reconozcan como marcadores de nuevas entidades, en la reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud<sup>7</sup>. Adicionalmente, la introducción de tratamientos dirigidos a dianas moleculares ha puesto énfasis en el valor de una caracterización precisa de la LMA<sup>8</sup>. Con todo, estos avances no restan importancia –sino que los complementan– a los hallazgos del estudio citogenético convencional que permite separar a los pacientes con LMA en tres grupos pronósticos<sup>9</sup>, favorable, intermedio (que incluye el cariotipo normal, presente en el 45% de las LMA) y adverso. Por su parte, las alteraciones moleculares más importantes que perfilan todavía mejor el pronóstico en estos grupos citogenéticos son, en el favorable, las mutaciones del gen *c-KIT*<sup>10,11</sup>, y en el pronóstico intermedio, las mutaciones del gen de la nucleofosmina (*NPM1*)<sup>12,13</sup>, la duplicación interna en tándem (*DIT*) del gen *FLT3* (*DIT/FLT3*)<sup>14,15</sup>, las mutaciones del gen *CEBPA*<sup>13,16,17</sup>, las mutaciones de los genes *RAS*<sup>18</sup>, la duplicación parcial en tándem del gen *MLL*<sup>19</sup> y la mutación del gen del tumor de Wilms (*WT1*)<sup>20</sup>.

Recientemente se ha descubierto que en la LMA, junto a las alteraciones propias de los genes, tienen una gran importancia anomalías epigenéticas como su hipermetilación o la desacetilación de las histonas. En consecuencia, se ha comenzado a investigar el tratamiento desmetilante e inhibidor de las histonas desacetilasas con resultados prometedores. También de reciente descubrimiento es la necesidad para la proliferación leucémica de neovascularización; para evitarla, se han desarrollado fármacos antiangiogénicos como la lenalidomida, particularmente eficaces en pacientes con ciertas alteraciones citogenéticas.

Estrategias menos novedosas que las anteriores pero también importantes en la LMA son el desarrollo de nuevos fármacos como la clofarabina o el amonafide, los nuevos estudios con anticuerpos monoclonales frente a dianas antigénicas, como el antígeno CD33, y los esfuerzos por modular genes y proteínas de resistencia a drogas, una estrategia poco exitosa hasta la fecha.

Tabla 1. Nuevos agentes en el tratamiento de la LMA

Clase	Fármaco	Diana
Anticuerpos monoclonales	Gemtuzumab ozogamicina	CD33
Inhibidores tirosincinasa	CEP-701, midostaurina, sunitinib, sorafenib	FLT3
Inhibidores de la farnesil transferasa	Tipifarnib	RAS
Hipometilantes	Decitabina, 5-azacitidina	Mutación ADN
Inhibidores de las HDAC	Ácido valproico, vorinostat, fenilbutirato, panobinostat	HDAC
Inhibidores del mTOR	Rapamicina, tensirolimus, RAD001	mTOR
Antiangiogénicos	Lenalidomida	VEGF
Proteasoma	Bortezomib	Proteasoma
Citotóxicos Análogos nucleósidos	Citarabina, clofarabina, troxacitabina	ADN
Alquilantes Inhibidores topoisomerasa	Cloretazina Amonafide	
Diferenciadores	ATRA	Receptor ATRA

Dado que la LMA es una enfermedad frecuente en sujetos de edad avanzada, con una mediana de edad de 70 años<sup>21-23</sup>, que con frecuencia toleran mal el tratamiento intensivo, se hacen necesarias estrategias ajustadas al riesgo<sup>21,24-27</sup> que tengan en cuenta las comorbilidades individuales<sup>28,29</sup>. Estas comorbilidades deben considerarse para decidir la opción terapéutica, junto a otros factores como la edad, la citogenética y los conocimientos genéticos antes mencionados<sup>13,26</sup>. Entre el abanico de modalidades de tratamiento deben considerarse los nuevos agentes que se revisan a continuación, que se han ensayado en la LMA no promielocítica del adulto (Tabla 1 y Figura 1).

### Anticuerpos monoclonales

Aunque no existe ningún marcador inmunofenotípico específico de LMA, suelen observarse combinaciones aberrantes ausentes en la hemopoyesis normal<sup>19,25,30</sup>. El antígeno CD33, restringido a los precursores hemopoyéticos normales, se expresa en el 90% de las células de la LMA y es por ello una buena diana terapéutica. Gemtuzumab ozogamicina (GO) es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD33, unido a un potente citotóxico la calicheamicina<sup>24</sup>. Los estudios en pacientes de edad avanzada en recaída demostraron una tasa de respuestas globales del 28%, 13% de ellas

consistentes en remisión completa (RC)<sup>31</sup>. A la luz de estos resultados, la Food and Drug Administration (FDA) americana aprobó el uso de GO como agente único para pacientes con LMA CD33+ en recaída de edad superior a 60 años. Actualmente están en marcha estudios prospectivos para analizar el impacto de GO junto a quimioterapia en diferentes etapas del tratamiento de la LMA<sup>25,32</sup>. Uno de ellos, el del Medical Research Council (MRC) ha completado el reclutamiento (AML15) y observado en 1.113 pacientes menores de 60 años que la adición de GO a la inducción y consolidación (ciclos 1 y 3) tuvo un impacto positivo en la

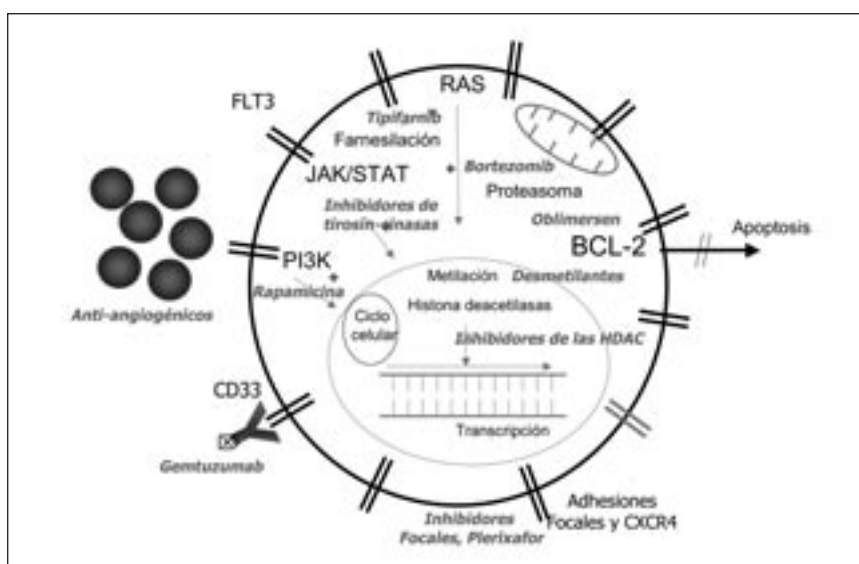


Figura 1. Fisiopatología molecular de la leucemia mieloide aguda: vías implicadas y fármacos para la terapia dirigida (en cursiva y color gris).

supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE) a los 3 años (51% vs. 40%;  $p = 0,008$ ) de los pacientes de riesgo intermedio<sup>33</sup>. Por su parte, el grupo SWOG tiene en marcha un estudio en el que añade o no GO a la quimioterapia de inducción y también aleatoriza el GO en el mantenimiento<sup>25</sup>. Un tercer protocolo, similar al del SWOG, está también activo en el grupo MRC (AML17)<sup>25</sup>.

Por otro lado, en pacientes de edad avanzada inelegibles para quimioterapia intensiva, el grupo EORTC-GIMEMA administró GO en monoterapia, seguida de 2 ciclos de consolidación con GO, con una respuesta global del 17%<sup>34</sup>. En el mismo tipo de pacientes, el grupo MRC investiga actualmente la combinación de dosis bajas de citarabina con GO<sup>25,32</sup>. Otros esquemas posibles son la administración de quimioterapia de inducción junto a dosis fraccionadas de GO. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta el riesgo de enfermedad venooclusiva hepática cuando se administra GO y quimioterapia, una complicación que parece reducirse si se da una dosis inferior de GO a la utilizada en monoterapia<sup>25</sup>.

### Inhibidores de tirosincinasa

El receptor tirosincinasa FLT3 y su ligando son importantes para la proliferación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos tempranos. Este receptor está presente en los progenitores hematopoyéticos normales, así como en los blastos de la LMA. Existen mutaciones del gen del receptor FLT3 en un 20-27% de LMA, en general duplicación interna en tándem (DIT), que conllevan su activación constitutiva. Múltiples estudios han demostrado que la presencia de DIT/FLT3 en pacientes con LMA-CN se asocia a mal pronóstico, con una SG disminuida debido a mayor riesgo de recaída (RR)<sup>4,13</sup>. El pronóstico parece particularmente desfavorable en ausencia del alelo germinal o cuando la ratio FLT3-ITD:FLT3-WT está aumentada<sup>4,13</sup>.

Por todo lo mencionado, el receptor FLT3 es una diana atractiva para el tratamiento con inhibidores<sup>3,4,15,35</sup>. Los inhibidores del gen FLT3 inactivan también otras tirosincinasas con diferente selectividad y especificidad, pero todos ellos reducen la tasa de proliferación e inducen apoptosis, debido a sobreexpresión de proteínas reguladoras. Se han ensayado o están actualmente en curso diversos estudios con inhibidores del gen FLT3: PKC-412 (midostaurin, Novartis), CEP-701 (lestaurtinib, Cephalon), MLN-518 (tandutinib, Millenium) y SU11248 (sunitinib, Pfizer) y Bay 43-9006 (sorafenib)<sup>26,32,36-38</sup>. Los estudios en fase I-II con estos compuestos administrados por vía oral muestran respuestas significativas pero transitorias<sup>37,39,40</sup>. Por ello los ensayos se dirigen ahora a su combinación con quimioterapia<sup>41,42</sup>.

El receptor tirosincinasa c-KIT se expresa en el 70% de las LMA, con mutaciones en el 10%. Este porcentaje aumenta al 30-40% si se trata de leucemias CBF y conlleva una SG inferior por mayor riesgo de recaída<sup>41</sup>. Imatinib es un potente inhibidor del c-KIT, y se han descrito respuestas transitorias en pacientes en recaída<sup>32,45</sup>. En sentido contrario, la asociación de imatinib con dosis bajas de citarabina en pacientes de edad avanzada con LMA y mutación de c-KIT no mejoró los resultados de la quimioterapia sola<sup>44</sup>. Actualmente, en pacientes con esta mutación se ensayan inhibidores más potentes como dasatinib y PKC-412<sup>10,32</sup>.

### Inhibidores de la farnesil-transferasa

Se detectan mutaciones de los genes RAS en un 10-15% de los pacientes con LMA; a pesar de carecer de significado pronóstico, las alteraciones de este gen constituyen una potencial diana terapéutica<sup>18</sup>. Diversos estudios han mostrado que no es necesario tener mutaciones de los genes RAS para responder a sus inhibidores. Tipifarnib es uno de los fármacos más desarrollados y evita la activación de la proteína RAS. En un estudio en fase 2 en pacientes en recaída o refractarios, una dosis de 600 mg/<sup>2</sup> por vía oral durante 21 días tuvo muy buena tolerancia pero la tasa de RC fue sólo del 4%<sup>45</sup>. Otro estudio en pacientes de edad avanzada inelegibles para tratamiento intensivo mostró una respuesta global del 23%, y la obtención de RC en un 14%, con una mediana de duración de la respuesta de 7 meses<sup>46</sup>. Recientemente, se han publicado los resultados de un estudio comparativo de tipifarnib frente al mejor tratamiento de soporte en pacientes de edad superior a 70 años con LMA *de novo*, con una tasa de RC del 8% y sin diferencias en la SG en los dos brazos del estudio<sup>47</sup>. En otra serie, la asociación de tipifarnib y etopósido oral en un régimen de 14 días ha mostrado una tasa de RC del 30%<sup>48</sup>. Por último, aunque no se trata de terapia dirigida, cabe destacar que los pacientes con LMA y mutaciones de los genes RAS parecen tener sensibilidad a las dosis altas de citarabina, tanto *in vitro* como *in vivo* con reducción de las recaídas respecto a las dosis convencionales<sup>49</sup>.

### Agentes hipometilantes

La metilación del ADN y otros eventos epigenéticos son de gran importancia en la progresión de las enfermedades malignas, sobre todo en las leucemias. En pacientes con hemopatías mieloides, la hipermetilación de los promotores de genes supresores tumorales como el p15 se asocia a progresión de la enferme-

dad y escasa respuesta al tratamiento. Por ello, hay un interés en desarrollar agentes hipometilantes del ADN. La decitabina es un análogo de las pirimidinas que, una vez incorporado al ADN, inhibe de manera irreversible las metiltransferasas. Ello conduce a la hipometilación de los promotores de los genes supresores tumorales, a la activación de estos genes supresores y a la diferenciación celular. Diferentes estudios apuntan que la decitabina o la 5-azacitidina pueden inducir respuestas en dosis bajas en pacientes con LMA refractaria<sup>50</sup>. La eficacia de los desmetilantes parece ser notable en pacientes con monosomía o deleción del cromosoma 7, o incluso en pacientes con cariotipo complejo. La asociación de agentes desmetilantes con inhibidores de las HDAC, como el ácido valproico, en pacientes de edad avanzada ha permitido obtener respuestas en el 50% de los pacientes en dos estudios<sup>51,52</sup>, pero con encefalopatía por valproico en uno de ellos. Otra pauta con buenos resultados en pacientes de edad avanzada fue la combinación de 5-azacitidina durante 7 días y GO el día 8, con tasas de RC del 75%<sup>53</sup>.

---

### Inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC)

La acetilación de las histonas facilita la transcripción de los genes. Este proceso está regulado por la acción antagónica de las histonas acetilasas y las HDAC. La desacetilación exagerada de las histonas tiene un papel en la leucemogénesis, al bloquear la transcripción y la diferenciación celular. Los inhibidores de las HDAC pretenden restaurar la acetilación normal. En estudios en fase I-II, se ha investigado una gran variedad de inhibidores HDAC como el fenilbutirato, el ácido valproico<sup>54</sup>, el vorinostat<sup>55</sup> y el panobinostat. Como monoterapia estos fármacos son poco eficaces y por ello se investigan con agentes hipometilantes. La asociación de ácido valproico con GO puede representar otra estrategia prometedora<sup>26</sup>.

---

### Inhibidores del mTOR

La diana de la rapamicina (mTOR) es un regulador clave del crecimiento y supervivencia de muchos tipos celulares. Su activación constitutiva se ha implicado en la patogénesis de varias neoplasias. Su actividad es específicamente inhibida por la rapamicina, macrólido con propiedades inmunosupresoras. En un estudio piloto de 23 pacientes la rapamicina indujo respuestas clínicas en 4 de 9 pacientes con LMA<sup>56</sup>. Actualmente se investigan otros inhibidores como tensirolimus y RAD001.

---

### Agentes antiangiogénicos

La angiogénesis tiene un papel crucial al facilitar el crecimiento tumoral y el proceso metastático. Se ha demostrado que las biopsias óseas de los pacientes con LMA muestran un aumento de la vascularización, comparado con las biopsias óseas normales. Además, las células de la LMA expresan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)<sup>57</sup>. Diversos estudios han mostrado que la lenalidomida tiene actividad antileucémica importante e incluso permite alcanzar RC en pacientes con mielodisplasia avanzada o LMA y presencia de la alteración 5q- entre otras anomalías cromosómicas. Por otra parte, recientemente se ha demostrado, en líneas celulares de LMA y en muestras de pacientes, que la adición de un inhibidor del receptor VEGF a la idarubicina es más eficaz que la quimioterapia sola<sup>58</sup>.

---

### Inhibición del proteasoma

El bortezomib tiene actividad antileucémica y efecto sinérgico *in vitro* con los inhibidores de las HDAC<sup>57</sup>. Este agente podría ser particularmente eficaz para eliminar las células madre leucémicas. Estudios en pacientes con LMA indican mayor inducción de apoptosis *in vitro* con bortezomib que con fármacos convencionales<sup>59</sup>. En la actualidad se halla en curso en nuestro medio un estudio en fase II de la combinación de FLAG-IDA más bortezomib en pacientes con LMA refractarios o en recaída.

---

### Nuevos citotóxicos

#### Análogos de los nucleósidos

La citarabina es esencial en el tratamiento de la LMA. Además de su papel en la inducción, las dosis altas en consolidación son eficaces para evitar las recidivas de las leucemias CBF<sup>21,57</sup>. Probablemente, la citarabina en dosis alta también es beneficiosa para los pacientes con LMA y mutaciones de RAS<sup>49</sup>, así como para aquellos con CN y mutación del gen de la nucleofosmina en ausencia de DIT/FLT3<sup>13</sup>.

La troxacitabina es un análogo de la lamivudina. Estudios en fase I y II de combinación con citarabina, realizados en pacientes con LMA refractaria, mostraron un 18% de respuestas en pacientes de edad superior a 50 años<sup>32,60</sup>. La clofarabina es un análogo de las purinas con actividad en pacientes con LMA en primera recaída o refractaria<sup>57,61</sup>. Se hallan en curso estudios en fase 1 y 2 en pacientes de edad avanzada no tratados previamente<sup>32,61</sup>, con el objetivo de incrementar la tasa de RC y la duración de la respues-

ta que se obtienen con citarabina. En un estudio en fase 2 de inducción con clofarabina 40 mg/m<sup>2</sup> i.v. durante 5 días (días 2-6) y 4 horas más tarde citarabina 1 g/m<sup>2</sup> durante 5 días (días 1-5), en pacientes de edad superior a 50 años con LMA, se observó una tasa de respuestas globales del 60% (52% RC y 5 pacientes RCp)<sup>62</sup>. Recientemente, se han publicado los resultados de un estudio que compara la clofarabina frente a clofarabina y dosis bajas de citarabina como inducción en pacientes de edad superior a 60 años y LMA *de novo*. La tasa de respuestas globales fue del 56%, con diferencias significativas a favor del tratamiento combinado, 63% vs. 31%, dada la mayor mortalidad en inducción del brazo de clofarabina sola<sup>63</sup>. Los ensayos actualmente en curso combinan la administración de citarabina ± GO ± antraciclinas, en pacientes de edad avanzada, y ayudarán a definir el papel de estos compuestos.

### Agentes alquilantes

La cloretazina es un nuevo agente alquilante activo en la LMA<sup>32</sup>. En un estudio fase I, la dosis máxima tolerada fue de 600 mg/m<sup>2</sup> i.v., y se alcanzó RC en 1 paciente. Ello conllevó un nuevo estudio en fase 1 combinando cloretazina con citarabina, en 32 pacientes con LMA, de los que se alcanzó una RC en el 27%. Las dosis limitantes por mielodepresión y toxicidad gastrointestinal fueron de 500-600 mg. En consecuencia, la dosis recomendada en estudios en fase II fue: cloretazina 600 mg/día 1 y citarabina 1,5 g/m<sup>2</sup> en infusión continua durante 3 días. Estudios en fase III cloretazina-citarabina en las dosis previamente descritas vs. citarabina-placebo, en pacientes en primera recaída, han mostrado tasas más altas de RC en el tratamiento combinado pero también más *exitus* en el brazo combinado, por lo que se investigan dosis inferiores de cloretazina<sup>64</sup>. Recientemente se ha reportado un 37% de RC con cloretazina sola, en pacientes con LMA de alto riesgo y edad superior a 70 años tratados al diagnóstico.

### Inhibidores de la topoisomerasa II

El amonafide es un inhibidor catalítico de la topoisomerasa II que, a diferencia de los clásicos inhibidores de la topoisomerasa II, es ATP-independiente y no es un sustrato para la glicoproteína-P. El amonafide ha demostrado eficacia en LMA en recaída y secundaria, con tasas de respuesta en LMA secundarias del 42%<sup>32</sup>. Actualmente ha iniciado el reclutamiento un ensayo en fase III comparando este agente más citarabina vs. daunorubicina y citarabina.

### Agentes diferenciadores

El ácido *all-trans*retinoico (ATRA) revolucionó el tratamiento de la leucemia promielocítica, al ser un tratamiento diana frente al gen quimérico PML/RARalfa y, además, inducir diferenciación celular. Varios estudios sugieren la capacidad del ATRA de inducir diferenciación de los blastos mieloides. Se han realizado estudios clínicos para evaluar estas hipótesis con resultados contradictorios<sup>26</sup>. En 2004 se publicó un estudio de 242 pacientes con LMA de edad superior a 60 años en el que se demostró en el brazo de ATRA una tasa de RC superior y asimismo una SG y SLE significativamente superior. Recientemente se ha observado que solamente los pacientes con mutación de la NPM1 mutada en ausencia de DIT/FLT3 pueden ser particularmente sensibles a la asociación de quimioterapia y ATRA<sup>65</sup>.

### Conclusiones

La integración de los conocimientos moleculares adquiridos en el diagnóstico de la LMA refleja que es una enfermedad heterogénea y compleja. La combinación de diferentes modalidades de tratamiento, con agentes clásicos y terapia innovadora dirigida a corregir la fisiopatología celular, puede conducir a una mejora de los resultados en un futuro no muy lejano.

### Bibliografía

1. Löwenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;1-11.
2. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;80-97.
3. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005;23:6285-6295.
4. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109:431-448.
5. Dohner K, Dohner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008;93:976-982.
6. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008;22:915-931.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. . IARC Press, Lyon, 2008:109-138.
8. Ravandi S, Burnett AK, Agura ED, Kantarjian HM. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2007;110:1900-1910.

9. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322-2333.
10. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C. C KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*. 2006;107:1791-1799.
11. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, C.D B. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2006;24:3904-3911.
12. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109:874-885.
13. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Dohner H. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358:1909-1918.
14. Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:274-281.
15. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98:1752-1759.
16. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004;22:624-633.
17. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009;113:3088-3091.
18. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*. 2006;107:3847-3853.
19. Munoz L, Aventin A, Villamor N, Junca J, Acebedo G, Domingo A, Rozman M, Torres JP, Tormo M, Nomdedeu JF. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Haematologica*. 2003;88:637-645.
20. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrozek K, Maharry K, Langer C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*. 2008;26:4595-4602.
21. Brunet S, Perea G, Esteve J, Berlanga J, Torres P, Queipo de Llano MP, Bueno J, Ribera JM, Tormo M, Llorente A, Bargay J, Guardia R, Pedro C, Sánchez J, Vivancos P, Martí JM, Font L, Nomdedeu JF, Montserrat E, Sierra J. Adverse impact of FLT3 internal tandem duplication in patients with poor-risk acute myeloid leukaemia allocated to autologous transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 2004;33 (Suppl 1):(Abstr 71):S73.
22. Sekeres MA. Treatment of older adults with acute myeloid leukemia: state of the art and current perspectives. *Haematologica*. 2008;93:1769-1772.
23. Estey EH. Treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2009;94:10-16.
24. Brunet S, Sierra J. Nuevos fármacos en el tratamiento de la leucemia aguda. *Haematologica*. 2006;91 (supl1):275-278.
25. Burnett AK, Knapper S. Targeting Treatment in AML. *Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:429-434.
26. Haferlach T. Molecular genetic pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;2008:400-411.
27. Sierra J, Brunet S. Risk-adapted treatment for adult acute myeloid leukemia. *Hematology Association*. 2009;3:30-37.
28. Erba HP. Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:420-427.
29. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, Maris MB, Baron F, Maloney DG, Scott BL, Deeg HJ, Appelbaum FR, Storb R. Comorbidity and disease status-based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2007;25:4246-4254.
30. San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Pérez JJ, González M, Orfao A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood*. 2001;98:1746-1751.
31. Larson RA, Boogaerts M, Estey E, Karanes C, Stadtmauer EA, Sievers EL, Mineur P, Bennett JM, Berger MS, Eten CB, Munteanu M, Loken MR, Van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR. Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*. 2002;16:1627-1636.
32. Amadori S, Stasi R. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Education: the education program for the Annual Congress of the European Hematology Association*. 2008;2:33-38.
33. Burnett AK, Kell WJ, Goldstone AH, Milligan D, Hunter A, Prentice AG, Russell NH, Gibson B, Wheatley K, Hills RK. The addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy for AML improves disease free survival without extra toxicity: preliminary analysis of 1115 patients in the MRC AML15 trial [abstract]. *Blood*. 2006;108:8a.
34. Amadori S, Suci S, Stasi R, Willemze R, Mandelli F, Selleslag D, Denzlinger C, Musto P, Stauder R, Berneman R, Pruijt J, Nobile F, Cassibba V, Marie J, Beeldens F, Baila L, Vignetti M, de Witte T. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as single-agent treatment for frail patients 61 years of age and older with acute myeloid leukemia: final results of AML-15B, a phase 2 study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Leukemia Groups. *Leukemia*. 2005;19:1768-1773.
35. Gilliland DG. FLT3 Inhibitors in the Treatment of AML. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2004;2:708-710.
36. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebowitz D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105:54-60.
37. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB, Caligiuri MA, Cooper MR, Lecerf JM, Karol MD, Sheng S, Holford N, Curtin PT, Druker BJ, Heinrich MC. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leu-

- mia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*. 2006;108:3674-3681.
38. Tallman MS. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19:311-320.
  39. Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausen T, Allebach J, Small D. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:3669-3676.
  40. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;98-117.
  41. Levis M, Douglas Smith B, Beran M, Baer MR, Erba HP, Cripe L, Coutre S, Advani A, Perl A, Devetten M, Stuart R, Tallman MS, Brown P, Tremmel L, Small D. A Randomized, Open-Label Study of Lestaurtinib (CEP-701), an Oral FLT3 Inhibitor, Administered in Sequence with Chemotherapy in Patients with Relapsed AML Harboring FLT3 Activating Mutations: Clinical Response Correlates with Successful FLT3 Inhibition [abstract]. *Blood*. 2005;106: 403.
  42. Stone RM, Fischer T, Paquette RL, Schiller G, Schiffer CA, Ehninger C, Cortes J, Kantarjian HM, DeAngelo DA, Yu R, Zhang L, Cohen PS, Wang Y, Phillips P, Giles F. Phase IB Study of PKC412, an Oral FLT3 Kinase Inhibitor, in Sequential and Simultaneous Combinations with Daunorubicin and Cytarabine (DA) Induction and High-Dose Cytarabine Consolidation in Newly Diagnosed Patients with AML [abstract]. *Blood*. 2005;106: 404.
  43. Cortes J, Kantarjian H. Beyond chronic myelogenous leukemia: potential role for imatinib in Philadelphia-negative myeloproliferative disorders. *Cancer*. 2004;100:2064-2078.
  44. Heidel F, Cortes J, Rucker FG, Aulitzky W, Letvak L, Kindler T, Huber C, Dohner H, Kantarjian H, Fischer T. Results of a multicenter phase II trial for older patients with c-Kit-positive acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (HR-MDS) using low-dose Ara-C and Imatinib. *Cancer*. 2007;109:907-914.
  45. Housseau JL, Lancet JE, Reiffers J, Lowenberg B, Thomas X, Huguet F, Fenaux P, Zhang S, Rackoff W, De Porre P, Stone R. A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109:5151-5156.
  46. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, Bruzek LM, Morris L, Park Y, Adjei AA, Kaufmann SH, Garrett-Mayer E, Greenberg PL, Wright JJ, Karp JE. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2007;109:1387-1394.
  47. Housseau JL, Martinelli G, Jedrzejczak WW, Brandwein JM, Bordessoule D, Masszi T, Ossenkoppelle GJ, Alexeeva JA, Beutel G, Maertens J, Vidrales MB, Dombret H, Thomas X, Burnett AK, Robak T, Khuageva NK, Golenkov AK, Tothova E, Mollgard L, Park YC, Bessems A, De Porre P, Howes AJ. A randomized phase 3 study of tipifarnib compared to best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) in patients 70 years or older. *Blood*. 2009.
  48. Karp JE, Flatten K, Feldman EJ, Greer JM, Loegering DA, Ricklis RM, Morris LE, Ritchie E, Smith BD, Ironside V, Talbott T, Roboz G, Le SB, Meng XW, Schneider PA, Dai NT, Adjei AA, Gore SD, Levis MJ, Wright JJ, Garrett-Mayer E, Kaufmann SH. Active oral regimen for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenous leukemia: a preclinical and phase 1 trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777, Zarnestra) combined with etoposide. *Blood*. 2009;113:4841-4852.
  49. Neubauer A, Maharry K, Mrozek K, Thiede C, Marcucci G, Paschka P, Mayer RJ, Larson RA, Liu ET, Bloomfield CD. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2008;26:4603-4609.
  50. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Craig SR, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*. 2004;103:1635-1640.
  51. Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, Rytting M, Wierda WG, Ravandi F, Koller C, Xiao L, Faderl S, Estrov Z, Cortes J, O'Brien S, Estey E, Bueso-Ramos C, Fiorentino J, Jabbour E, Issa JP. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood*. 2006;108:3271-3279.
  52. Blum W, Klisovic RB, Hackanson B, Liu Z, Liu S, Devine H, Vukosavljevic T, Huynh L, Lozanski G, Kefauver C, Plass C, Devine SM, Heerema NA, Murgo A, Chan KK, Grever MR, Byrd JC, Marcucci G. Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2007;25:3884-3891.
  53. Nand S, Godwin J, Smith S, Barton K, Germano E, Stiff P. Azacitidine Plus Gemtuzumab Ozogamicin (GO): A Novel Combination in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML) and High-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) in the Elderly [abstract]. *Blood*. 2007;108: 1981.
  54. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, Germing U, Haas R, Dohner H, Gattermann N. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2006;106:112-119.
  55. Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, Faderl S, Koller C, Morris S, Rosner G, Loboda A, Fantin VR, Randolph SS, Hardwick JS, Reilly JF, Chen C, Ricker JL, Secrist JP, Richon VM, Frankel SR, Kantarjian HM. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111:1060-1066.
  56. Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastre B. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105:2527-2534.
  57. Tallman MS. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:143-150.
  58. Barbarroja N, Torres LA, Luque MJ, Carretero RM, Valverde-Estepa A, Lopez-Sanchez LM, Rodriguez-Ariza A, Velasco F, Torres A, Lopez-Pedraza C. Additive effect of PTK787/ZK 222584, a potent inhibitor of VEGFR phosphorylation, with Idarubicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2009;37:679-691.
  59. Colado E, Alvarez-Fernandez S, Maiso P, Martin-Sanchez J, Vidrales MB, Garayoa M, Ocio EM, Montero JC, Pandiella A, San Miguel JF. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica*. 2008;93:57-66.
  60. Giles FJ, Kantarjian HM, Cortes JE, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Faderl S, Thomas DA, Ferrajoli A, O'Brien S, Wathen JK, Xiao LC, Berry DA, Estey E. Adaptive randomized study of idarubicin and cytarabine versus troxacitabine and cytarabine versus troxacitabine and idarubicin in untreated patients 50 years or older with adverse karyotype acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:1722-1727.
  61. Musto P, Ferrara F. Clofarabine: in search of combinations for the treatment of patients with high-risk acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008;113:1995-1998.

62. Faderl S, Verstovsek S, Cortes J, Ravandi F, Beran M, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Estrov Z, O'Brien S, Koller C, Giles FJ, Wierda W, Kwari M, Kantarjian HM. Clofarabine and cytarabine combination as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML) in patients 50 years of age or older. *Blood*. 2006;108:45-51.
63. Faderl S, Ravandi F, Huang X, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Estrov Z, Borthakur G, Verstovsek S, Thomas DA, Kwari M, Kantarjian HM. A randomized study of clofarabine versus clofarabine plus low-dose cytarabine as front-line therapy for patients aged 60 years and older with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2008;112:1638-1645.
64. Giles FJ. Laromustine: the return of alkylators to non-myeloablative therapy of AML. *Leuk Res*. 2009;33:1022-1023.
65. Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, Döhner H. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica*. 2009;94:54-60.