

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA**



**APORTACIÓN DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO EN  
LA CARACTERIZACIÓN DE LA LEUCEMIA AGUDA Y EN  
LA IDENTIFICACIÓN DE SUBGRUPOS MOLECULARES**

**LUZ MUÑOZ MARÍN**

**TESIS DOCTORAL**

**DIRECTORES: JOSEP NOMDEDÉU GUINOT**

**JORDI SIERRA GIL**

**AÑO 2005**

**En memoria de mi padre**

**A mi madre**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Josep F. Nomdedéu, por haberme introducido en el mundo de la citometría y de la biología molecular, por su entusiasmo y por su modelo de estudio y trabajo. Sin él esta tesis no habría sido posible. Gracias Pep por confiar en mi.

Al Dr. Jordi Sierra, por su visión crítica y sus correcciones.

A Enriqueta Obiols, por haberme enseñado la citometría de flujo y por su amistad.

A la Dra. Salut Brunet, por su fuerza y su entrega a la Hematología y en especial a los enfermos.

A la Dra. Anna Aventín, Dr. Ramón Ayats y Dr. Angel Remacha por sus enseñanzas en el mundo del diagnóstico hematológico.

A Josep Úbeda, por su constancia en todo lo que se propone hasta encontrar el archivo más recóndito en el ordenador. A M<sup>a</sup> José Carnicer por compartir tardes adquiriendo muestras, y por su amistad.

A Camino Estivill y Olga López, por su trabajo en el laboratorio de biología molecular. Sus análisis han sido imprescindibles para la realización de esta tesis.

A Nancy por sus ánimos y compañía.

A mis compañeras de residencia: Yolanda González, Amparo Santamaría, Mar Bellido, Maricel Subirà, Rosa Manteiga, Charo López, Marina Carrasco,

Bárbara Menéndez, Elena Rámila y Granada Perea, por los buenos y malos momentos pasados durante la residencia y por su amistad.

A la Fundación Josep Carreras por su confianza y su apoyo económico.

Al grupo CETLAM, por el trabajo realizado desde hace más de quince años en la leucemia aguda, por el esfuerzo de cada uno de sus miembros en el envío de muestras y en la actualización de hojas de datos y lo que es mucho más importante por su dedicación en conseguir aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los enfermos.

A nuestros pacientes y a sus familiares. Su lucha diaria por vivir es la verdadera motivación de nuestro trabajo.

A Alberto y a nuestro hijo Miguel, por cada día que estamos juntos.

**GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

**AcMo:** anticuerpo monoclonal

**Ag:** antígeno

**AML-1:** acute myeloid leukemia 1

**AKT:** activated protein kinase

**BCR-ABL:** breakpoint cluster region- Abelson

**CAE:** cloroacetato esterasa

**CBF:** core binding factors

**CBF $\beta$ /MYH-11:** Core binding factor  $\beta$ /Myosin heavy chain

**CD:** cluster of differentiation, grupo de diferenciación

**CEBP $\alpha\beta$ :** CCAAT enhancer binding protein

**CF:** citometría de flujo

**Cit:** citoplasma

**c-Kit:** receptor tyrosine kinase

**D:** expresión débil

**ERM:** enfermedad residual mínima

**E2A:** immunoglobulin enhancer-binding factor

**EBF:** early B-cell transcription factor

**Ets-1:** erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

**F:** expresión fuerte

**FAB:** Grupo Francés-Americano-Británico

**FLT3:** Fms-like tyrosine kinase 3

**FSC:** forward scatter component, dispersion frontal de luz

**GA:** glicoforina

**Hox:** genes homeo box

**Ig:** inmunoglobulinas

**IL:** interleuquina

**ICSBP:** Interferon consensus sequence binding protein

**JAK:** Janus tyrosine kinase

**Lin-:** ausencia de expresión de antígenos específicos de línea celular

**Lin+:** expresión de antígenos específicos de línea celular

**LLA:** leucemia linfoblástica aguda

**LMC:** leucemia mieloide crónica

**LMA:** leucemia mieloide aguda

**LMO-2:** lim-finger protein

**MAPK:** HOG1 mitogen-activated protein kinase

**MDR-1:** multidrug resistance 1

**M/L:** cociente células progenitoras mieloides/linfoides

**MLL:** myeloid/Lymphoid leukemia gene

**MLL-PTD:** duplicación parcial en tandem del gen MLL

**MO:** médula ósea

**MPO:** mieloperoxidasa

**MYC:** clasificación morfológica-inmunofenotípica-citogenética

**M4-Eo:** M4- con eosinofilia de la clasificación FAB

**Nuc:** nuclear

**PAS:** ácido periódico Shiff

**Pax-5:** paired box gene 5

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

**Ph+:** Philadelphia +: translocación t(9;22)

**PML-RARA  $\alpha$ :** promyelocytic leukemia- retinoic acid receptor, alpha

**PU.1:** transcription factor PU.1

**RC:** remisión completa

**RAG-1,RAG-2:** recombination activating gene

**Ras:** Ras oncogen

**REC:** probabilidad de recaída

**RT-PCR:** retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa

**SCL:** stem cell leukemia gene

**SG:** supervivencia global

**SIRP:** signal regulatory protein

**SLE:** supervivencia libre de enfermedad

**SSC:** side scatter component: dispersión lateral de la luz

**STAT:** signal transducer and activator of transcription

**STI:** inhibidor de la tirosín quinasa

**Thy-1:** Thy-1 cell surface antigen

**TEL:** Translocation ETS leukemia gene: ETV6

**UFC-GM:** unidad formadora de colonias granulo-monocíticas

**UFC-L:** unidad formadora de colonias leucémicas

**VEGR ó KDR:** factor de crecimiento del endotelio vascular

**WHO:** Organización Mundial de la Salud.

**INDICE**

|   |          |
|---|----------|
| <b>PRESENTACIÓN</b>   | <b>1</b> |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>5</b> |
| I. 1. Estudio de la hematopoyesis normal y patológica.  | 7        |
| I. 1.1. Expresión antigénica.   | 7        |
| I. 1.2. Regulación de la hematopoyesis: papel de las citoquinas y de los factores de transcripción. | 13       |
| I. 2. Estudio de la mielopoyesis y linfopoyesis B normales.   | 16       |
| I. 2.1. Linfopoyesis B: expresión antigénica y regulación.  | 16       |
| I. 2.2. Mielopoyesis: expresión antigénica y regulación.  | 21       |
| I. 3. Leucemia linfoblástica aguda de línea B.  | 24       |
| I. 3.1. Clasificación inmunológica.   | 25       |
| I. 3.2. Factores pronósticos.   | 26       |
| I. 4. Leucemia mieloide aguda.  | 34       |
| I. 4.1. Clasificación.  | 34       |
| I. 4.2. Factores pronósticos.   | 35       |

|  |    |
|--|----|
| I. 5. Fundamentos y aplicaciones de la citometría de flujo.  | 44 |
| I. 5.1. Introducción.  | 44 |
| I. 5.2. Generalidades del citómetro de flujo.  | 45 |
| I. 5.3. Aplicación de la citometría en el estudio de la leucemia aguda.  | 46 |
| I. 5.3.1. Fenotipaje de la leucemia aguda.   | 47 |
| I. 5.3.2. Otras aplicaciones.  | 48 |
| <br>   |    |
| I. 6. Estudio de la enfermedad residual mínima (ERM).  | 50 |
| I. 6.1. Definición.  | 50 |
| I. 6.2. Métodos para la detección de ERM.  | 50 |
| I. 6.2.1. Citogenética convencional e hibridación <i>in situ</i> .   | 51 |
| I. 6.2.2. Cultivos celulares.  | 52 |
| I. 6.2.3. Técnicas moleculares: Southern Blot y PCR.   | 53 |
| I. 6.2.4. Inmunofenotipo.  | 54 |
| I. 6.2.4.1. Fenotipos aberrantes.  | 55 |
| I. 6.2.4.2. Fenotipos ectópicos.   | 57 |
| I. 6.2.4.3. Alteración del cociente mielode/linfoide de las células CD34+.   | 58 |
| <br>   |    |
| I. 6.3. Ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares y del análisis inmunofenotípico en el estudio de la ERM. | 59 |
| <br>   |    |
| I. 6.4. Aplicación clínica de la detección de ERM.   | 62 |

|   |    |
|---|----|
| <b>II. JUSTIFICACIÓN</b>  | 65 |
| <b>III. HIPÓTESIS</b>   | 69 |
| <b>IV. OBJETIVOS</b>  | 73 |
| <b>V. RESULTADOS</b>  | 77 |
|   |    |
| V.1. Trabajos sobre la expresión de antígenos en la caracterización de las leucemias agudas.  |    |
| V.1.1. Publicaciones.   |    |
| - CD66 expression in acute leukemia.  | 81 |
| - Interleukin-3 receptor $\alpha$ Chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies.  | 83 |
|   |    |
| V.2. Trabajos sobre el perfil inmunofenotípico y otras características clínico-biológicas de leucemias agudas con alteraciones moleculares específicas.                       |    |
|   |    |
| V. 2.1. Publicaciones.  |    |
| - Combined use of reverse transcriptase polymerase chain reaction and flow cytometry to study minimal residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. | 85 |

V.2.2.1. Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con AML1-ETO.

Publicación: CD56 expression could be associated with monocytic differentiation in acute myeloid leukemia with t(8;21).

V.2.2.2. Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con CBF $\beta$ /MYH 11. 105

V.2.2.3. Análisis inmunofenotípico y características de los pacientes con reordenamiento de MLL.

Publicación: Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. 133

V.2.2.4. Análisis inmunofenotípico y características de los pacientes con duplicación del gen FLT3.

Publicación: Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. 149

|   |     |
|---|-----|
| V.2.2.5. Coexistencia de doble alteraciones genéticas: detección de dos pacientes con coduplicación de MLL y FLT3 y dos pacientes con reordenamiento de CBF $\beta$ /MYH-11 y duplicación del gen FLT3. | 153 |
| <b>VI. DISCUSIÓN</b>  | 157 |
| <b>VII. CONCLUSIONES</b>  | 181 |
| <b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>   | 187 |

## **PRESENTACIÓN**

Las primeras descripciones de lo que actualmente podemos considerar “procesos leucémicos” se remontan a mediados del siglo XIX. En 1845, Bennet publicó una serie de pacientes que presentaban grandes organomegalias y cambios en el color y consistencia de la sangre, independientes de procesos infecciosos o inflamatorios. Este patólogo consideró que estos cambios se debían a la presencia de material purulento en la sangre. Virchow en 1847 describió un caso similar, en el que encontró una alteración en las proporciones de las células sanguíneas, con disminución de las células rojas. Posteriormente introdujo el término leucemia, que significa en griego “sangre blanca”, para definir una enfermedad que causaba un aumento en el número de partículas incoloras en la sangre. Virchow concluyó que no se trataba de un proceso único, sino que existía un grupo heterogéneo de alteraciones que se podían subdividir en esplénicas (probablemente mieloides) y ganglionares (linfoides), y que a su vez unas tenían un curso indolente (crónicas) mientras que otras eran rápidamente progresivas y letales (agudas). Neumann en 1870 fue el primero en sugerir que las células sanguíneas incoloras procedían de la médula ósea y Ehrlich en 1877 dio un gran paso en el diagnóstico de estas enfermedades al desarrollar las técnicas de tinción basadas en anilinas y que permitían distinguir diferentes tipos de células sanguíneas normales y patológicas.

Es evidente que actualmente se ha avanzado mucho tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de las leucemias. Sin embargo, todavía hoy, ante un paciente con leucemia aguda, nos encontramos frente a dos problemas

fundamentales: el primero clasificar correctamente el tipo de leucemia, dentro de la heterogeneidad que existe, para adecuar el tratamiento en función de factores pronósticos; el segundo, diferenciar las células leucémicas de los progenitores hematopoyéticos normales (especialmente durante la remisión), para detectar aquellos pacientes con persistencia de enfermedad y riesgo alto de recaída. Hoy en día disponemos de numerosas técnicas que nos permiten el diagnóstico de las diferentes leucemias agudas, pero es necesario la utilización conjunta de todas ellas (citoquímica, citometría de flujo, citogenética, biología molecular), junto con los datos clínicos, para poder avanzar en el conocimiento de los diferentes factores que influyen en el pronóstico de estos pacientes. El conocimiento de todos estos factores puede originar una mejora en la supervivencia de los enfermos con leucemia aguda, al poder individualizar el tratamiento; en concreto: utilización de los diferentes tipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos, empleo de anticuerpos monoclonales o bien aplicación de fármacos con acción a nivel de ciertas alteraciones moleculares, como los inhibidores de la actividad tirosinquinasa, los moduladores de las vías de la apoptosis, los inhibidores de la farnesiltransferasa, y otros.

## **MOTIVACIÓN**

En 1994 finalicé mi carrera de Medicina con ilusión y con la determinación de realizar la especialidad de Hematología. Mis primeros contactos con lo que finalmente fue mi profesión se remontaban a tres años antes de acabar la carrera,

cuando realicé prácticas de Medicina en el Hospital Clínic de Barcelona. Allí entré en contacto con enfermos con alteraciones cardíacas, respiratorias, neurológicas, y hematológicas. Estos últimos me atrajeron particularmente al tratarse, en general, de enfermos con un gran conocimiento de su enfermedad, con disciplina en el seguimiento de su tratamiento y con una total confianza en su equipo médico (sus caras de miedo cambiaban totalmente cuando aparecía el hematólogo). Al año siguiente estudié la asignatura de hematología y decidí que ésta sería la especialidad que elegiría. Mi especialización la realicé en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Todavía hoy, considero la hematología como la especialidad médica más completa, ya que permite la integración de la biología de la enfermedad con la parte clínica y la terapéutica. Durante los cuatro años de residencia un tema cobró en mi mayor interés: la leucemia aguda, y especialmente aspectos relacionados con la patogenia, el diagnóstico y el pronóstico. Durante los tres años posteriores a la finalización de mi especialidad, gracias al apoyo científico y profesional de mis directores de tesis y a la Fundación Josep Carreras por su ayuda económica, me he podido dedicar con mayor profundidad a estos temas. Y aunque ahora se un poco más que cuando era estudiante de Medicina, todavía tengo la misma sensación que entonces, una mezcla de atracción y curiosidad, cuando observo al microscopio el aspirado medular de un paciente con leucemia aguda. Los enfermos que he visitado y las médulas óseas que he examinado son el sustrato y la verdadera motivación de estos trabajos.

Esta tesis se ha planteado como un intento de estudiar la aportación de una técnica en la que me he especializado, el análisis inmunofenotípico, en la

caracterización de las leucemias agudas. Además se ha analizado las características clínico-biológicas de ciertas alteraciones genéticas, con impacto pronóstico en la supervivencia de los enfermos con leucemia aguda. Para ello se ha integrado la información clínica con los datos de morfología, citogenética y biología molecular y se ha profundizado especialmente en el análisis inmunofenotípico. En el trabajo se ha analizado un grupo de enfermos con leucemia aguda linfoblástica diagnosticados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y un grupo de 264 enfermos diagnosticados de leucemia mieloide aguda incluidos durante los años 1999 a 2001 en el protocolo LMA-99 del grupo cooperativo CETLAM. Este grupo está constituido por 18 hospitales de Cataluña, Baleares, Valencia, Galicia y Málaga y se dedica desde hace más de 15 años al diagnóstico y tratamiento de las leucemias agudas mieloides y síndromes mielodisplásicos. Gracias al esfuerzo y colaboración de numerosas personas que forman parte de este grupo se ha estudiado y tratado homogéneamente un número considerable de pacientes; más recientemente, se ha conseguido incorporar a estos análisis clínicos, los datos de los estudios biológicos sistemáticos realizados en estos pacientes, con la utilización conjunta de todas las técnicas actuales: morfología, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular.

Consideramos que sólo con el esfuerzo y el trabajo conjuntos pueden obtenerse resultados que nos permitan avanzar en el conocimiento de la leucemia y como consecuencia aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de nuestros enfermos.

## **I. INTRODUCCIÓN**



## **I. 1 ESTUDIO DE LA HEMATOPOYESIS NORMAL Y PATOLÓGICA**

En la médula ósea (MO) humana, se ha descrito la existencia de células formadoras de colonias capaces de dar lugar a los progenitores de las diferentes series hematopoyéticas, denominadas células “stem” totipotenciales. Estas células se caracterizan por la ausencia de marcadores de línea (Lin<sup>-</sup>) y por tener la capacidad de auto-regeneración y de diferenciación. Durante el proceso de diferenciación, los progenitores hematopoyéticos se comprometen en ciertas líneas celulares, con la aparición de marcadores específicos (Lin<sup>+</sup>), y pérdida de la capacidad de auto-regeneración. Este proceso de formación se denomina hematopoyesis. La alteración neoplásica en algún nivel de este proceso da lugar a las diferentes hemopatías malignas medulares.

### **I. 1. 1 EXPRESIÓN ANTIGÉNICA**

Durante mucho tiempo, el conocimiento de la hematopoyesis normal se limitó a identificar los cambios morfológicos y citoquímicos detectados en los precursores hematopoyéticos en diferentes condiciones de cultivo, así como en determinar las características de las células leucémicas que reflejaban un determinado estadio dentro de la diferenciación normal. Sin embargo, los progenitores hematopoyéticos normales y las células neoplásicas presentan características morfológicas y biológicas similares, por lo que puede ser muy difícil

su distinción únicamente por métodos morfológicos. La introducción de los AcMo (anticuerpos monoclonales) en el estudio de la MO normal ha confirmado la gran heterogeneidad de los progenitores hematopoyéticos, demostrando que los cambios morfológicos de los diferentes progenitores guardan relación con modificaciones en la expresión de los antígenos de diferenciación. La citometría de flujo ha supuesto un gran avance en el conocimiento de la diferenciación linfoide y mieloide normal, al identificar y definir de forma objetiva, reproducible y rápida las diferentes líneas celulares y sus estadios madurativos (Terstappen L, Cytometry 1988). De esta manera el análisis inmunofenotípico se ha convertido en uno de los métodos de elección en el estudio de la hematopoyesis tanto en MO como en sangre de cordón umbilical o en el timo.

Es bien conocido que los progenitores hematopoyéticos más inmaduros están englobados dentro de una pequeña población medular caracterizada por expresar el antígeno CD34 y presentar un patrón de FSC (forward scatter)/SSC (side scatter) relativamente variable con un FSC intermedio/grande y un SSC pequeño/intermedio (Terstappen L, Blood 1991). Diferentes estudios han puesto de manifiesto una gran heterogeneidad antigénica dentro de esta fracción medular, indicando además que las células CD34+ representan células progenitoras ya comprometidas a la línea linfoide (CD10+ o CD5+), eritroide (CD71+) o mielomonocítica (CD33+) ( Terstappen L, Cytometry 1988; Leukemia 1990). En los últimos años el concepto de que los progenitores hematopoyéticos más inmaduros expresan constantemente el antígeno CD34 se ha cuestionado. Algunos grupos han caracterizado la célula progenitora más primitiva con un fenotipo CD34-, CD45+ y sin expresión de c-kit, Thy-1 ni antígenos de línea.

Experimentos recientes con cultivos de células CD34-, Lin-, confirman la reversibilidad de la expresión del antígeno CD34 en las células pluripotentes hematopoyéticas, al observar la positividad de este antígeno coincidiendo con la activación de estas células (Sato T, Blood 1999; Goodell MA, Nature Med 1997).

Clásicamente se han identificado dentro de la fracción CD34+ diferentes estadios madurativos; las subpoblaciones CD34 más indiferenciadas corresponden a las células CD38- (Terstapen L, Blood 1991). Se ha descrito la expresión de otros antígenos en las células totipotenciales. Así, la mayoría de éstas expresan de manera débil el antígeno CD45. Las células CD34+ con expresión del antígeno Thy-1 o CD90 representarían progenitores precoces con mayor capacidad de proliferación (Humeau L, Blood 1996; De Wynter EA, Stem Cells 1998). Otro marcador que sólo se encuentra en las células CD34+ es el antígeno AC133. Este antígeno se expresa en los progenitores más inmaduros así como en células CD34+ comprometidas a la línea mielomonocítica, pero no se expresa en los progenitores de otras líneas celulares (Yin A, Blood 1997). Otro marcador expresado en los progenitores más inmaduros es el antígeno CD82. Estudios realizados en individuos sanos muestran que la expresión de este antígeno disminuye con la diferenciación celular. Este dato, junto con la sobreexpresión de CD82 detectada en numerosas leucemias así como en los progenitores más inmaduros, sugieren que este antígeno tendría un papel importante en la hematopoyesis normal y patológica (Burchert A, Br J Haematol 1999). Recientemente, se ha descrito que el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR o KDR) podría ser un marcador útil para diferenciar células madre pluripotenciales de las que ya están comprometidas a una línea

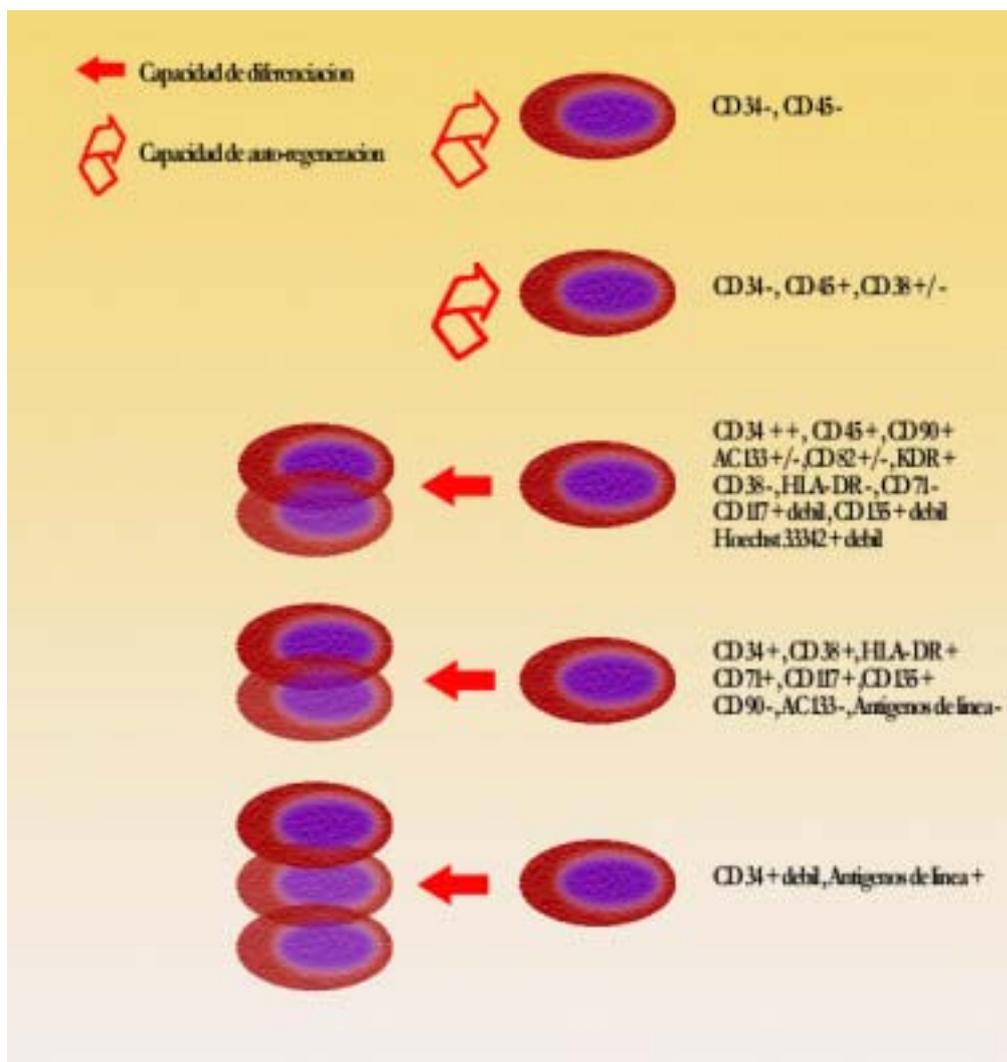
celular (Ziegler BL, Science 1999). Estudios realizados en médula ósea sana han demostrado que sólo un pequeño porcentaje de las células CD34+ son KDR+ (0,1-0,5%). Estas células no muestran expresión de ningún marcador de línea y sólo son positivas en parte para antígenos expresados en los progenitores más inmaduros CD38-, CD90+, CD117+ débil. Cultivos realizados con células CD34+ KDR+ y CD34+ KDR- han demostrado que en la fracción KDR- se encontrarían los progenitores comprometidos a línea eritroide y granulomonocítica. Así mismo, a partir de células KDR+ se ha observado la presencia de injertos de todas las líneas celulares: granulomonocítica (CD33+ CD15+ CD14+), eritroide (CD71+ GPA+), megacariocítica (CD45+ CD41+) linfocitos T y B (CD4+ CD8+ CD3+ y CD19+ CD20+) y natural killer (CD16+ CD56+) (Ziegler B, Science 1999).

Otros antígenos relacionados con proteínas reguladores de señales de transducción también se expresan en las células "stem" así como en estadios posteriores de su diferenciación. El antígeno CD117 o c-kit se expresa débilmente en las células progenitoras más primitivas y posteriormente se expresa con mayor intensidad en los estadios intermedios de la diferenciación mielomonocítica (Gunji Y, Blood 1993). Otros receptores de señales de transducción como el FLT3 (CD135), el receptor de la transferrina (CD71) o la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-3 (CD123) también se expresan de manera variable en los progenitores hematopoyéticos (Brender C, Leukemia 2000).

Una capacidad de las células progenitoras más inmaduras, demostrada mediante citometría de flujo, es la rápida efusión de colorantes fluorescentes como el Hoechst 33342 o la rodamina 123. Este fenotipo únicamente se ha observado en

las células más primitivas (0,05% del total de células de la MO) y parece ser una propiedad que conferiría a estas células cierta capacidad de preservación (Goodell MA, Nat Med 1997).

Figura 1: Expresión antigénica durante el desarrollo de la hematopoyesis



El principal problema en la distinción entre células blásticas y progenitores hematopoyéticos normales es que ambos tienen unas características morfológicas, fenotípicas y biológicas muy similares. El análisis inmunológico de las diferentes poblaciones hematológicas malignas se basa en la detección de marcadores que representan antígenos que se asocian a la diferenciación celular normal, pero cuya combinación puede ser específica de un estadio de diferenciación concreto bloqueado, o bien que su detección en una determinada línea celular sea aberrante o poco frecuente. Aproximadamente el 70-80% de las leucemias agudas muestran un fenotipo aberrante, aunque la mayoría de las combinaciones antigénicas aberrantes pueden detectarse en pequeño porcentaje en la médula de individuos sanos. Hasta la actualidad no se ha descrito ningún antígeno que se exprese exclusivamente en las células leucémicas. Diversos grupos han estudiado la expresión de antígenos detectados en los progenitores más inmaduros, con la intención de encontrar aquellos que sean útiles para diferenciar precursores normales de células leucémicas inmaduras. El antígeno AC133 se ha encontrado tanto en progenitores normales como en células leucémicas, al igual que los antígenos CD82 y CD135, (Burchrt A, Br J Haematol 1999; Horn PA, Blood 1999) mientras que la expresión del receptor KDR todavía no se ha estudiado en células leucémicas. Existe una proteína involucrada en regulación de señales de transducción (SIRP) que ha sido recientemente descrita como un marcador de la célula "stem" y que podría ser una buena candidata para la diferenciación entre precursores y células leucémicas, puesto que no se ha detectado en éstas últimas (Seiffert M, 1999 Blood). Existen también estudios que demuestran que la cadena

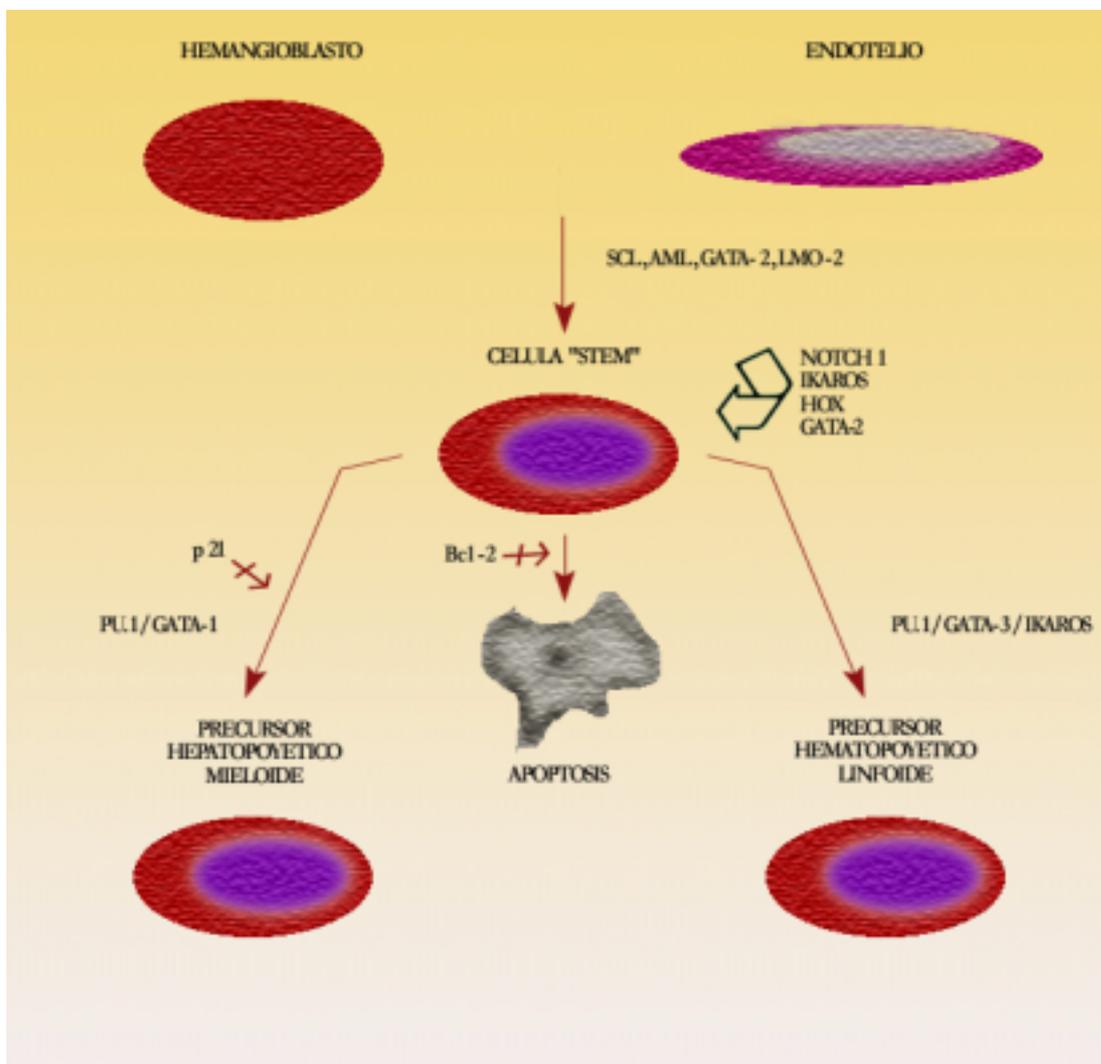
$\alpha$  del receptor de la IL-3 (CD123) podría ser un buen marcador diferencial, puesto que se ha demostrado una expresión significativa en blastos mieloides y linfoides B, mientras que la mayoría de los progenitores hematopoyéticos inmaduros no la expresan (Jordan CT, Leukemia 2000). Finalmente, en cuanto a la capacidad de efusión de colorantes fluorescentes que presentan los progenitores normales más precoces, parece ser que también la presentan las células leucémicas más inmaduras. Además, esta propiedad se ha relacionado con una mayor resistencia a los citostáticos y por tanto con una mayor probabilidad de recaída. En los pacientes con LMA se ha encontrado también un pequeño porcentaje de células leucémicas Hoechst 33342+<sup>débil</sup> pero con un fenotipo diferente al de los precursores normales, puesto que expresan de manera heterogénea el CD34 así como otros antígenos propios de la diferenciación mieloide como el CD13 o el CD33 (Wulf G, Blood 2001).

## **I. 1. 2 REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS: PAPEL DE LAS CITOQUINAS Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

Como ya se ha comentado previamente, los precursores hematopoyéticos más inmaduros o células “stem” tienen la capacidad de auto-regeneración, proliferación y diferenciación en las distintas líneas celulares. Todos estos procesos están regulados por factores de transcripción y por la interacción de citoquinas del microambiente con receptores celulares.

Se pueden distinguir dos grupos de factores de transcripción con acción en las fases más iniciales de la hematopoyesis. Unos que actúan en el proceso más precoz del desarrollo de la hematopoyesis y otros que regulan la auto-regeneración y el comienzo de la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Entre los primeros cabe destacar a SCL, GATA-2, LMO-2 y AML-1 y entre los segundos los genes de la familia Hox, Ikaros, y Notch 1, GATA-1, GATA-3 y PU.1 ( Zhu J, Oncogene 2002).

Figura 2: Regulación transcripcional de la hematopoyesis



La acción de los factores de transcripción sobre los progenitores hematopoyéticos está modulada por citoquinas. Estas moléculas están producidas por los fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos y forman parte del microambiente de la médula ósea. Las citoquinas, muchas de ellas factores de crecimiento, actúan en general mediante la unión a sus receptores celulares que da lugar a una serie de eventos intracelulares. Inicialmente se produce la dimerización del complejo ligando-receptor con la consecuente fosforilación de residuos tirosina intracelulares. Esto produce la activación de proteínas intermediarias con actividad tirosín-quinasa que a su vez fosforilan a otras moléculas. Finalmente, esta cascada de reacciones acaba en la síntesis de ADN produciendo una activación o inhibición de la proliferación y diferenciación celular o bien regulando la viabilidad celular a través de la inducción o bloqueo de la apoptosis. Existe una larga lista de citoquinas que modulan la hematopoyesis. Unas tienen acción en los estadios más iniciales como el SCF o FLT3, otras estimulan colonias formadoras de líneas celulares específicas como la eritropoyetina o trombopoyetina y otras estimulan el crecimiento de varias líneas celulares como GM-CSF, IL-3, IL4, IL-6, IL-11, IL-12, etc (Henderson E, Leukemia 2002).

## **I. 2 ESTUDIO DE LA MIELOPOYESIS Y LINFOPOYESIS B NORMALES**

La diferenciación hematopoyética normal se ha investigado fundamentalmente a tres niveles: la expresión antigénica de las células, las señales mediadas por citoquinas en las distintas líneas celulares y la regulación de genes, fundamentalmente factores de transcripción. La disregulación de la hematopoyesis puede deberse a alteraciones en la proliferación, diferenciación o viabilidad celular. La aparición de una leucemia es consecuencia de una perturbación en alguno de estos procesos. Es por ello que para avanzar en la investigación de la leucemogénesis es necesario un profundo y correcto conocimiento de la hematopoyesis normal.

### **I. 2. 1 LINFOPOYESIS B: EXPRESIÓN ANTIGÉNICA Y REGULACIÓN**

Los linfocitos B son células diferenciadas que provienen de los progenitores hematopoyéticos. Durante el periodo embrionario el paso de célula primitiva a célula linfoide tiene lugar en el hígado y bazo fetales, mientras que en la etapa adulta este paso se realiza en la médula ósea, donde tiene lugar la producción de los progenitores B y su diferenciación en células maduras capaces de reconocer antígenos (Loken MR, Blood 1987). El paso de la célula linfoide B desde el estadio más inicial hasta el linfocito B maduro es un proceso de maduración en el que la

célula va ganando y perdiendo diferentes antígenos de diferenciación. Estos modelos de maduración se elaboraron inicialmente a partir del estudio de los precursores B de la leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) (Anderson KC, Blood 1984). Posteriormente, la realización de múltiples marcajes, la aparición de nuevos antígenos y nuevos fluorocromos, así como la investigación en MO de personas sanas ha permitido una mejor caracterización de las poblaciones celulares linfoides B, incluso cuando éstas son minoritarias (Lucio P, Leukemia 1999). El antígeno CD19 se consideró durante mucho tiempo el más precoz de todos los antígenos asociados a linfocitos B y representa el marcador más característico de la línea linfoide B, puesto que se encuentra en todos los estadios de diferenciación (Loken MR, Blood 1987). Sin embargo, se han detectado aunque minoritariamente, progenitores B con fenotipo CD34+ CD10+ CD19-. En el estadio más precoz se expresa también la enzima nuclear Tdt que se encuentra sólo en las células linfoides inmaduras y que está implicada en el proceso de reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (Ig). Clásicamente la diferenciación linfoide B ha seguido un esquema en el que se pueden distinguir 4 estadios. Según este esquema, la célula más inmadura (estadio I) se caracteriza por ser CD34+CD19+CD10+Tdt+. Seguidamente, esta célula pierde reactividad para CD34 y Tdt y gana expresión de CD45, HLA-DR (estadio II). Posteriormente disminuye la expresión de CD10, pierde los antígenos CD34 y Tdt y gana expresión de CD19, CD45 y CD20 (estadio III). En este estadio comienzan a expresarse los antígenos FMC7 y CD5. La expresión de este último antígeno se pierde en el estadio posterior. El estadio IV se caracteriza por un aumento de expresión de CD22 y la aparición de CD23. Paralelamente la Ig M de citoplasma se

detecta durante en el estadio II mientras que su expresión en la superficie de la célula no se detecta hasta el estadio III (Loken MR, Blood 1987). Los estudios más recientes mediante citometría de flujo multiparamétrica en MO de sujetos sanos han permitido conocer algunas de las subpoblaciones de linfocitos B más minoritarias y que son muy importantes para el análisis de la ERM (enfermedad residual mínima) en pacientes con LLA-B. Estos estudios han demostrado la existencia de subpoblaciones de células CD34+/CD22+/CD19- y CD10+/Tdt+/CD19-, que representan el  $0,11 \pm 0,09\%$  y  $0,04 \pm 0,05\%$  del total de las células nucleadas de la MO, respectivamente. Estas células pertenecen a los estadios más inmaduros del proceso de diferenciación. Las tres subpoblaciones de células CD19+ más frecuentes en la MO y que corresponden a estadios más avanzados de maduración son las siguientes:

Subpoblación 1: CD19+<sup>débil</sup>/CD34+/Tdt+/CD10+<sup>fuerte</sup>/CD22+<sup>débil</sup>/  
CD45+<sup>débil</sup>/CD 38+<sup>fuerte</sup>/CD20-

Subpoblación 2: CD19+/CD34-/Tdt-/CD10+/CD22+<sup>débil</sup>/  
CD45+/CD38+<sup>fuerte</sup>/CD20+<sup>débil</sup>

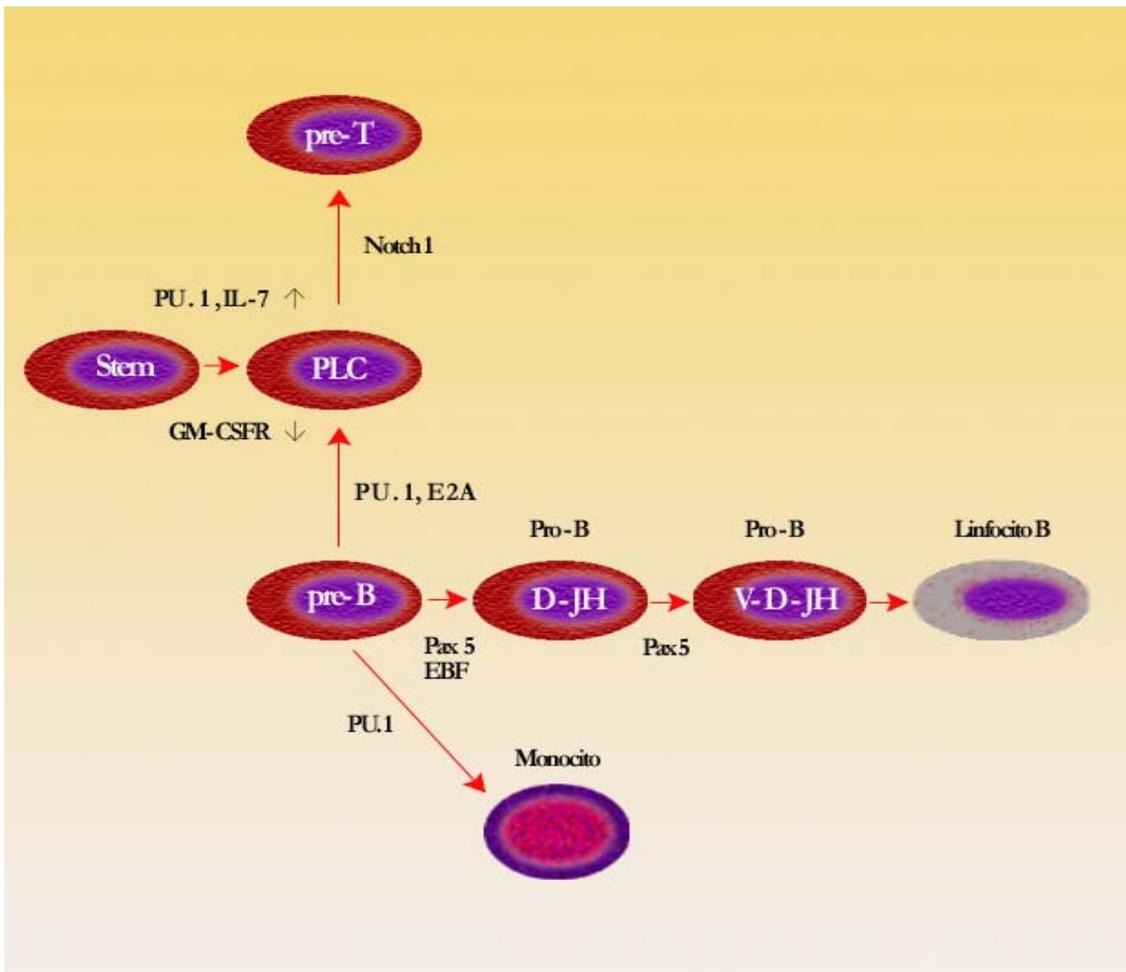
Subpoblación 3: CD19+/CD34-/TdT-/CD10-/CD22+<sup>fuerte</sup>/  
CD45+<sup>fuerte</sup>/CD38+<sup>débil</sup>/CD20+<sup>fuerte</sup>

Los porcentajes de estas subpoblaciones, especialmente la 1 y la 2 varían según la edad. Hasta los 15 años aproximadamente, las poblaciones mayoritarias son la más inmaduras 1 y 2, mientras que en la edad adulta la población más frecuente es la más madura (subpoblación 3) (Lucio P, Leukemia 1999). También se han demostrado alteraciones en las proporciones de las diferentes poblaciones de células CD19+ en el periodo más precoz de la recuperación celular tras la quimioterapia o el trasplante de progenitores hematopoyéticos. En este último se

ha demostrado una expansión del componente de células linfoides B más inmaduro.

A nivel molecular numerosos estudios han identificado genes esenciales en la diferenciación linfoides B normal. Estos genes son, entre otros, factores de transcripción que participan en los distintos eventos de este proceso, desde las fases más iniciales hasta los reordenamientos de las Ig. La proteína Ikaros es una de estas moléculas con acción en múltiples estadios de la linfopoyesis. La integridad de Ikaros es esencial especialmente en la fase más precoz del desarrollo linfoides (Georgopoulos K, Cell 1994). Estudios realizados en ratones heterocigotos para la mutación de este gen han demostrado la aparición de leucemias y linfomas precedidos de una proliferación excesiva del timo (Winandy S, Cell 1995). Otros dos factores de transcripción importantes en varios estadios de la diferenciación linfoides son PU.1 y Ets-1. Defectos en la expresión de PU.1 dan lugar al bloqueo del desarrollo tanto linfoides T y B como mieloides. (McKercher SR, EMBO J 1996). Otros genes importantes en las fases iniciales de la linfopoyesis son E2A, EBF y Pax5 (O'Riordan M, Immunity 1999). En estadios posteriores de la diferenciación linfoides B existen otros genes importantes como RAG-1 y RAG-2 que codifican proteínas cruciales en el proceso de reordenamiento de las Ig (Agrawal A, Nature 1998).

Figura 3: Regulación transcripcional de la diferenciación linfoide B.



Los linfocitos T y B derivarían de un precursor linfocítico común (PLC). Algunos experimentos sugieren que la producción de monocitos sería más promiscua y podrían diferenciarse tanto a partir de precursores mieloides como linfocíticos. Zhu J, Oncogen 2002

## **I. 2. 2 MIELOPOYESIS: EXPRESIÓN ANTIGÉNICA Y REGULACIÓN**

La línea granulopoyética representa aproximadamente el 60% de la celularidad global de la MO y se caracteriza por la presencia de mieloperoxidasa (MPO) desde los estadios más iniciales de la diferenciación. Desde el punto de vista fenotípico los primeros precursores mieloides (estadio I) se caracterizan por coexpresar los antígenos CD34, CD38, HLA-DR y CD33 y a diferencia de los precursores linfoides presentan un patrón de FSC y SSC mucho más heterogéneo. Los precursores mieloides y los monocíticos son indistinguibles antigénicamente en este estadio. En su progresión al estadio II las células mieloides pierden CD34 y HLA-DR y ganan CD15 junto con SSC sin presentar todavía CD11b. Este estadio corresponde al promielocito. Posteriormente, la célula mioide adquiere moderadamente CD11b, disminuye su expresión de CD33, pierde el antígeno CD13 y disminuye SSC (estadio III). En su proceso de diferenciación la célula mioide vuelve a ganar CD13 mientras que disminuye el CD33 y aparece el antígeno CD16 (estadio IV). El estadio más maduro en la diferenciación granulocítica corresponde al del neutrófilo maduro que se encuentra en sangre periférica (estadio V). Estas células expresan CD16, CD13, CD10 y CD45. (Terstappen L, A Cel Pathol 1990; Leukemia 1999).

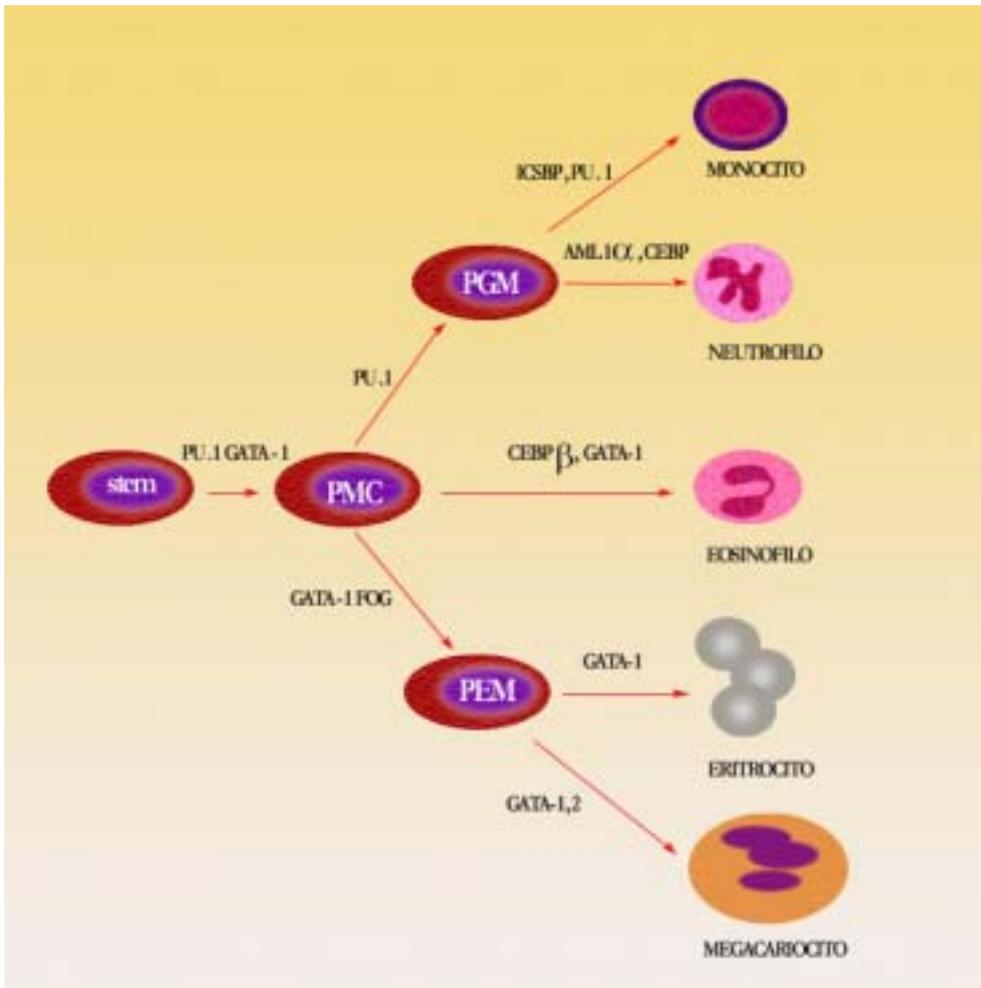
En cuanto a la línea monocítica, fenotípicamente el precursor es indistinguible del precursor mioide o mieloblasto (CD34+HLA-DR+,

CD33+CD38+). A diferencia de lo que ocurre en otras líneas hematopoyéticas, los conocimientos fenotípicos sobre la diferenciación monocítica siguen siendo todavía relativamente escasos (Macedo A, Sangre 1994). Se ha sugerido que la adquisición de positividad intensa para CD33 en las células CD34+ indicaría diferenciación hacia la línea monocítica. Asimismo, durante su diferenciación inicial la célula monocítica ganaría intensidad de CD33 antes de empezar a perder CD34, al contrario de lo que ocurriría en la célula mieloide (Macedo A, Sangre 1994). De igual forma la célula monocítica, al contrario que la mieloide que pierde rápidamente el antígeno HLA-DR al madurar, lo expresaría durante su diferenciación. En el estadio II la célula monocítica se caracteriza por un aumento importante en la expresión de CD11b junto con CD13 y CD33. En el estadio III la célula monocítica gana el antígeno CD14 que va aumentando de intensidad a medida que el monocito madura, al igual que el CD45. Los antígenos CD15 y CD16 también se expresan en el monocito maduro pero más débilmente que en la línea mieloide. Paralelamente a la adquisición de estos antígenos durante el proceso de diferenciación, las células de la línea monocítica incrementan su SSC y disminuyen su FSC hasta adoptar en sangre un patrón de FSC/SSC intermedio respecto a linfocitos y polinucleares neutrófilos. La intensidad de expresión de CD13 y CD33 se mantiene fuerte durante toda la diferenciación monocítica. Comparado con los neutrófilos, en los monocitos maduros la expresión de CD13 es más heterogénea y la de CD33 más homogénea (Terstappen L, Lekemia 1990).

El inicio de la diferenciación mieloide está regulado por dos genes principales PU.1 y GATA-1. Posteriormente, la expresión de GATA-1 disminuye

durante la diferenciación granulo-monocítica mientras que PU.1 disminuye con la diferenciación hacia las líneas eritroide y megacariocítica (Zhu J, Oncogene 2002). En la granulopoyesis inicial se requieren factores de transcripción como CEBP $\alpha$ , PU.1, RAR o CBF, mientras que la fase terminal de diferenciación neutrófila está regulada por CEBP $\epsilon$ , PU.1 y HoxA10. La vía de diferenciación monocítica depende de la acción de genes como PU.1 y ICSBP (Friedman A, Oncogen 2002). Aunque parece que también existiría una vía alternativa en la que los monocitos-macrófagos derivarían de un precursor con posibilidad de diferenciarse en monocitos y linfocitos B según la acción del gen PU.1 y la presencia de IL-7 (J Zhu, Oncogene 2002).

Figura 4. Regulación transcripcional de la diferenciación mieloide.



Del precursor mielodermoide común (PMC) derivarían los precursores de la línea granulocítica, monocítica (PGM) así como la eritroide y la megacariocítica (PEM). J Zhu, Oncogen 2002

### I. 3 LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINEA B

Constituye el tipo de leucemia más frecuente en la infancia y corresponde al 30% del total de las neoplasias en niños. Este tipo de enfermedad presenta un segundo pico de incidencia alrededor de los 50 años. En las últimas tres décadas se ha producido un gran avance en el tratamiento de esta leucemia en la edad pediátrica, con remisiones completas (RC) en hasta el 90% de niños y supervivencia larga libre de enfermedad (SLE) en el 70-80% de estos pacientes.

Los resultados en adultos han sido muy diferentes. El tratamiento quimioterápico consigue una alta tasa de remisiones completas, similar a la de los niños, pero un elevado número de pacientes recaen por lo que la supervivencia global (SG) en adultos es inferior al 30-40% (Faderl S, Hematology/Oncology Clin of N America 2000). Esta gran diferencia en cuanto a la respuesta al tratamiento y supervivencia entre ambos grupos de edad traduce importantes diferencias biológicas en la naturaleza de la enfermedad. Existen ciertos factores que se han sugerido como posibles responsables de la variabilidad en el comportamiento entre ambos grupos de edad como son: la disminución en la tolerancia a las dosis altas de quimioterapia en pacientes con más edad, diferentes mecanismos de resistencia a drogas y de sensibilidad a los esteroides o la mayor presencia de factores de mal pronóstico en adultos como la leucocitosis o los cariotipos de mal pronóstico, entre otros. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que muchos de estos factores individualmente no tienen impacto adverso en la supervivencia de los pacientes

con LLA. Más recientemente, se ha sugerido que ciertas alteraciones genético-moleculares muy importantes en la leucemogénesis de la LLA, con acción a nivel del ciclo celular, regulación de la apoptosis, transducción de señales, etc, podrían ser las responsables de la diferente biología y comportamiento de esta enfermedad en niños y adultos.

### **I. 3. 1 CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA**

La clasificación morfológica más empleada de forma general es la del grupo cooperativo FAB. En ella se evalúan parámetros como el tamaño celular, la irregularidad y tamaño del núcleo, el aspecto de la cromatina, el número y tamaño de los nucleolos, el grado de basofilia y la presencia de vacuolas en el citoplasma. Dicho grupo distingue tres variedades: L1, L2 y L3 (Bennett JM, Br J Haematol 1981). Actualmente, la clasificación inmunológica de las leucemias linfoblásticas resulta imprescindible. Siguiendo la clasificación del Grupo Europeo para la caracterización de las leucemias agudas (EGIL), (Bene MC, Leukemia 1995) se distinguen dos tipos fundamentales de LLA: las de estirpe linfocítica T y B. Existen asimismo subtipos T y B caracterizados por la presencia de diversos marcadores inmunológicos. En la siguiente tabla se resume la clasificación de las LLA de fenotipo B.

**Tabla 1: Subtipos inmunológicos de LAL-B, según el Grupo Europeo para la caracterización inmunológica de leucemias agudas (EGIL), 1995.**

| Subtipos        | Marcadores inmunológicos                             |
|-----------------|--|
| LALB1 o pro-B   | CD79a+ y/o CD22+ y/o CD19+                           |
| LALB2 o común   | CD79a+ y/o CD22+ y/o CD19+, CD10+                    |
| LALB3 o preB    | CD79a+ y/o CD22+ y/o CD19+,<br>μ intracitoplasmática |
| LALB4 o maduros | CD79a+ y/o CD22+ y/o CD19+, Ig Sup +                 |

### **I. 3. 2 FACTORES PRONÓSTICOS**

La estratificación del tratamiento en los pacientes con leucemia aguda, tanto LLA como LMA, según factores pronósticos ha permitido aumentar la supervivencia global. Se intensifica el tratamiento en aquellos con factores de mal pronóstico y se atenúa la mortalidad por toxicidad en los pacientes con factores de buen pronóstico, al administrar un tratamiento menos intensivo. Es por ello, que actualmente es muy importante identificar todos los factores pronósticos que influyen en la supervivencia de estos enfermos. Los principales factores pronósticos pretratamiento en los adultos con LLA son las características inmunofenotípicas y las alteraciones genético-moleculares de las células neoplásicas.

#### **Inmunofenotipo**

La presencia de marcadores mieloides en los pacientes con LLA-B ha sido clásicamente un factor de mal pronóstico, asociado a menor supervivencia global y mayor probabilidad de recaída. Sin embargo, existen estudios contradictorios en los que no se ha podido demostrar que este aspecto constituya un factor adverso independiente en la supervivencia de estos pacientes (Preti A, Cancer 1995; Sobol RE, N Engl J Med 1987) Probablemente, el impacto en la supervivencia esté determinado más por la lesión genética que se asocia a un determinado patrón

fenotípico, que no únicamente por la presencia en las célula leucémicas de ciertos antígenos. La expresión de antígenos mieloides en adultos con LLA-B se observa entre 18% y el 57% de los casos según las diferentes series y los antígenos expresados con mayor frecuencia son el CD33 y el CD13 (Preti A, Cancer 1995).

### **Alteraciones genético-moleculares**

Según la presencia de anomalías citogenéticas en los adultos con LLA-B se han definido tres grupos de pacientes con diferente pronóstico:

**Tabla 2: Clasificación citogenética de la LLA en el adulto en 3 grupos pronósticos (Wetzler, Hematology/Oncology Clin of North America, 2000)**

| <b>Grupo Pronóstico</b> | <b>Alteración citogenética</b>  |
|-------------------------|---|
| <b>Favorable</b>        | Hiperdiploidia; del (6q); del (12p) o t (12p); t(14q11-q13)                   |
| <b>Intermedio</b>       | Normal; +21; del (9p) o t(9p)   |
| <b>Desfavorable</b>     | t(9;22) (q34;q11); +8; t(4;11) (q23;p13); -7 hipodiploidia, t(1;19) (q23;p13) |

### ***Hiperdiploidia***

Es la ganancia de cromosomas por parte de una célula, con lo que el número de cromosomas totales sería superior a 46. La hiperdiploidia especialmente superior a 51 cromosomas es mucho más frecuente en niños y se asocia a mayor supervivencia global (Jackson JF, Cancer 1990). Estudios *in vitro* han demostrado que el buen pronóstico de esta alteración se debería a la mayor propensión a la apoptosis y a la mayor sensibilidad a las drogas antileucémicas que presentan las células hiperdiploides (Ito C, Blood 1999; Kaspers GJ, Blood 1995). Sin embargo, el buen pronóstico de esta alteración genética en niños no se traduce igual en adultos. Esto sería debido a que la hiperdiploidia en adultos con frecuencia se asocia con otras alteraciones cromosómicas de mal pronóstico como la translocación (9;22) o con anomalías moleculares que producen resistencia a drogas o modificaciones en la vía de la apoptosis (Secker-Walker LM, Br J Haemato 1997; Faderl S, Blood 1999).

El inmunofenotipo más frecuente en este tipo de alteración genética es el del precursor linfoide B con expresión de CD19, CD10 y Tdt. El antígeno CD45 normalmente es negativo y en cuanto a la expresión de antígenos mieloides el más frecuente es el CD66c, mientras que suelen ser negativos el CD13 y CD33. (Hrusák O, Leukemia 2002).

### ***Translocación BCR-ABL***

El cromosoma Filadelfia resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, t(9;22) (q34;q11). Parte del gen ABL se fusiona con el gen BCR dando lugar al gen BCR-ABL. Existen tres tipos de

productos de fusión de diferente peso molecular: p190, p210 y p230 (Faderl S, N Engl J Med 1999). Las proteínas BCR-ABL tienen una función tirosín-quinasa y están implicadas en varias vías intracelulares de transducción de señales. La estimulación de estas vías da lugar a la activación de ciertas familias de proteínas JAK, STAT, etc que inducen la transcripción de genes importantes en la transformación de los progenitores hematopoyéticos (Pui L, EMBO J 1994). Actualmente existen nuevos fármacos como el STI-571 que actúan inhibiendo estas señales de transducción y por tanto modulando la capacidad de transformación de las proteínas BCR-ABL (Deininger MW, Blood 1997).

El cromosoma Filadelfia es la alteración genética más frecuente en los adultos con LLA-B, con una frecuencia aproximada del 30%, siendo en los niños inferior al 5%. La presencia de esta translocación se asocia claramente a mal pronóstico, con una tasa alta de remisiones completas pero con frecuentes recaídas, por lo que la supervivencia global de estos pacientes no supera el 30%. (Faderl S, Blood 1998). El patrón inmunofenotípico más característico de esta translocación es CD10+, CD34+ fuerte, CD38+ débil y heterogéneo y con frecuencia se expresan los marcadores mieloides CD13 y CD33 (Taberero MD, Leukemia, 2001).

### ***TEL-AML1***

La translocación t(12;21)(p12;q22) da lugar al gen de fusión TEL-AML1. Es la alteración genética más frecuente en niños con LLA-B, aproximadamente ocurre en 25-30%, mientras que en adultos la frecuencia es sólo del 5% (Shurtleff

SA, Leukemia 1995). Esta alteración genética se asocia a buen pronóstico, independientemente de otros factores como la edad o la cifra de leucocitos (Takahashi Y, J Pediatr Hematol Oncol 1998).

La proteína de fusión TEL-AML1 actuaría inhibiendo al gen AML1 y por tanto inhibiendo la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos y posiblemente la apoptosis (Fenrick R, Mol Cell Biol 1999). La baja incidencia de esta anomalía en adultos con LLA-B sugiere que los diferentes mecanismos genético-moleculares contribuyen a la diferencia en el comportamiento clínico de esta enfermedad entre adultos y niños. El fenotipo característico de esta anomalía genética corresponde al típico del precursor linfocito B: CD10+ con frecuencia sobrepresado, CD19+ CD34+ Tdt+ y expresión variable de los antígenos mieloides CD13 y CD33 (Borowitz M, Leukemia 1998).

### ***t(4;11) (q21;q23)***

El gen MLL, localizado en el cromosoma 11 región q23, es un gen con alta promiscuidad molecular que se ha encontrado translocado con más de 20 partners diferentes. Se trata de una anomalía cromosómica frecuente en pacientes con LMA y LLA. También se ha detectado en LMA secundarias, especialmente en aquellas relacionadas con la exposición de agentes inhibidores de la topoisomerasa II como las epipodofilotoxinas. El gen MLL tiene una acción fundamental en el desarrollo normal de la hematopoyesis en los mamíferos a través de la regulación de los genes homeobox (Hox). Aunque no se conoce con exactitud, las proteínas de fusión generadas de su translocación con otros genes actuarían alterando la función

normal del gen MLL como regulador de la expresión de los genes Hox dando lugar a la leucemogénesis (Di Martino, Br J Haematol 1999). Este grupo molecular de leucemias incluye un conjunto heterogéneo de anomalías citogenéticas como translocaciones, deleciones, duplicaciones, e inversiones. En la LLA la translocación más frecuente es la t(4;11) (q21;q23) que está presente en el 3% al 7% de los adultos con LLA y confiere muy mal pronóstico. La t(4;11) suele asociarse a hiperleucocitosis y organomegalias. Fenotípicamente las células con esta lesión se caracteriza por ser CD19+, CD10- CD15+ (Johansson B, Leukemia 1998).

Además de las anomalías citogenéticas, en la LLA existen también alteraciones moleculares con impacto en la supervivencia de los enfermos y que potencialmente son dianas en las nuevas estrategias terapéuticas. Algunas de las más importantes son las alteraciones del ciclo celular y las alteraciones del gen ras.

### ***Alteraciones en la regulación del ciclo celular***

Las anomalías en el control del ciclo celular son cruciales en el desarrollo y progresión del cáncer y la leucemia en humanos. El gen del retinoblastoma y la proteína *p53* son importantes reguladores del ciclo celular y actúan a través de ciclinas e inhibidores de las ciclinas como la proteína *p16* , *p15* y *p14*. Estas proteínas regulan el ciclo celular e inhiben la expresión de ciertos oncogenes. La inhibición de *p16*, *p15* y *p14* puede se debida a deleción, hipermetilación o mutación (Iravani M, Oncogen1997).

Alteraciones en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21) ocurren en el 15% de los pacientes con LLA y se asocian con frecuentes recaídas y corta supervivencia global. Los genes que codifican para *p16* y *p15* se encuentran en regiones próximas a 9p21. Las deleciones en *p16*, *p15* o *p14* se asocian a mal pronóstico en niños con LLA pero existen controversias en cuanto a su pronóstico en adultos (Chim CS, Cancer 2001).

Recientemente se ha demostrado que la hipermutación de p21 (ciclina que también actúa regulando a p53) constituye un factor de mal pronóstico en pacientes con LLA (Román J, Blood 2002).

### ***Mutaciones en el gen Ras***

La familia de los genes Ras codifica para proteínas implicadas en la transmisión de señales desde la superficie de la célula hasta el núcleo y en la transcripción de genes esenciales en la proliferación, diferenciación y apoptosis de células. Mutaciones activas del gen Ras se han detectado hasta en el 80% de los tumores sólidos y aproximadamente en el 4% al 18% de los niños con LLA. Aunque los estudios se han realizado en pocos pacientes la presencia de estas mutaciones parece asociarse a un pronóstico adverso (Lubbert M, Blood 1990). Además, las vías en las que están implicadas las proteínas Ras ofrecen interesantes posibilidades en la terapia antileucémica, como por ejemplo los fármacos que inhiben a la enzima farnesyl transferasa (Beaupre DM, J Clin Oncol 1999).

## **I. 4 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

La leucemia mieloide aguda (LMA) se produce por una alteración en la regulación del crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas, lo que da lugar a la acumulación de precursores inmaduros mieloides con capacidad para replicarse, pero que han perdido su capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras. Por consiguiente, la médula ósea es ocupada por células leucémicas que impiden una hematopoyesis normal. El proceso de transformación de la célula leucémica tiene lugar en distintas fases, en las que se van acumulando diversas alteraciones genéticas que potenciadas por factores del microambiente celular condicionan la aparición de una hematopoyesis leucémica clonal.

### **I. 4. 1 CLASIFICACIÓN**

La LMA es un proceso extraordinariamente heterogéneo, tanto desde el punto de vista morfológico como genético e inmunofenotípico. La primera clasificación de esta enfermedad propuesta por el grupo FAB en el año 1976, se basó exclusivamente en criterios morfológicos y citoquímicos. Inicialmente se reconocieron 6 subtipos de LMA, según la diferenciación en una o más líneas celulares y el grado de maduración. Posteriormente, el grupo realizó sucesivas revisiones, surgieron nuevos subtipos y se incorporaron para su diagnóstico algunos criterios inmunofenotípicos y ultraestructurales. Recientemente, la European Association of Hematopathologists y la Society for Hematopathology

han desarrollado una nueva clasificación de las enfermedades hematológicas malignas denominada clasificación WHO, que estratifica las neoplasias de acuerdo a su origen celular: mieloide , linfoide, histiocítico y de origen en los mastocitos. Con respecto a las neoplasias mieloides, la clasificación WHO distingue cuatro grandes grupos: enfermedades mieloproliferativas, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicos y leucemias mielodes agudas. A su vez, para subclassificar estos grupos de neoplasias mieloides, la clasificación WHO integra los rasgos morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos.

#### **I. 4. 2 FACTORES PRONÓSTICOS**

Al igual que en la LLA la estratificación del tratamiento según factores pronósticos ha permitido aumentar la supervivencia global de los enfermos con LMA. Los principales factores pronósticos en este tipo de leucemia pueden dividirse entre los relacionados con características del paciente y los relacionados con características biológicas de la leucemia. Entre los primeros destaca la edad y el estado general. La edad superior a 60-65 años es un factor independiente de mal pronóstico y además se asocia a mayor número de cariotipos complejos y a mayor resistencia a la quimioterapia. Entre los factores pronósticos relacionados con la biología de la leucemia destacan la cifra de leucocitos al diagnóstico, el número de ciclos necesarios para alcanzar la remisión completa, la citogenética, la resistencia a la quimioterapia y el antecedente previo de mielodisplasia. La leucocitosis y el

mayor número de ciclos de quimioterapia de inducción necesarios para alcanzar la RC se asocian a mal pronóstico. El antecedente previo de mielodisplasia también es un factor de mal pronóstico, al igual que los niveles elevados de expresión de genes relacionados con quimioresistencia como el MDR-1 (Estey EH, Leukemia 2001).

En los últimos años la citogenética y las alteraciones moleculares se han definido como factores pronósticos con gran impacto en la supervivencia de los enfermos con LMA. La clasificación MRC, una de las más utilizadas en protocolos clínicos, divide las alteraciones citogenéticas en tres grupos según confieran buen o mal pronóstico o bien no tengan impacto en la supervivencia de los enfermos con LMA.

**Tabla 3: Clasificación OMS de las leucemias mieloides agudas*****Leucemia mieloide aguda con translocaciones citogenéticas recurrentes***

Leucemia mieloide aguda t(8;21)(q22;q22), aml/eto  
 Leucemia promielocítica aguda LMA con t(15;17)(q22;q11-12) y variantes, pmr-rar $\alpha$   
 Leucemia mieloide aguda con eosinófilos anormales en la médula ósea inv (16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22), cbf $\beta$ /myh-11  
 Leucemia mieloide aguda con anomalías 11q23 (mll)

***Leucemia mieloide aguda con displasia trilineal***

Con síndrome mielodisplásico previo  
 Sin síndrome mielodisplásico previo

***Leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásicos relacionados con terapias previas***

Relacionados con agentes alquilantes  
 Relacionados con epipodofilotoxinas  
 Otros tipos

***Leucemias mieloides agudas no clasificables***

Leucemia mieloide aguda mínimamente diferenciada  
 Leucemia mieloide aguda sin maduración  
 Leucemia mieloide aguda con maduración  
 Leucemia mielomonocítica aguda  
 Leucemia monocítica aguda  
 Leucemia eritroide aguda  
 Leucemia megacariocítica aguda  
 Leucemia basofílica aguda  
 Panmielosis aguda con mielofibrosis  
 Leucemias bifenotípicas agudas

**Tabla 4: Clasificación citogenética de las LMA**

| <b>Grupo Pronóstico</b> | <b>Alteración citogenética</b>         |
|-------------------------|--|
| <b>Favorable</b>        | t(15;17); t(8;21); inv (16) o t(16;16) |
| <b>Intermedio</b>       | Normal; +8; +21; del (7); del (9); +22 |
| <b>Adverso</b>          | -7; abn (3q); del (5q); -5; 11q23      |

### ***t(15;17)(q22;q21)***

Esta translocación da lugar al gen de fusión PML/RAR $\alpha$  y es específica de la leucemia mieloide aguda M3. Representa alrededor del 15% de los casos de LMA. El gen de fusión aberrante PML/RAR $\alpha$  actúa como inhibidor de las funciones de los genes PML y RAR $\alpha$  que fundamentalmente son el crecimiento y la diferenciación normal de las células hematopoyéticas (Chen Z, Gene Chrom 1996). Citológicamente se caracteriza por la presencia de promielocitos atípicos con abundantes gránulos y bastones de Auer formando astillas. Morfológicamente existen formas variantes como la microgranular. Desde el punto de vista citogenético también existen variantes de la forma clásica como la t(11;17) y la t(5;17) que no dan lugar al gen de fusión PML/RAR $\alpha$  y por tanto no responden al tratamiento con ATRA. El inmunofenotipo típico de este tipo de leucemia se caracteriza por ser negativo para los antígenos CD34, HLA-DR y CD15 y positivo para CD33 y CD13, este último con una expresión heterogénea (Orfao A, Haematologica 1999). Aunque este patrón inmunológico no es específico de esta translocación citogenética, es bastante característico y puede ayudar al diagnóstico de este tipo de leucemia.

### ***t(8;21)(q22;q22)***

Esta alteración citogenética se asocia a LMA tipo M2 en la mayoría de los casos, pero también puede observarse en los subtipos M1 y M4 (Downing JR ,

Blood 1993). Como resultado de esta translocación se produce el gen de fusión AML1/ETO que actuaría como inhibidor de la función de transcripción del gen AML1 o CBF $\alpha$ , dando lugar a un bloqueo en la diferenciación granulopoyética (Meyers S, Mol Cell Biol 1995). Es una de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en la LMA, especialmente en individuos de menos de 45 años, con una frecuencia entre el 5 y el 10% de las LMA *de novo* (Mitelman F, Genes Chr Cancer 1992). Morfológicamente se caracteriza por la presencia de blastos tipo III con citoplasma basófilo, granulación azurófila y bastones de Auer. Un 5% de los casos pueden mostrar maduración eosinófila aunque no tan pronunciada como en la M4- Eo. Las células blásticas de este tipo de leucemia suelen ser CD34+ CD13+ CD33+ HLA-DR+ y con frecuencia coexpresan marcadores como el CD19 y el CD56 (Kita K, Blood 1992; Porwit- McDonald A, Blood 1992; Seymour JF, Leukemia 1994). Esta translocación se asocia a una alta tasa de remisiones completas y a larga supervivencia (Dastugue N, Leukemia 1994).

***inv (16) (p13;q22)/ t(16;16)***

Esta alteración aparece asociada a la M4-Eo, pero también se ha observado en un porcentaje de leucemias clasificadas como M1, M2, M4 o M5. Como consecuencia de esta anomalía citogenética se produce el gen de fusión CBF $\beta$ /MYH-11 con acción inhibidora de complejo de transcripción CBF $\alpha$ / $\beta$  (Mitelman F, Genes Chr Cancer 1992 ). Morfológicamente este subgrupo de leucemias se caracterizan por la presencia en la MO de eosinófilos anormales con

granulación eosinófila y basófila con positividad para la tinción de PAS y CAE. La leucemia M4-Eo con alteraciones del cromosoma 16 representa alrededor del 10-12% de las LMA y es más frecuente en adultos jóvenes. Tiene un pronóstico favorable con una alta tasa de remisiones completas (Bloomfield CD, Sem Oncol 1987). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que existiría un subgrupo de pacientes con este tipo de leucemia, en general aquellos con una gran leucocitosis al diagnóstico, con riesgo elevado de recaída (Martín G, Haematologica 2000). El estudio post-remisión en estos enfermos mediante RT-PCR cuantitativa podría ayudar a identificar aquellos pacientes con alta probabilidad de recaída y por tanto subsidiarios de intensificar el tratamiento post-remisión (Buonamici C, Blood 2002).

### ***Alteraciones de 11q23***

Como ya se ha comentado previamente, las alteraciones en el gen MLL se encuentran entre las anomalías más frecuentes en los pacientes con leucemia aguda. Este subgrupo molecular está formado por un conjunto heterogéneo de anomalías citogenéticas. Entre las translocaciones más frecuentes en la LMA destacan la t(9;11) y la t(6;11), y menos frecuentemente la t(4;11) y la t(11;19). En general se asocian a mal pronóstico, aunque también existe heterogeneidad en este aspecto. Estudios con gran número de pacientes han demostrado el mal pronóstico de la t(6;11) y t(4;11), mientras que la t(9;11) no parece ser un factor pronóstico adverso (Di Marino J, Br J Haematol 1999; Rowley JD, Semin Cancer 1993; Rubnitz JE, Leukemia 1996; Mrózek K, Blood 1997; Swansbury GJ,

Leukemia 1998). Las leucemias secundarias con alteraciones de 11q23 se caracterizan por tener muy mal pronóstico y un periodo de latencia muy corto, a veces incluso de pocos meses (Di Martino J, Br J Haematol 1999).

### ***Alteraciones moleculares***

A pesar de que las alteraciones citogenéticas son un importante factor pronóstico en los pacientes con LMA, actualmente sólo se detectan en el 50-55% de los casos. Existe por tanto un gran grupo de pacientes con cariotipo normal, con unas características muy heterogéneas tanto desde el punto de vista biológico como en cuanto a la supervivencia. Es en estos pacientes, en los que es imprescindible encontrar nuevos factores pronósticos que permitan definir subgrupos con diferente supervivencia y por consiguiente tributarios también a un tratamiento más individualizado. Dos de las principales alteraciones moleculares que recientemente han emergido como factores adversos en la supervivencia de los pacientes con LMA son la duplicación del gen MLL y la duplicación del gen FLT3. Ambas son más frecuentes en los pacientes con cariotipo normal.

### ***Duplicación del gen MLL***

Ya se ha comentado previamente que el reordenamiento del gen MLL debido a translocaciones con diferentes partners es una anomalía genética frecuente en las leucemias agudas. Un nuevo mecanismo de leucemogénesis por reordenamiento de este gen es su duplicación en tandem (MLL-PTD).

Inicialmente se describió en pacientes con trisomía 11 y también en pacientes con cariotipo normal (Caligiuri MA, Cancer Res 1998) y más recientemente se ha encontrado en pacientes con otras anomalías citogenéticas que no incluyen la 11q23 (Schnittger S, Blood 2002). Para su estudio las técnicas moleculares de elección son el Southern blot y en aquellos casos que en no exista ningún reordenamiento citogenético con otro partner investigar la duplicación del gen mediante la secuenciación por RT-PCR (Schnittger S, Leukemia 2000). Su frecuencia en la LMA oscila entre el 4 y el 21% según las diferentes series y sería del 10% en los pacientes con cariotipo normal (Caligiuri MA, Cancer Res 1998; Schnittger S, Leukemia 2000). Esta alteración se asocia a leucemias monocíticas y parece conferir mal pronóstico.

### ***Duplicación del gen FLT3***

El gen FLT3 localizado en el cromosoma 13 es miembro de la familia de los receptores de las tirosín-quinazas que incluye también a c-kit, FMS y PDGFR (Ullrich A, Cell 1990). FLT3 se expresa preferentemente en los precursores hematopoyéticos y tiene un papel importante en el desarrollo de la hematopoyesis normal (Lyman SD, Cell 1993; Broxmeyer HE, Exp Hematol 1995). Estudios previos han demostrado que un gran número de LMA, LLA y crisis blásticas de LMC sobrepresan FLT3 ( Meierhoff G, Leukemia 1995; Drexler HG, Leukemia Lymphoma 1999) e *in vitro* se ha demostrado que la administración del ligando de FLT3 (FL) genera una respuesta proliferativa en un número significativo de LMA (Drexler HG, Leukemia Lymphoma 1999; Lisovsky M, Blood 1996).

Recientemente, se han descrito en pacientes con LMA mutaciones en FLT3 asociadas a mal pronóstico. La mayoría de estas mutaciones son duplicaciones en el dominio yuxtamembrana y estudios posteriores han demostrado que se trata de una alteración con una alta incidencia en pacientes con LMA (20-30%) (Nakao M, *Leukemia* 1996; Kottaridis P, *Blood* 2001; Schnittge S, *Leukemia* 2000). Aunque la duplicación interna en tandem es la mutación más frecuente descrita en el gen FLT3, mutaciones puntuales en Asp835 también han sido reportadas aproximadamente en el 7% de pacientes con LMA (Yamamoto Y, *Blood* 2001). Esta alteración molecular se asocia con hiperleucocitosis al diagnóstico, es más frecuente en pacientes con cariotipo normal y aunque existen controversias parece conferir mal pronóstico (Kottaridis P, *Blood* 2001; Schnittge S, *Leukemia* 2000; Rombouts WJC, *Leukemia* 2000).

## **I. 5. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES DE LA CITOMETÍA DE FLUJO**

### **I.5.1 INTRODUCCIÓN**

En los últimos años, los avances científicos han permitido avanzar en el conocimiento de la etiopatogenia y la fisiopatología de muchas enfermedades, dependiendo en cierto modo del desarrollo concomitante de nuevos métodos de análisis celular. Entre estos métodos destaca la citometría de flujo por la relevancia que esta técnica ha alcanzado, tanto en el área de investigación como en la del diagnóstico clínico. La objetividad, sensibilidad y rapidez son algunas de las características de la citometría de flujo que han hecho que esta técnica de análisis celular se utilice ampliamente tanto en los laboratorios de investigación básica como en los laboratorios clínicos. La citometría de flujo permite analizar de forma simultánea diversas características celulares, lo que proporciona información de un gran número de parámetros de cada una de las células.

El análisis inmunofenotípico es actualmente un complemento muy valioso de las técnicas clásicas utilizadas en el estudio de las enfermedades hematológicas como son la morfología o la citoquímica, y junto con la citogenética y la biología molecular constituyen técnicas imprescindibles para la correcta caracterización de las leucemias agudas.

## **I.5.2 GENERALIDADES DEL CITÓMETRO DE FLUJO**

La citometría de flujo representa un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión. El principio en el que se basa es hacer pasar dichas partículas alineadas y de una en una por un haz luminoso. La interacción de las células o las partículas con el rayo genera señales que son recogidas por los detectores adecuados. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que procesa el ordenador. Para todo ello los citómetros constan de los siguientes componentes: 1) un sistema de inyección de la muestra por el que las células se transportan en una corriente de flujo hidrodinámico, 2) un sistema de fluidos cuya función es crear un flujo laminar, mediante un sistema regulable de presiones que hace que las células permanezcan en el centro de un caudal de líquido isotónico y crucen perpendicularmente, alineadas y de una en una el rayo luminoso, 3) la fuente de luz generalmente un láser que emite luz azul a 488 nm, actualmente los citómetros de uso más generalizado poseen 2 láseres, 4) un sistema óptico formado por un conjunto de lentes, espejos y filtros que permiten separar la luz de diferente color, con información sobre las distintas características de las células analizadas como son la complejidad interna y el tamaño celular así como

cada una de las emisiones fluorescentes correspondientes a los diferentes fluorocromos presentes en la célula y excitados de forma simultánea, 5) detectores en ellos se generan pulsos eléctricos cuya área, altura y anchura son directamente proporcionales a la cantidad de luz total, a la intensidad máxima detectada y a la duración de la señal luminosa, respectivamente, 6) amplificador/convertidor, las señales electrónicas generadas por los detectores son amplificadas multiplicándolas por un factor lineal o logarítmico, así el tamaño de la señal electrónica producida por una célula es una medida cuantitativa de la cantidad de compuesto fluorescente sobre su superficie y refleja el número de receptores/marcadores que tiene dicha célula, 7) sistema informático que permite la presentación de los datos así como su análisis y almacenamiento.

### **I. 5. 3 APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE LA LEUCEMIA AGUDA**

La utilización de la citometría de flujo ha estado restringida durante años a la investigación básica debido en gran medida a la complejidad de esta tecnología ya que inicialmente se requerían unas instalaciones sofisticadas y un personal muy especializado para el manejo del instrumento. Los avances acontecidos en esta y otras áreas relacionadas han propiciado el desarrollo de nuevos instrumentos de gran sensibilidad analítica y de fácil manejo. Esto, junto con la aparición de nuevas aplicaciones han contribuido a la rápida difusión de esta tecnología en el laboratorio clínico.

Entre las principales aplicaciones de la citometría de flujo en el estudio de la leucemia aguda tanto desde el punto de vista del diagnóstico clínico como en el del conocimiento biológico, destaca la determinación de antígenos celulares mediante AcMo marcados con fluorocromos. Las combinaciones de diversos AcMo contra antígenos celulares pueden utilizarse para identificar poblaciones celulares específicas. Desde el ámbito más clínico, esta aplicación ha contribuido de manera importante al diagnóstico de la leucemia, ha permitido la clasificación fenotípica de los diferentes subtipos de leucemia aguda, ha aportado información pronóstica y más recientemente se ha empezado a utilizar en el seguimiento de los enfermos en remisión completa.

### **I. 5. 3. 1 FENOTIPAJE DE LA LEUCEMIA AGUDA**

Las leucemias agudas se caracterizan por ser una acumulación de células hematopoyéticas bloqueadas en un estadio precoz de maduración. El diagnóstico y clasificación de las leucemias se ha basado en criterios morfológicos y citoquímicos. Sin embargo, la citometría de flujo se ha convertido en el método más extendido para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas y actualmente es fundamental para su diagnóstico, además de aportar valiosa información pronóstica y permitir también el seguimiento de enfermos en RC. La integración de la información complementaria de varios métodos como la morfología, la

citogenética, la citometría de flujo y la biología molecular es imprescindible para la correcta caracterización de la leucemia aguda.

Desde el punto de vista diagnóstico, el estudio inmunofenotípico permite clasificar el tipo de leucemia aguda según la línea celular a la que pertenezca. Existen una serie de marcadores útiles para la asignación de línea entre los que destacan los de citoplasma CD79a, CD3 y MPO que son altamente específicos de línea linfocítica B, linfocítica T y mielocítica, respectivamente. Estos marcadores intracitoplasmáticos así como otros de superficie forman un panel útil para la subclasificación de las leucemias agudas publicado por el grupo EGIL ( Bene MC, Leukemia 1995).

### **I. 5. 3. 2 OTRAS APLICACIONES**

Aunque el fenotipaje de leucemias es una de las aplicaciones más extendidas de la citometría y es el motivo principal de esta tesis, la utilidad de este método es mucho mayor. Sólo destacaremos algunas de ellas por ser las de mayor uso en los laboratorios clínicos. Entre estas aplicaciones cabe destacar el estudio de los síndromes linfoproliferativos. La citometría de flujo es un método rápido y objetivo para diferenciar la linfocitosis reactiva de un proceso monoclonal. Además permite la filiación de un determinado proceso linfoproliferativo dentro de los subgrupos con características fenotípicas, clínicas y biológicas específicas. Otras de las aplicaciones es el estudio de las subpoblaciones linfocitarias especialmente en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana

(VIH), pero también útil en pacientes con inmunodeficiencias congénitas, enfermedades autoinmunes, neoplasias o en la monitorización de pacientes trasplantados. Además, la citometría es también de utilidad en el estudio de las gammapatías monoclonales, en las trombocitopatías y trombocitopenias y en el tipaje de antígenos HLA. Este método permite la cuantificación de ADN y de ARN y realizar estudios de cuantificación de células progenitoras y de viabilidad celular en productos de aféresis para trasplante de progenitores hematopoyéticos.

## **I. 6 ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA (ERM)**

### **I. 6. 1 DEFINICIÓN**

Un paciente con leucemia aguda tiene al diagnóstico aproximadamente  $10^{12}$  células malignas (Ryan DH, Kluwer Academic, 1988). Se considera que el enfermo está en RC cuando se detectan morfológicamente menos del 5% de blastos en médula ósea (Cheson J, Clin Oncol 1990). Sin embargo, muchos de estos pacientes considerados en RC mediante los métodos convencionales recaen. El nivel de células malignas que persisten en los enfermos con leucemia aguda ha sido desconocido durante muchos años. Por esta razón las estrategias terapéuticas hasta ahora no han discriminado entre pacientes con altos niveles de células leucémicas tras el tratamiento de inducción, de aquellos en los que si que se consigue erradicar toda la enfermedad. El objetivo del estudio de la ERM es conocer mejor la cantidad total de células leucémicas que permanecen en los enfermos en RC para detectar aquellos con alta probabilidad de recaer y que por tanto serían subsidiarios de intensificar el tratamiento.

### **I. 6. 2 MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ERM**

En general se considera que un método es eficaz para la detección de ERM cuando tiene las siguientes características: sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y aplicabilidad. En cuanto a la sensibilidad, que es el límite de

detección, se requiere que estos métodos permitan detectar una célula leucémica entre  $10^4$  y  $10^6$  células normales. La reproducibilidad consiste en que estas técnicas sean objetivas y fáciles de estandarizar en diferentes laboratorios. La especificidad viene dada por la capacidad que tiene el método para distinguir células leucémicas de células normales y por último debe de tener alta aplicabilidad, es decir, debe ser un método rápido y fácil de utilizar en la rutina de un laboratorio clínico.

Las células leucémicas pueden distinguirse de los progenitores hematopoyéticos normales en base a sus características morfológicas y citoquímicas, mediante alteraciones genéticas, por diferentes requerimientos en el crecimiento celular *in vitro* y mediante su inmunofenotipo. Combinaciones de todas estas características se han utilizado en la detección de la ERM.

#### **I. 6. 2. 1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E HIBRIDACIÓN IN SITU**

Las alteraciones cromosómicas constituyen uno de los marcadores leucémicos más específicos, sin embargo su detección mediante citogenética convencional tiene una baja sensibilidad, lo que condiciona su utilidad en el estudio de la ERM. Otra de las limitaciones de esta técnica es que su análisis se restringe a células en metafase y en algunas leucemias agudas no es posible inducir metafases. En este sentido la hibridación *in situ* podría ser una alternativa con mayor sensibilidad y por tanto con mayor utilidad en la detección de células leucémicas residuales. La hibridación *in situ* permite realizar un estudio citogenético

a nivel molecular puesto que localiza secuencias específicas de ADN en estructuras biológicas preservadas morfológicamente (células, cromosomas, etc). Para ello se utilizan sondas genéticas marcadas con fluorocromos que reconocen regiones específicas al unirse a la secuencia de ADN complementario. Esta técnica permite estudiar además núcleos en interfase. Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica (1%) sigue siendo una limitación en su aplicación en el estudio de la ERM. Una aproximación para aumentar la sensibilidad de esta metodología es su combinación con citometría de flujo para la separación de células selectivamente, por ejemplo CD34+. En un estudio realizado con 13 pacientes con LMA en remisión completa, Drach y col (Drach J, Blood 1994) investigaron la presencia de anomalías cromosómicas numéricas (monosomía 7 y trisomía 8) en células seleccionadas CD34+ de MO y demostraron que esta metodología era útil para la predicción de recaídas.

### **I. 6. 2. 2. CULTIVOS CELULARES**

Esta técnica permite detectar células progenitoras neoplásicas capaces de formar colonias leucémicas o UFC-L. La utilización de estos cultivos en el estudio de la ERM se basa en el hecho de que las células leucémicas pueden crecer selectivamente bajo determinadas condiciones de cultivo, inhibiendo el crecimiento de los progenitores hematopoyéticos normales. Sin embargo, un problema debatido es la especificidad de las UFC-L en cuanto a su discriminación respecto a las UFC-GM normales, especialmente cuando el cultivo se realiza a

partir de MO en remisión. Es por ello que una de las principales aplicaciones de esta técnica es su utilización combinada con otras como la citogenética, el inmunofenotipo o la PCR para poder confirmar de esta manera el origen clonal de las colonias (Metcalf D, Elsevier 1984).

### **I. 6. 2. 3 TÉCNICAS MOLECULARES: SOUTHERN BLOT Y PCR**

El estudio de la ERM a nivel molecular se ha centrado fundamentalmente en dos técnicas: análisis de Southern blot y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de translocaciones cromosómicas específicas o bien de reordenamientos clonales de determinados genes, especialmente los de las Ig o del receptor de las células T.

**Análisis de Southern blot:** este método consiste en la extracción de ADN de las células y su digestión mediante endonucleasas de restricción, para ser fraccionado por tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa. Posteriormente se trasfiere a un filtro de nailon que se hibridará con sondas específicas para los genes que se quieren detectar marcados radiactivamente. La detección de una banda uniforme y con movilidad electroforética diferente de la generada por células normales, banda germinal, revela la existencia de un reordenamiento clonal del gen analizado. Una de las principales limitaciones de esta técnica en el estudio de la ERM es su baja sensibilidad, de 1 a  $5 \times 10^{-2}$ , similar a la morfología, pero a diferencia de ésta no presenta falsos positivos, puesto que es altamente específica.

**Técnica de PCR:** la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN. Es una de las técnicas más utilizadas en el

estudio de la ERM puesto que tiene una alta sensibilidad, del orden de  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$ , es decir puede detectar una célula leucémica entre 1 millón de células normales. Como es lógico, una premisa en la amplificación en PCR para el estudio de la ERM es que la región de ADN a amplificar sea un marcador específico de célula leucémica. Las dianas más utilizadas son los reordenamientos clonales de los genes de las Ig o del receptor de la célula T y las translocaciones cromosómicas presentes en algunas leucemias. Esto hace que sea un técnica con alta especificidad, pero que no pueda ser utilizada en casos en los que no hay ningún marcador molecular (Van Dongen JJM, Clin Chim Acta 1991).

#### **I. 6. 2. 4 INMUNOFENOTIPO**

Este método, junto con las técnicas moleculares, es actualmente uno de los más utilizados en el estudio de la ERM en los pacientes con leucemia aguda. La citometría de flujo es un método rápido y sensible ( $10^{-3}$ - $10^{-5}$ ) a la vez que reproducible y de fácil aplicación y por tanto muy atractivo para la investigación de células leucémicas residuales. Numerosos estudios han demostrado la utilidad de esta técnica en la detección de ERM y por tanto en la predicción de recaídas en enfermos con LLA y LMA.

Existen tres criterios fundamentales en el estudio de la ERM mediante citometría de flujo que son : 1) la detección de fenotipos aberrantes existentes al

diagnóstico, 2) la detección de fenotipos ectópicos y 3) la alteración del cociente mieloide/linfoide de las células CD34+.

#### **I. 6. 2. 4. 1 Fenotipos aberrantes**

Un requisito imprescindible para el estudio de la ERM mediante este criterio es la existencia al diagnóstico de fenotipos aberrantes para poder seguir durante la remisión. Según diferentes estudios se considera que el 80% de las LLA de fenotipo B y el 75% de las LMA presentan al menos un fenotipo aberrante al diagnóstico (Campana D, Cytometry 1999). Uno de los principales problemas de esta metodología es que no existe ningún fenotipo exclusivo de leucemia. Debido a esta falta de especificidad en ocasiones resulta difícil distinguir entre células leucémicas y precursores hematopoyéticos normales. Este problema se ha resuelto en parte con los estudios realizados en MO de personas sanas. Gracias a estos estudios y a los paralelos en pacientes con leucemia aguda se ha podido demostrar la existencia de múltiples fenotipos aberrantes en estos enfermos con respecto a los patrones fenotípicos de los progenitores hematopoyéticos normales (Lucio P, Leukemia 1999; Macedo A, Leukemia 1995). Es por ello que se consideran fenotipos leucémicos o “asociados a leucemia” aquellos fenotipos que se detectan en las células blásticas y que en cambio no se encuentran o bien están escasamente representados en la diferenciación hematopoyética normal. Basándose en todos estos estudios se consideran cuatro tipos de fenotipos aberrantes:

- 1) Infidelidad en la expresión de antígenos de línea:** expresión en las células leucémicas de Ag que en la MO normal están presentes en células

de otra extirpe, ej: expresión de antígenos mieloides en los linfoblastos de las LLA. Greaves y col han sugerido que la infidelidad de línea sería debida a la conservación anómala en las células leucémicas de la promiscuidad genética propia de los progenitores totipotenciales (Greaves MF, Blood 1986). La frecuencia de este tipo de fenotipo aberrante es diferente según el tipo de leucemia. Así por ejemplo se ha descrito que en la LLA es frecuente la expresión de antígenos mieloides como el CD13 y el CD33, especialmente en aquellas con la t(9;22) (Taberner MD, Leukemia 2001). En la LMA la coexpresión de Ag linfoides (CD2, CD7, CD19, entre los más frecuentes) en los blastos mieloides es aproximadamente del 30% (San Miguel J, Blood 1997; Macedo A, Ann Hematol 1995).

**2) Asincronía madurativa:** es la expresión en una célula leucémica de dos Ag que en la diferenciación hematopoyética normal pertenecen a dos etapas diferentes. Un ejemplo es la coexpresión del Ag CD34 (de inmadurez) junto con antígenos propios de un monocito maduro como el CD64 o el CD14 (Macedo A, An Hematol 1995). La frecuencia de los asincronismos madurativos es muy variable según diferentes series. Esta variación es debida en parte al panel de AcMo utilizado. Así en la LLA de línea B su incidencia oscila entre el 11% y el 93% (Drexler HG, Leukemia 1991; Hurwitz CA, Blood 1988), en la LLA de línea T es del 40% al 75% (Ross CW, Am J Clin Pathol 1990), mientras que en la LMA el asincronismo madurativo es el tipo de fenotipo aberrante más frecuente, oscilando entre el 75% y el 85% (Macedo A, Ann Hematol 1995; San Miguel JF, Blood 1997). La alta incidencia de asincronismo madurativo que

presentan las leucemias agudas es una demostración de que uno de los eventos más importantes en la leucemogénesis es la alteración en la diferenciación normal de los progenitores hematopoyéticos, pudiéndose producir una evolución clonal después de la transformación maligna de la célula.

**3) Alteración en la intensidad de expresión de antígenos:** detección de Ag en las células leucémicas que se expresan también en las células normales pero con una intensidad diferente. Algunos ejemplos son la sobreexpresión de CD10 en las LLA o el aumento de expresión del CD34 en casos de LLA y LMA (Macedo A, Ann Hematol 1995).

**4) Patrón de dispersión de la luz aberrante:** consiste en que la célula leucémica presenta un patrón de FSC y SSC que no es el habitual. Generalmente se asocia a expresión antigénica también aberrante. Algunos ejemplos son la expresión de Ags linfoides que se asocia a mayor FSC/SSC o la expresión de CD13 o CD33 con menor FSC/SSC en la LMA (San Miguel JM, Blood 1997)

#### **I. 6. 2. 4. 2 Fenotipos ectópicos**

Consiste en la presencia de células, aunque sea en número muy pequeño, con un fenotipo normal pero que están restringidas específicamente a otra localización. Por ejemplo la detección de células Tdt positivas en líquido cefalorraquídeo de pacientes con LLA (Campana D, Blood 1995).

#### **I. 6. 2. 4. 3 Alteración del cociente mielóide/linfóide de las células CD34+**

La aparición de citopenias en pacientes con leucemia aguda en RC es un signo que nos alerta de una posible recaída y representa un ejemplo de como la hematopoyesis leucémica puede alterar la diferenciación hematopoyética normal. En este sentido Martínez y col (Martínez A, Cytometry 1999) analizaron la composición normal del compartimiento más inmaduro de la médula ósea en pacientes con LMA en RC con el objetivo de analizar si alteraciones en este compartimiento durante el seguimiento de estos pacientes podían ser predictivas de recaída. Análisis en MO normales demostraron que el cociente de células CD34+ mielóide /linfóide (M/L) era inferior a 10 (2,4-8,9). Según este estudio los pacientes analizados al final del tratamiento de intensificación que tenían un cociente >10 presentaron menor supervivencia global y menor supervivencia libre de enfermedad. Por tanto la persistencia de un cociente CD34+ M/L superior a 10 en pacientes con LMA en RC tras el tratamiento de intensificación es un factor de riesgo elevado de recaída.

### **I. 6. 3 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES Y DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO EN EL ESTUDIO DE LA ERM**

La PCR y el análisis inmunofenotípico son las dos técnicas más utilizadas en la investigación de la ERM. Cada una de ellas ofrece ventajas y potenciales desventajas respecto a la otra. Desgraciadamente ninguna de ellas puede aplicarse en el 100% de los casos y esto constituye una de las principales limitaciones en la aplicabilidad clínica del estudio de la ERM. La principal ventaja de la PCR respecto al análisis inmunofenotípico es su alta especificidad, así como su elevada sensibilidad. En contra tiene una menor aplicabilidad ya que es necesario que exista una diana molecular y esto es menos frecuente que la presencia de fenotipos aberrantes en el caso del seguimiento inmunofenotípico. Por otra parte, hay que tener en cuenta también algunos problemas técnicos que pueden dar lugar a resultados falsos positivos o negativos. Entre los que pueden generar falsos positivos son la contaminación del ADN, especialmente cuando se amplifican diferentes translocaciones en las que se utilizan los mismos primers (Goldman JM, Bone Marrow Trasplant 1991). La correcta manipulación y un cuidadoso procesamiento de las muestras puede evitar estos errores. En cuanto a las cuestiones técnicas que pueden producir falsos negativos se centran sobre todo en la pureza y la cantidad de ADN a analizar.

La citometría de flujo tiene la ventaja con respecto a la PCR de ser más rápida y tener mayor aplicabilidad. En contra tiene una menor especificidad ya que

no existe ningún fenotipo exclusivo de leucemia. Existen al igual que en las técnicas moleculares, algunos problemas técnicos que pueden generar errores en los resultados. Uno de los problemas que puede generar falsos resultados negativos es la existencia de cambios fenotípicos en las recaídas y la presencia de diferentes subpoblaciones leucémicas al diagnóstico. Desde los primeros estudios de ERM ha preocupado el hecho de que puedan producirse cambios fenotípicos en los blastos en la recaída que puedan dar lugar a falsos resultados negativos (Van Wering ER, *Leukemia* 1995; Campana D, *Leukemia* 1999; Baer MR, *Blood* 2001). En realidad la mayoría de estos cambios no son tales, si no que se trata de fenotipos que ya existían al diagnóstico pero que no se habían detectado por no usar un número suficientemente grande de AcMo. Actualmente con la utilización al diagnóstico de amplios paneles de AcMo ha disminuido el número de estos falsos cambios fenotípicos. Sin embargo, los cambios fenotípicos verdaderos debidos a la evolución clonal de la leucemia durante el tratamiento siguen siendo una de las principales limitaciones de esta metodología en el seguimiento de la ERM. En un amplio estudio del Grupo Pediátrico de Oncología con 287 niños con LLA se demostró una pérdida de expresión de ciertos antígenos en la recaída: HLA-DR (20% ) y CD10 (11%) y 13 de los 37 casos de LLA pre-B estudiados perdieron la expresión de las cadenas  $\mu$  de citoplasma (Abshire TC, *Leukemia* 1992). Van Wering examinó 40 casos de niños con LLA al diagnóstico y recaída y observó cambios fenotípicos aproximadamente en dos tercios de los casos. Se trataba sin embargo de cambios menores con pérdida o adquisición de pocos marcadores (Van Wering ER, *Leukemia* 1995). Recientemente Baer y col

detectaron una alta incidencia de cambios fenotípicos en la recaída (91%) en un estudio realizado en 136 pacientes con LMA. Los antígenos que presentaban con mayor frecuencia cambios en cuanto a ganancia o pérdida de expresión eran el CD13, CD33 y CD34. Estos autores concluyen que con la utilización de un mayor número de combinaciones antigénicas al diagnóstico y en el seguimiento, se pudieron detectar precozmente células leucémicas en todas las recaídas (Baer MR, Blood 2001). Otro de los problemas en este sentido es la presencia de diferentes subpoblaciones leucémicas al diagnóstico. Muchos de los falsos cambios fenotípicos en las recaídas son en realidad expansiones de subpoblaciones leucémicas presentes ya al diagnóstico pero de forma minoritaria. En la LMA se ha descrito una alta incidencia de subpoblaciones leucémicas, alrededor del 85% (Macedo A, Leukemia 1995). En la LLA existe poca información en este sentido. Así pues, para evitar falsos negativos en el estudio de la ERM mediante el seguimiento inmunofenotípico es imprescindible la utilización de amplios paneles de AcMo al diagnóstico para detectar todos los posibles fenotipos aberrantes, así como analizar exhaustivamente la presencia de todas las subpoblaciones leucémicas, incluidas las más minoritarias. Por otro lado, resultados falsamente positivos pueden generarse también cuando el fenotipo de las células leucémicas es muy similar al de los precursores hematopoyéticos normales. En este sentido han sido muy útiles estudios en MO de sujetos sanos y de pacientes durante la recuperación de la aplasia post-quimioterapia (Terstappen L, Progress in Cytometry 1989; Loken MR, Blood 1987; Lucio P, Leukemia 1999; Martinez A, Cytometry 1999). La presencia en un paciente con leucemia aguda en RC de un fenotipo minoritario en

la MO normal pero en un porcentaje superior puede ser un dato importante en el seguimiento de la ERM. Otros problemas técnicos que también pueden dar lugar a falsos negativos o positivos en esta metodología son la contaminación con células residuales o debris que no han sido debidamente eliminadas por los fluidos del citómetro o bien la utilización de reactivos equivocados. Todos estos errores pueden evitarse con un cuidadoso procedimiento de la técnica y un correcto mantenimiento del citómetro.

La utilización conjunta de las técnicas moleculares y del análisis inmunofenotípico es una opción interesante en la investigación de la ERM. Neale y col realizaron un estudio en niños con LLA utilizando la PCR y el análisis inmunofenotípico en tandem (Neale GA, Leukemia 1999). La concordancia en la detección de células leucémicas residuales entre ambos métodos en este estudio fue alta  $R^2 = 0,96$ . La utilización conjunta de ambas técnicas en la monitorización de la ERM podría disminuir los falsos resultados derivados de problemas técnicos de cada una de las técnicas por separado.

#### **I. 6. 4 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA DETECCIÓN DE ERM.**

Bradstock y col (Lancet 1980) fueron los pioneros en el estudio de la ERM mediante el análisis inmunofenotípico. Estos autores identificaron células con inmunofenotipo patológico (Tdt+ HLA-DR-) en la MO de pacientes en RC. Este estudio puso de manifiesto que podían detectarse mediante métodos inmunológicos células leucémicas durante las remisiones clínicas. En las dos

últimas décadas han habido numerosos progresos en la investigación de ERM, especialmente en la LLA infantil. Coustan-Smith y col (Lancet 1998 ) demostraron en una amplia serie de niños con LLA que la detección de ERM durante la RC se asociaba claramente a una mayor probabilidad de recaída. Más recientemente el grupo Pediátrico Austriaco-Alemán (Dworzak MN, Blood 2002) también demostró que la estratificación según la cuantificación de ERM mediante citometría de flujo era un factor independiente de recaída en niños con LLA. También son numerosos los estudios realizados mediante PCR en la monitorización de ERM en pacientes con LLA. Recientemente Biondi y col ( Biondi A, Leukemia 2000) demostraron que la monitorización de la ERM mediante el análisis de reordenamientos del gen del las Ig y del receptor T durante los tres primeros meses del tratamiento fue útil para identificar aquellos pacientes con alta probabilidad de recaída y por tanto subsidiarios a intensificar el tratamiento.

Paralelamente, se han publicado también estudios sobre el análisis de la ERM mediante citometría de flujo en la LMA. Adriaansen y col (Adriaansen HJ, Leukemia 1993) demostraron que la presencia de células Tdt+ de manera creciente precedía la recaída en pacientes con LMA en RC. En un estudio realizado por Sievers y col (Sievers, J Natl Cancer Inst 1996) en 35 niños con LMA se relacionó la recaída precoz con la presencia de ERM. Más recientemente y en un amplio estudio realizado en 126 adultos con LMA San Miguel y col (San Miguel J, Blood 2001) demostraron que la detección de ERM tras el tratamiento de inducción estratificó a los pacientes en 4 grupos con diferente riesgo de recaída. Según este

estudio el nivel de ERM fue el factor con mayor impacto en la supervivencia seguido de la citogenética y el número de ciclos para alcanzar la RC.

El análisis de la presencia de las diferentes translocaciones descrita en la LMA en pacientes en RC ha sido también objeto de números estudios. Sin embargo, la detección tanto del gen de fusión AML1-ETO como del CBF $\beta$ /MYH-11 en pacientes con largas RC puso en interrogación la utilidad de la PCR como único método para identificar a pacientes con t(8;21) e inv (16) con alta probabilidad de recaída (Nucifora G, Blood 1993). En los últimos años la cuantificación del transcrito mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real ha permitido solventar en parte este inconveniente. Tobal y col (Tobal K, Blood 2002) realizaron un estudio en 25 pacientes con t(8;21) y demostraron que la persistencia de niveles bajos del transcrito era compatible con remisiones completas prolongadas. En cambio, los pacientes que recaían eran aquellos que presentaban niveles superiores del transcrito durante la RC. Recientemente, Buonamici (Blood 2002) demostró en un estudio realizado en 21 pacientes con inv (16), que aquellos con niveles del gen de fusión CBF $\beta$ /MYH-11 superiores a 0,25% durante la RC tenían altas probabilidades de recaída mientras que los que tenían menos del 0,12% permanecían en RC. Estos estudios recientes demuestran que la PCR cuantitativa podría ser útil para estratificar los pacientes según el riesgo de recaída y diferenciar así el tratamiento post- RC.

## **II. JUSTIFICACIÓN**



Las leucemias constituyen el 2,5% de la incidencia global de cáncer y el 3,5% de la mortalidad por tumores malignos. Su etiología todavía se desconoce, en la mayor parte de los casos. En la última década, los avances en la caracterización de los distintos tipos de leucemia aguda, el progreso en el conocimiento de su fisiopatología y la identificación de factores pronósticos, permiten un tratamiento más eficaz, a menudo individualizado. Con todo, la supervivencia global a largo plazo todavía no supera el 30-40%. Por tanto, es necesario avanzar en el conocimiento de la patogenia de esta enfermedad, así como integrar todos los métodos que actualmente disponemos de diagnóstico y seguimiento como la citología, la citometría de flujo, la citogenética y la biología molecular para la correcta definición de entidades clínico-biológicas independientes con pronóstico específico. Esto supondrá una adecuada individualización del tratamiento y por tanto una mejora en la supervivencia de los enfermos con leucemia aguda.

### **III. HIPÓTESIS**



Para profundizar en el conocimiento de las leucemias agudas es necesario integrar datos clínicos con datos biológicos. Los estudios citológicos, citogenéticos, inmunofenotípicos y los de biología molecular son estudios precisos para un adecuado diagnóstico y seguimiento de los pacientes con leucemia aguda.

Las alteraciones moleculares tienen impacto pronóstico en la mayoría de pacientes con leucemia aguda. Actualmente, la detección de lesiones genéticas conocidas, así como el estudio de otras nuevas es imprescindible para la correcta caracterización de las leucemias agudas y para individualizar el tratamiento.

Teniendo en cuenta lo mencionado, la hipótesis de la presente tesis es que el análisis inmunofenotípico exhaustivo de las leucemias agudas permite una mejor caracterización biológica, define subvariedades de leucemia, permite profundizar en la fisiopatología celular y, en ciertos pacientes, es útil para identificar subgrupos con alteraciones moleculares específicas.

#### **IV. OBJETIVOS**



El objetivo global de esta tesis es analizar el valor de la caracterización inmunofenotípica de las leucemia agudas, identificar nuevos marcadores y establecer asociaciones con parámetros clínicos y biológicos; entre estos últimos se hace especial hincapié en la correlación con los subgrupos moleculares.

Los objetivos concretos de la tesis son:

**A) Análisis de la expresión de antígenos:**

Analizar la utilidad de marcadores como el CD66 y la cadena  $\alpha$  de la interleuquina 3 o CD123 en el estudio inmunofenotípico de enfermos con leucemia aguda y en el seguimiento de la ERM.

**B) Asociación con alteraciones moleculares:**

Estudiar las características clínico-biológicas y analizar el inmunofenotipo en las siguientes alteraciones citogenéticas o moleculares con valor pronóstico en la leucemia aguda del adulto:

BCR/ABL en la LLA

AML-1/ETO en la LMA

CBF $\beta$ /MYH-11 en la LMA

reordenamiento del gen MLL en la LMA

duplicación del gen FLT3 en la LMA

## **V. RESULTADOS**



**V.1. TRABAJOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS EN LA CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS**

- **Manuscrito nº 1:** CD66 expression in acute leukemia.
- **Manuscrito nº 2:** Interleukin-3 receptor  $\alpha$  Chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies.

**V.2. TRABAJOS SOBRE PERFIL INMUNOFENOTÍPICO Y OTRAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE LEUCEMIAS AGUDAS CON ALTERACIONES MOLECULARES ESPECÍFICAS**

- **Manuscrito nº 3:** Combined use of reverse transcriptase polymerase chain reaction and flow cytometry to study minimal residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia.
- **Anexos**
- CD56 expression could be associated with monocytic differentiation in acute myeloid leukemia with t(8;21).
- Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells.

- Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with  
FLT3 internal tandem duplication.

**Manuscrito n° 1**

**CD66 expression in acute leukemia.**

**Annals of Hematology 2000; 79: 299-303.**

En la hematopoyesis normal el antígeno CD66 se expresa en células de origen mieloide o mielomonocítico, pero se ha descrito su reactividad en blastos de niños con leucemia linfoblástica de fenotipo B. En este trabajo se analiza la expresión de este antígeno en una serie de adultos con LMA y LLA-B y se correlaciona con la presencia de otros marcadores y lesiones moleculares. Los datos obtenidos muestran una alta frecuencia en la expresión de CD66 en los pacientes con LLA-B, especialmente en aquellos con factores de mal pronóstico: edad avanzada y presencia del gen bcr/abl. Esta expresión aberrante podría ser útil para diferenciar precursores linfoides normales de células blásticas residuales en los enfermos en RC.



**Manuscrito n°2**

**Interleukin-3 receptor  $\alpha$  Chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies.**

**Haematologica 2001; 86: 1261-1269**

Las citoquinas tienen un papel muy importante en la regulación de la hematopoyesis a través de la modulación en la acción de los factores de transcripción sobre los progenitores hematopoyéticos. La interleuquina-3 al igual que otras citoquinas estimula el crecimiento y diferenciación celular e inhibe la apoptosis en las células hematopoyéticas. En este trabajo se muestra que el antígeno CD123 o cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-3 es un buen marcador de célula leucémica tanto mieloide como linfoide B debido a la alta frecuencia de su expresión en los blastos de las LMA y LLA-B mientras que es escasa en los progenitores hematopoyéticos normales. Esto puede ser útil en estudio de la enfermedad residual mínima, así como en una posible aplicación terapéutica basada en la utilización de anticuerpos monoclonales contra este antígeno.



**Manuscrito n°3**

**Combined use of reverse transcriptase polymerase chain reaction and flow cytometry to study minimal residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia.**

**Haematologica 2000; 85: 704-710.**

La citometría de flujo y la PCR son las dos técnicas más utilizadas en la detección de enfermedad residual mínima en la leucemia linfoblástica aguda Filadelfia positiva. Ambas tienen una alta sensibilidad y son reproducibles. Sin embargo, existen algunos problemas y limitaciones técnicas en cada una de ellas. Por ello planteamos una aproximación metodológica combinada, para el estudio de la ERM en la LLA Ph+. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que esta combinación puede evitar los falsos resultados derivados de cada una de las técnicas empleadas por separado.



### **V.2.2. ANEXOS**

En el siguiente apartado se muestran los resultados de tres artículos publicados referentes a los datos de inmunofenotipo de diferentes subgrupos moleculares analizados en esta tesis así como las características clínicas, la respuesta al tratamiento, los datos de citogenética y las curvas de supervivencia, con la finalidad de integrar datos clínicos junto con datos biológicos y de esta manera completar los resultados de los artículos previamente explicados. Así mismo, se adjuntan los estudios inmunofenotípicos completos de todos los pacientes incluidos en el trabajo clasificados según subgrupos moleculares.



**V. 2. 2. 1**

**CD56 expression could be associated with monocytic differentiation in acute myeloid leukemia with t(8;21).**

**Haematologica 2001; 86: 763-746**

El antígeno CD56 se expresa frecuentemente en la leucemia mieloide aguda con t(8;21) y se asocia a diferenciación monocítica. La combinación de CD56 junto con antígenos de inmadurez y antígenos mieloides puede ser útil en la detección de enfermedad residual mínima en este subtipo de leucemia.



### Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con AML1-ETO.

Se estudiaron 264 pacientes diagnosticados de LMA incluidos consecutivamente en el protocolo LMA-99 del grupo CETLAM. La frecuencia de la lesión molecular AML-1/ETO fue del 7% lo que coincide con los datos publicados en otras series (Fenaux P, Br J Haematol 1989).

Se analizaron las características clínicas de estos pacientes y se compararon con el resto de la serie. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

#### *Características clínicas de los enfermos con AML-1/ETO*

|   | Enfermos con AML-1/ETO | Resto de los enfermos | <i>P</i> |
|---|------------------------|-----------------------|----------|
| <b>Edad, media (extremos)</b>                         | 38 (16-57)             | 43 (16-60)            | 0,05     |
| <b>Sexo (%)</b>                                       |                        |                       |          |
| <i>Hombres</i>  | 13 (68)                | 130 (55)              | ns       |
| <i>Mujeres</i>  | 6 (32)                 | 110 (45)              | ns       |
| <b>Cifra de leucocitos al dx, media (extremos)</b>    | 23 (4-86)              | 51 (0,8-360)          | 0,08     |
| <b>Cifra de blastos en MO al dx, media (extremos)</b> | 49 (20-86)             | 68 (20-100)           | 0,001    |
| <b>Respuesta al ttº de inducción</b>                  |                        |                       |          |
| <i>RC</i>   | 19 (100)               | 176 (72)              | 0,04     |
| <i>Resistencia</i>                                    | 0                      | 40 (16)               |          |
| <i>Muerte por toxicidad</i>                           | 0                      | 27 (11)               |          |
| <i>Pendiente</i>                                      | 0                      | 2 (1)                 |          |
| <b>Supervivencia(%)</b>                               |                        |                       | 0,01     |
| <i>SG</i>   | 67±15%                 | 34± 4%                |          |
| <i>SLE</i>  | 60± 14%                | 39± 4%                | 0,1      |
| <i>REC</i>  | 40 ± 14%               | 54± 4%                | 0,2      |

Dx: diagnóstico; MO: médula ósea; RC: remisión completa; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de evento; REC: probabilidad de recaída ; ns: no significativo.

Según estos resultados los pacientes con AML-1/ETO eran significativamente más jóvenes, tenían menor infiltración de blastos en médula ósea y obtenían un mayor porcentaje de remisiones completas con el tratamiento quimioterápico. Presentaban además una supervivencia global mayor que los enfermos sin la anomalía molecular utilizando como intensificación en estos pacientes dosis altas de ARA-C y no trasplante de progenitores hematopoyéticos.

A continuación se muestran los datos biológicos de los pacientes con AML-1/ETO, así como el inmunofenotipo de cada paciente analizado al diagnóstico y las curvas de supervivencia.

### ***Características biológicas de los pacientes con AML-1/ETO***

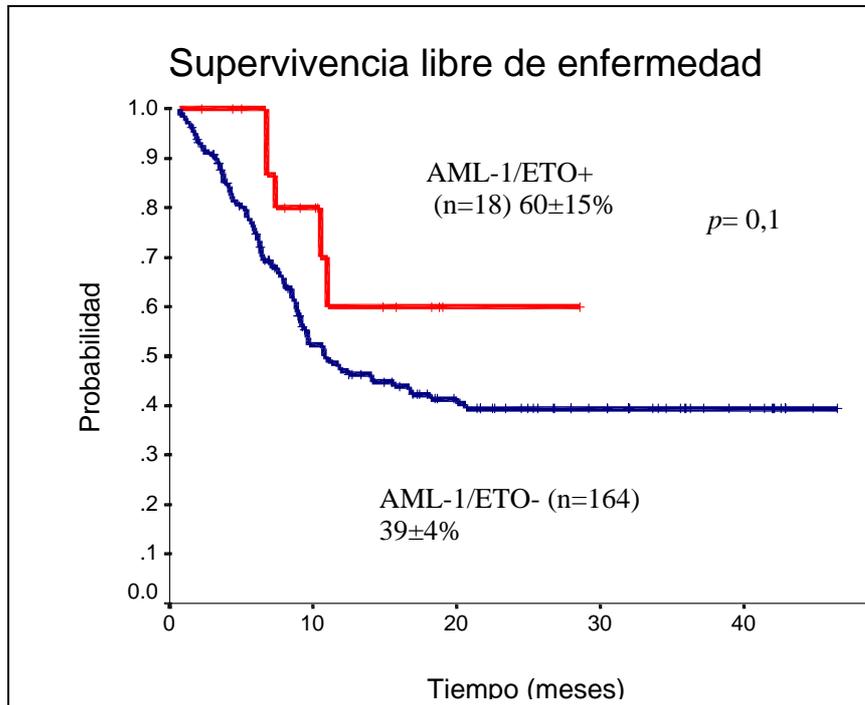
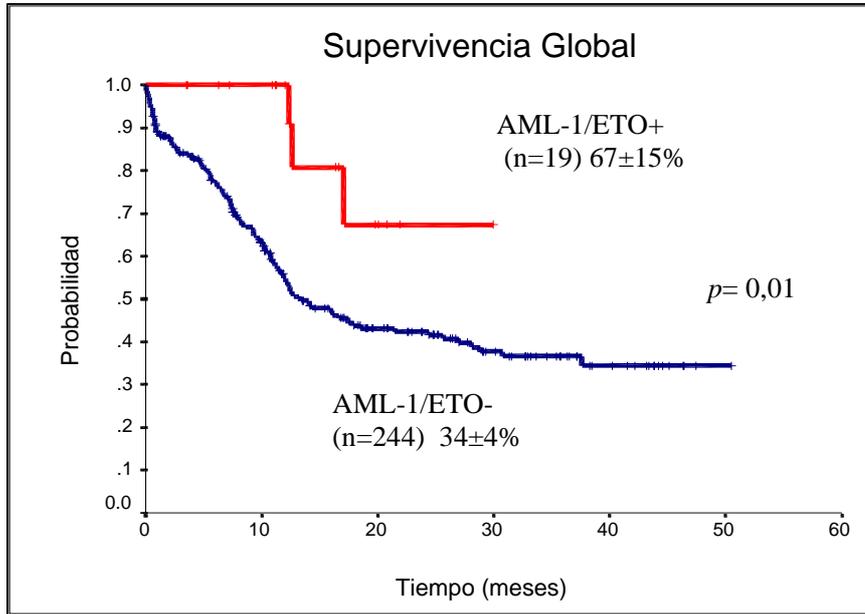
|    | <b>FAB</b> | <b>Cariotipo</b>   | <b>AML-1/ETO</b> | <b>Reordenamiento<br/>MLL</b> | <b>FLT3<br/>duplicado</b> |
|----|------------|--|------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 1  | M2         | 46,XY, t(8;21) (q22;q22)   | +                | -                             | -                         |
| 2  | M2         | No realizada   | +                | -                             | -                         |
| 3  | M1         | 46,XY, t(1;3)(q21;q27),<br>t(8;21) (q22;q22)                       | +                | -                             | -                         |
| 4  | M2         | 46,XY, t(8;21) (q22;q22)   | +                | -                             | -                         |
| 5  | M2         | 45,X, t(8;21) (q22;q22),-X   | +                | -                             | -                         |
| 6  | M2         | 46,XX, t(8;21) (q22;q22)   | +                | -                             | -                         |
| 7  | M2         | 46,XY, t(8;21) (q22;q22)   | +                | -                             | -                         |
| 8  | M2         | 45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y   | +                | -                             | -                         |
| 9  | M1         | 46, XY/ 45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y                                 | +                | -                             | -                         |
| 10 | M2         | 48,XX, t(8;21)(q22;q22),<br>del(11)(q21q23),+15,+21                | +                | -                             | -                         |
| 11 | M1         | 46,XY, t(8;21)(q22;q22),<br>45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y             | +                | -                             | -                         |
| 12 | M2         | 46, XY/ 45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y                                 | +                | -                             | -                         |
| 13 | M2         | 46,XX, t(8;21) (q22;q22)   | +                | -                             | -                         |
| 14 | M2         | 46, XX/45,X, t(8;21) (q22;q22),-X                                  | +                | -                             | -                         |
| 15 | M2         | 46; XY/46,XY, t(8;21)(q22;q22),9q-                                 | +                | -                             | -                         |
| 16 | M2         | 45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y/<br>45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y, del (7) | +                | -                             | -                         |
| 17 | M2         | 45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y   | +                | -                             | -                         |
| 18 | M2         | 46, XY/ 45,X, t(8;21) (q22;q22),-Y                                 | +                | -                             | -                         |
| 19 | M2         | 46,XX, t(8;21) (q22;q22)   | +                | -                             | -                         |

**Immunofenotipo de los pacientes con AML-1/ETO**

|    | 34 | 15 | HLA-DR | 10 | 20 | 19 | 33 | 2 | 13 | 3 | 117 | 45 | CD |    |    |   | 64 | G | 36 | 11 | 41 | 123 | 4 | 14  | MPO | 79A | 3   | Tdt |
|----|----|----|--------|----|----|----|----|---|----|---|-----|----|----|----|----|---|----|---|----|----|----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |    |    |        |    |    |    |    |   |    |   |     |    | 7  | 56 | 66 | A | B  |   |    |    |    |     |   | Cit | Cit | Cit | Nuc |     |
| 1  | +  | -  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | -  | -  | -  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 2  | +  | +  | +      | -  | -  | -  | +D | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 3  | +F | -  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | +  | -  | + | -  | - | -  | -  | -  | +D  | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 4  | +F | +  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 5  | +F | -  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | +  | -  | + | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 6  | +F | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 7  | +F | +  | +      | -  | -  | +  | -  | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | +   |
| 8  | +F | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | +  | -  | + | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 9  | +F | +  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 10 | +F | +  | +      | -  | -  | +D | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | + | -  | - | -  | -  | +  | -   | + | +   | -   | -   | -   |     |
| 11 | +F | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | +  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | +   |
| 12 | +F | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | +  | -  | + | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 13 | +F | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | +   |
| 14 | +F | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | + | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 15 | +F | +  | +      | -  | -  | +  | +D | - | +  | - | +   | +  | -  | +  | -  | - | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |
| 16 | +F | -  | +      | -  | -  | -  | +D | - | +  | - | +   | +  | -  | -  | -  | + | -  | - | -  | -  | -  | +   | - | -   | +   | -   | -   | -   |

GA: Glicoforina A; Cit: citoplasma; Nuc: nuclear; F: Fuerte; D: débil,

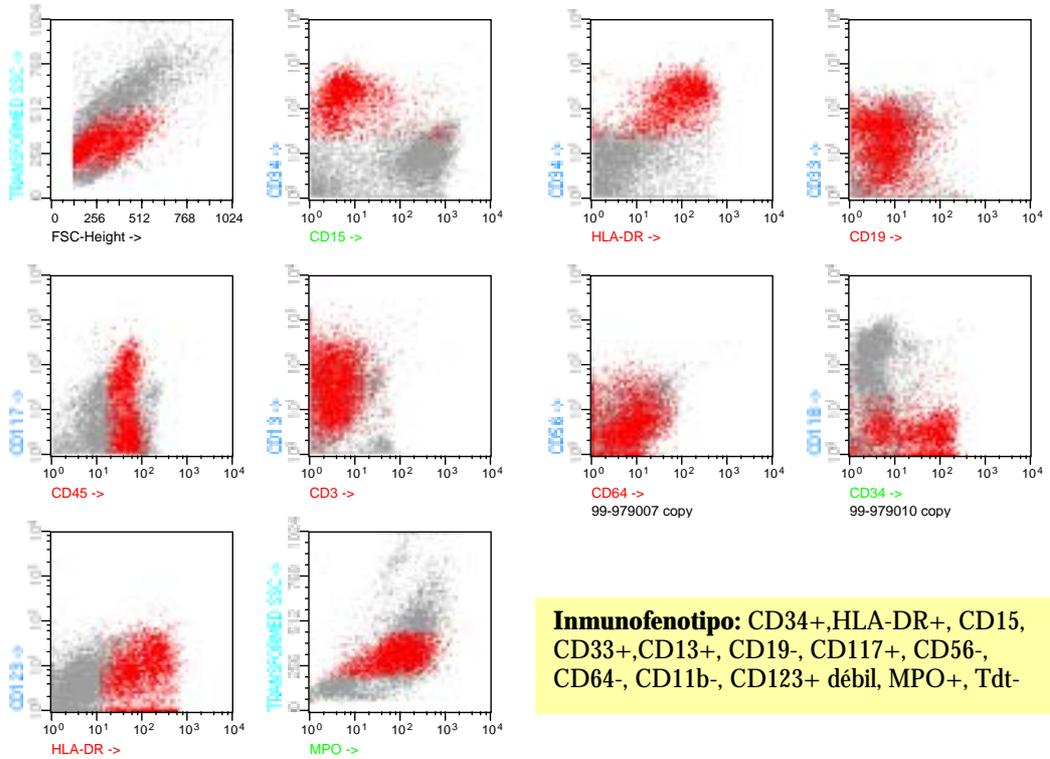
Todos los casos presentaban una o varias poblaciones blásticas mieloides inmaduras CD34+ fuerte, MPO, CD117, HLA-DR, CD13, CD123 (100%) , CD33 (94%) , CD15 (75%) con expresión de Tdt en 3 casos. Las células blásticas de estos pacientes con frecuencia coexpresaron antígenos de diferenciación monocítica tales como el CD64 (50%), CD56 (37%), CD19 (37%) y CD14 (6%). En ningún caso se detectó expresión de antígenos linfoides.



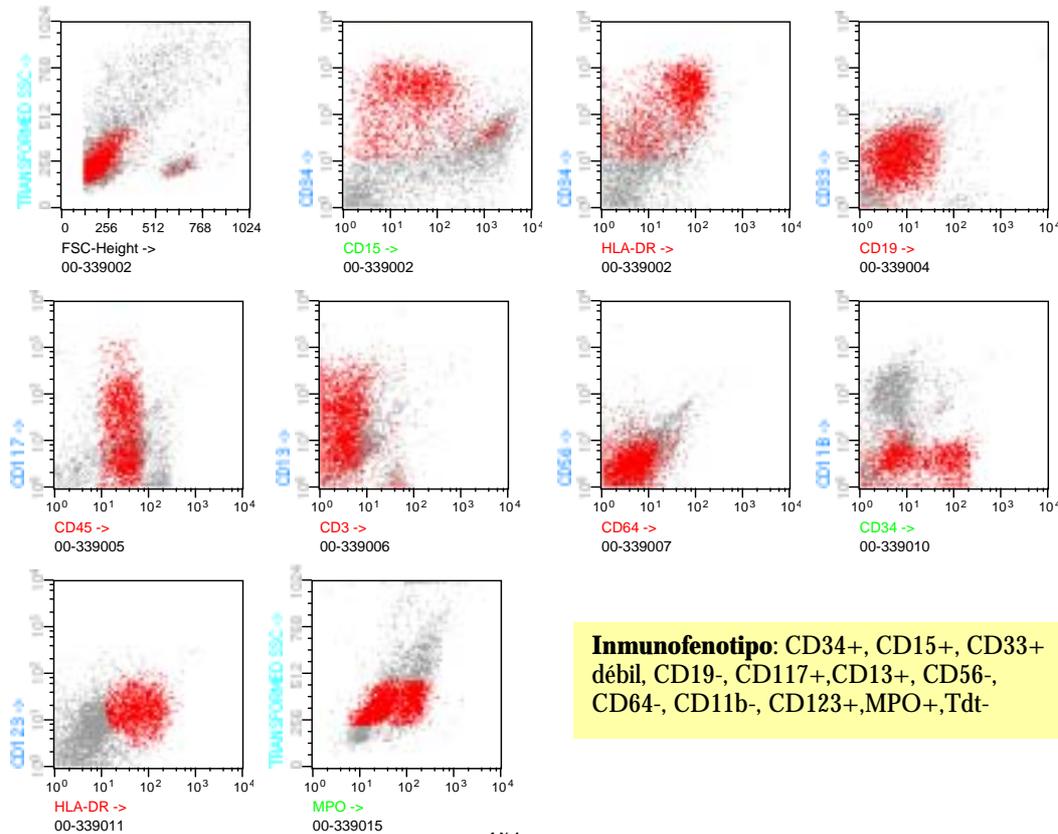
**ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LOS PACIENTES CON LMA Y  
PRESENCIA DE AML-1/ETO**



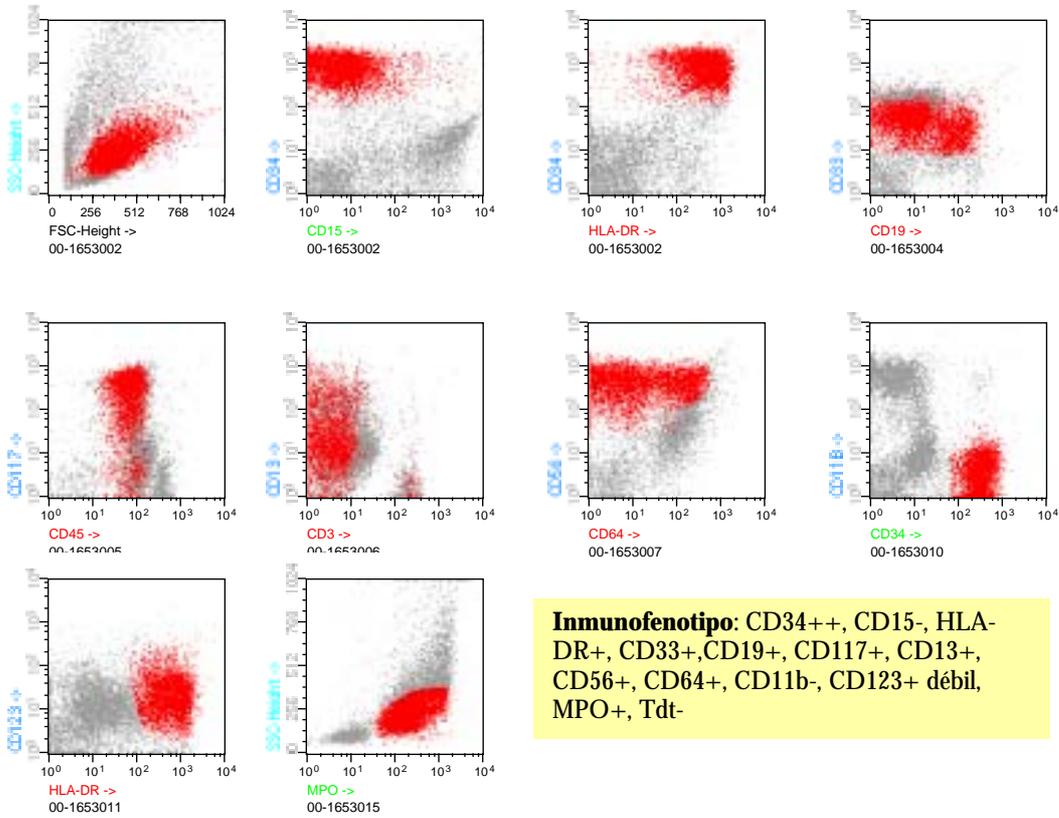
**Caso 43**



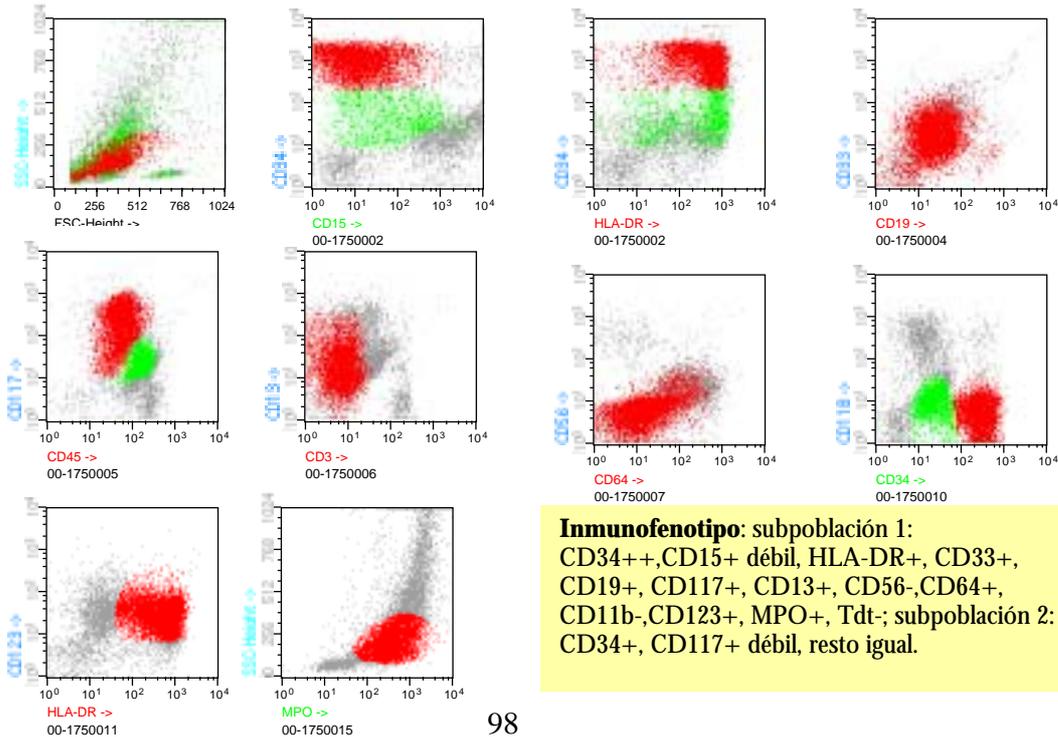
**Caso 74**



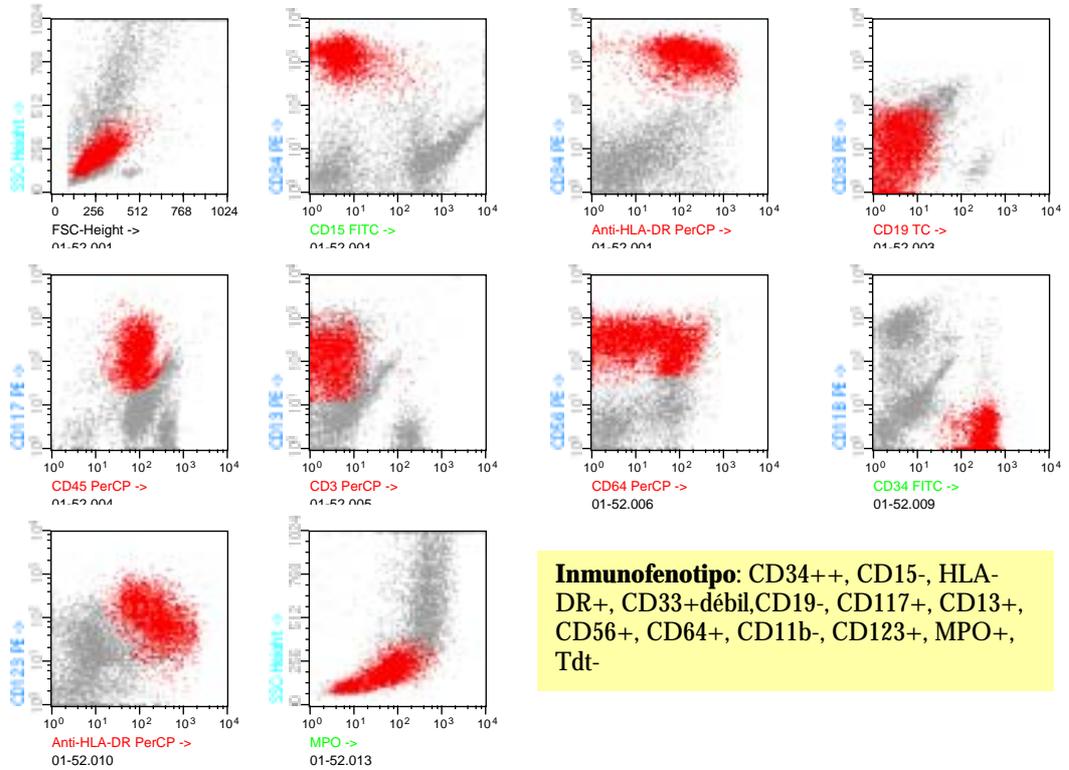
### Caso 134



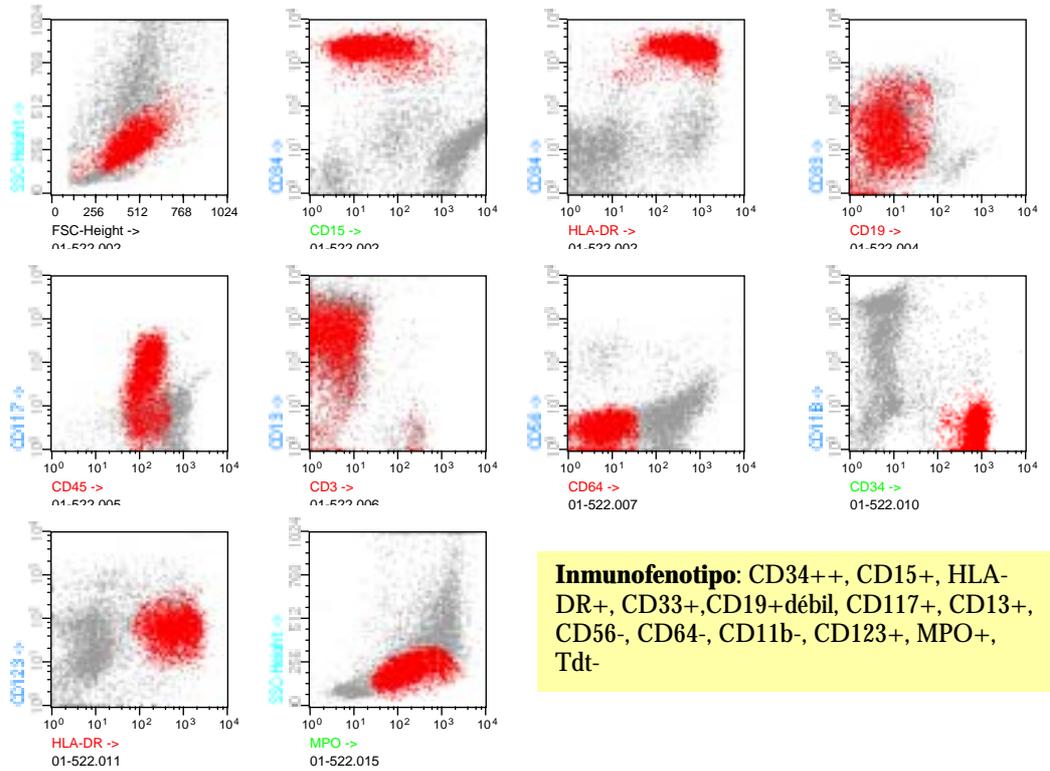
### Caso 138



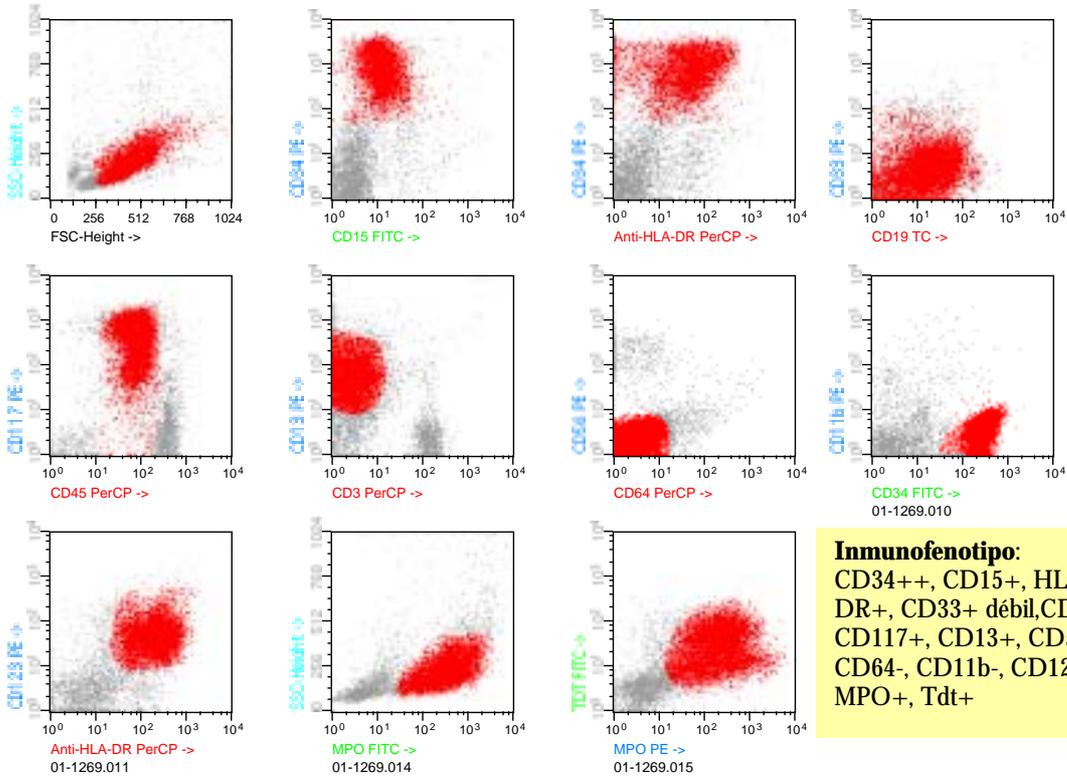
**Caso 140**



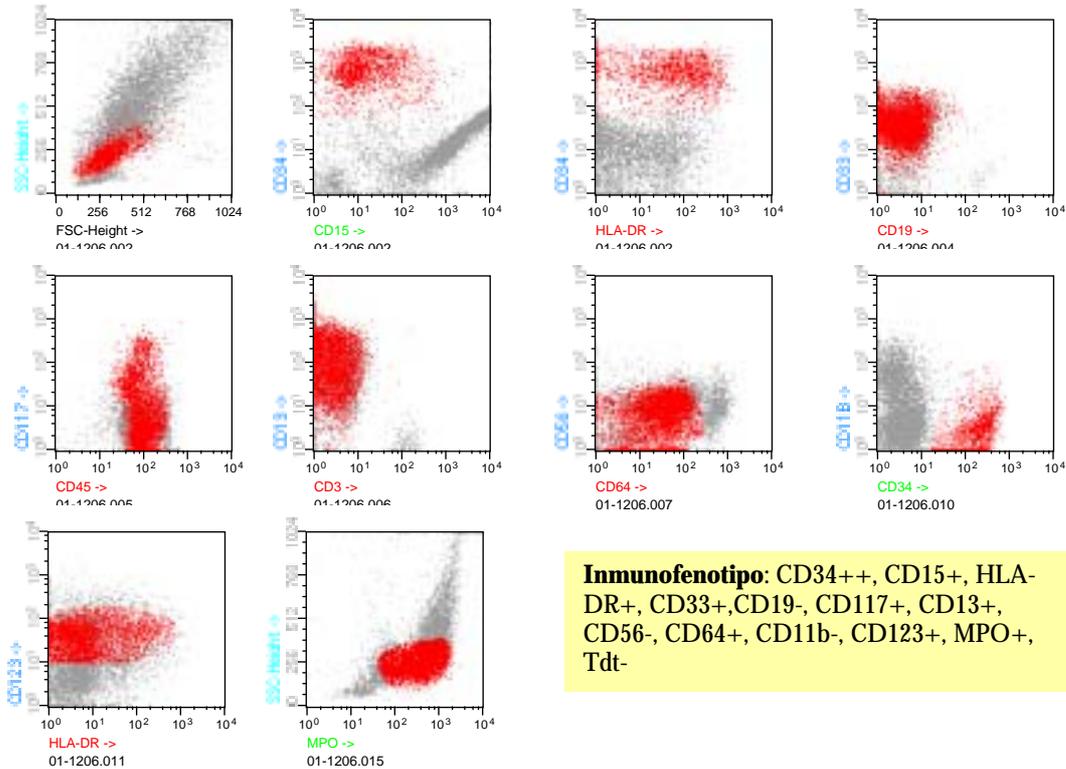
**Caso 165**



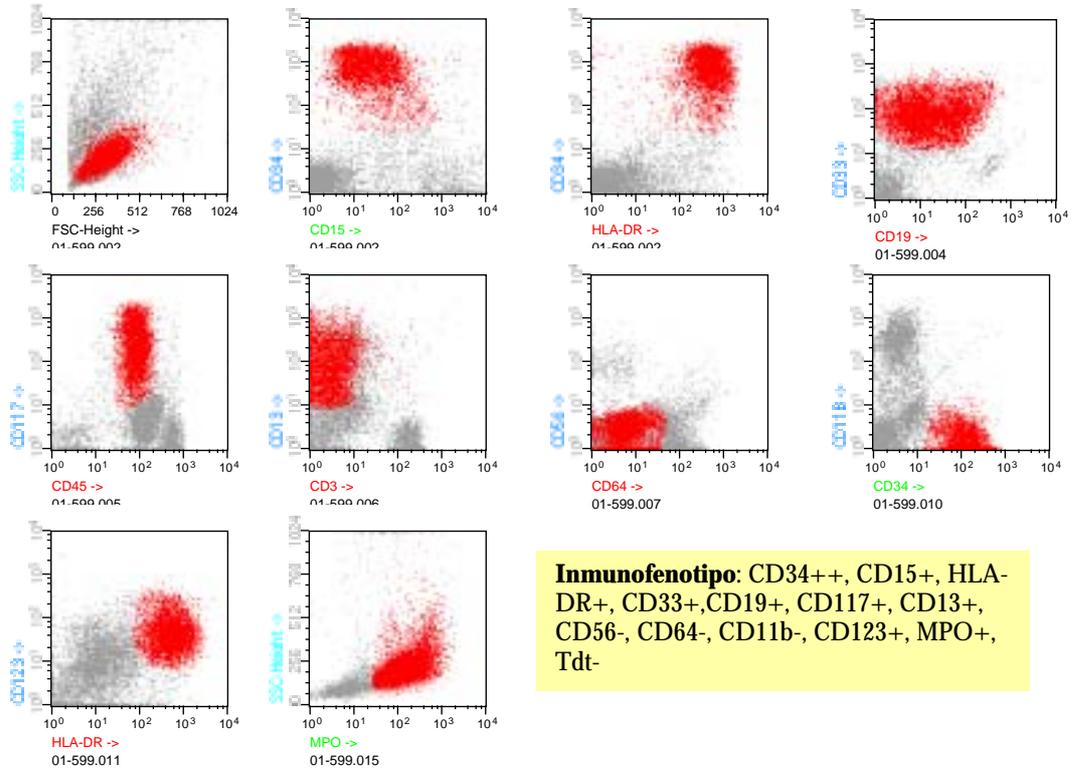
## Caso 197



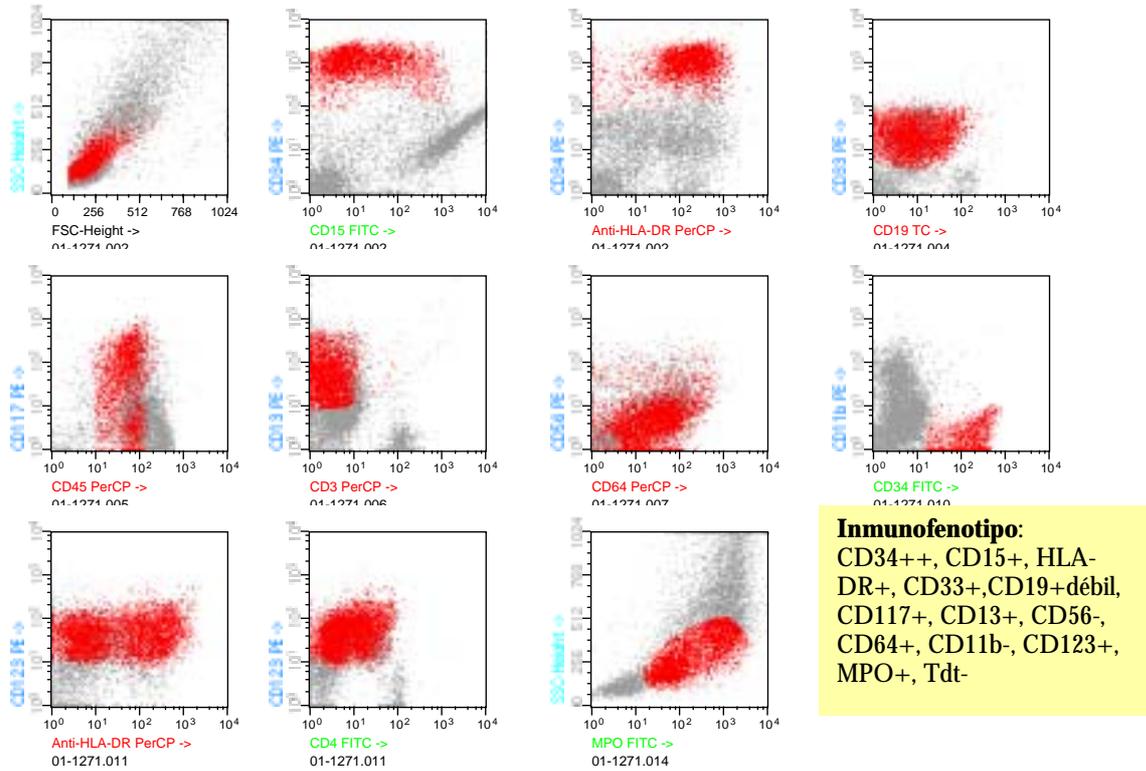
## Caso 194



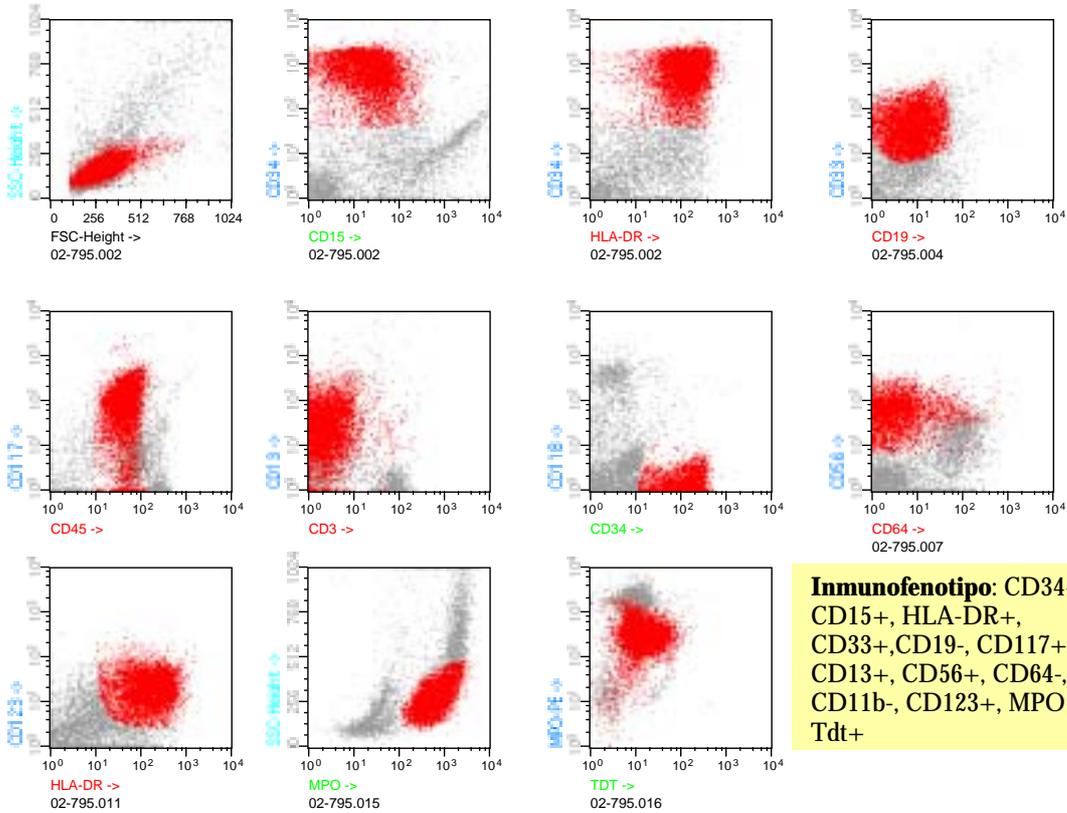
**Caso 173**



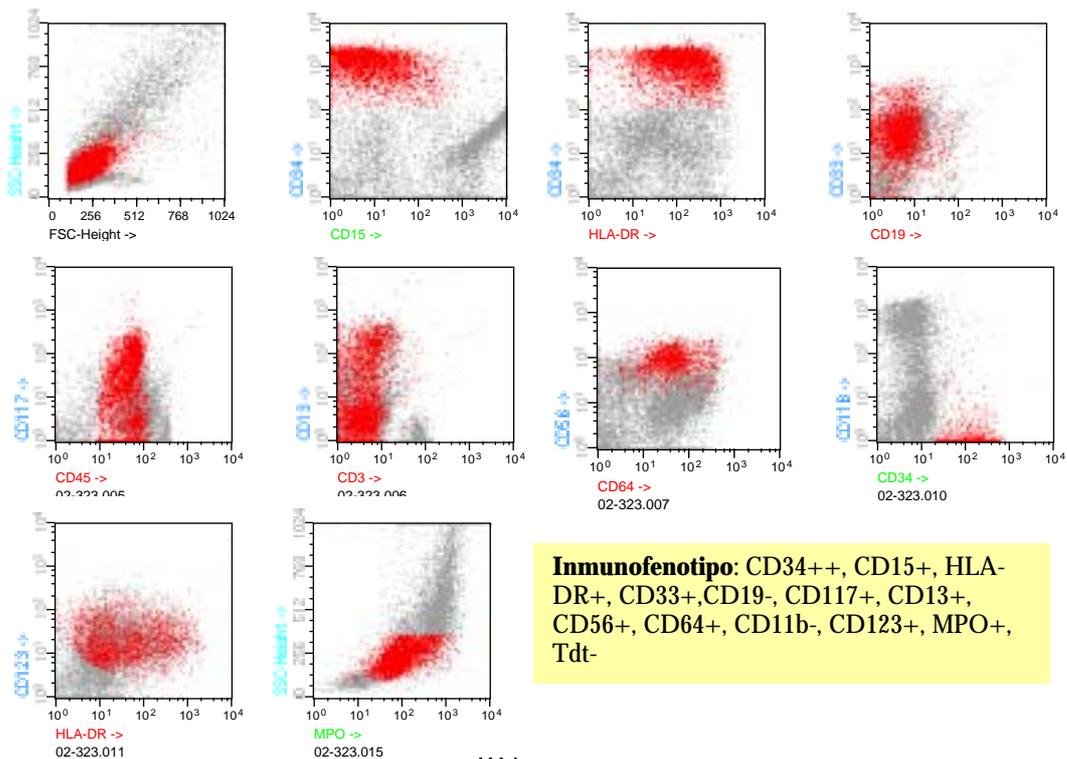
**Caso 198**



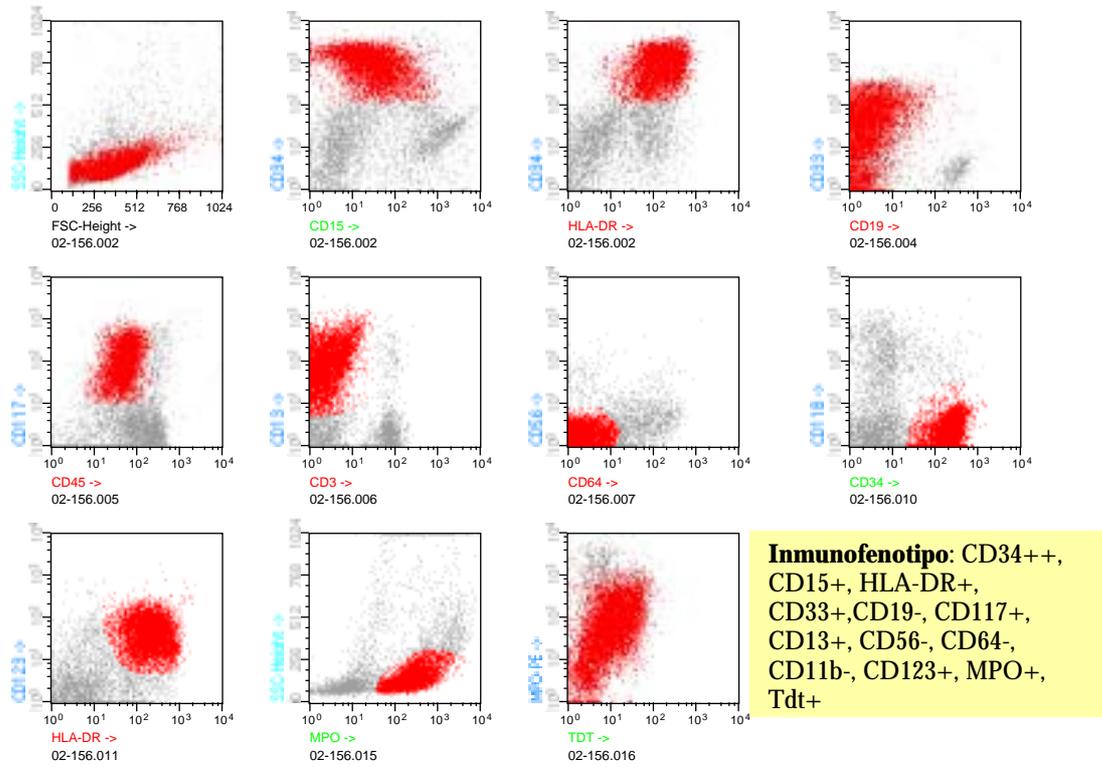
## Caso 256



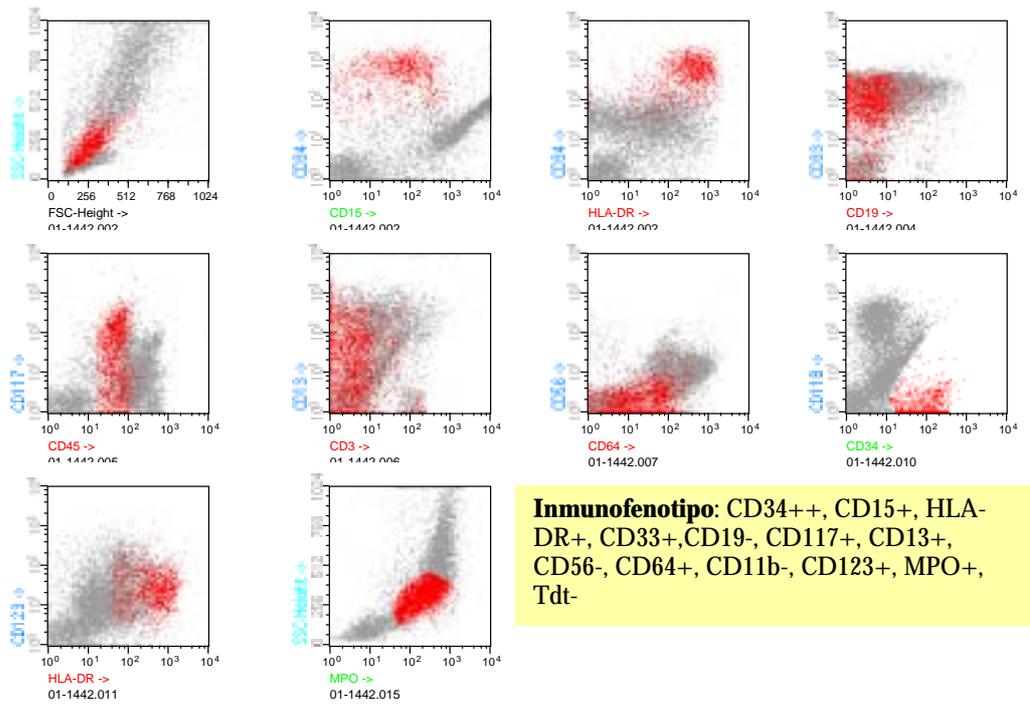
## Caso 240



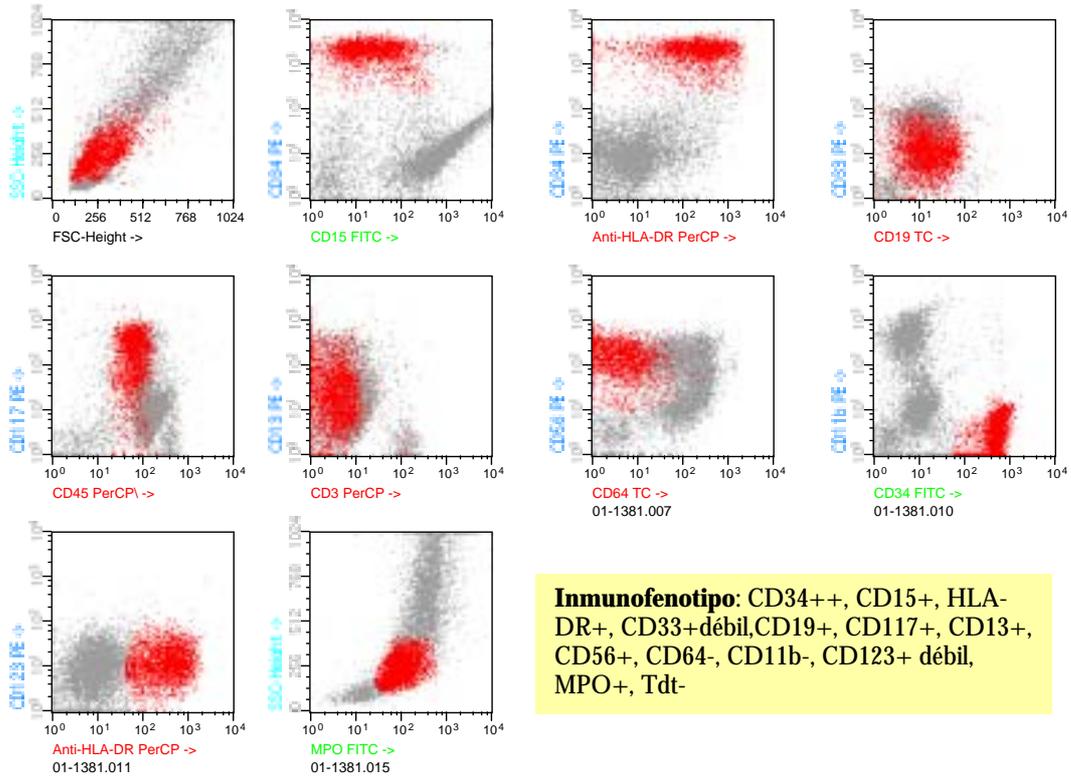
**Caso 236**



**Caso 206**



## Caso 202



### V.2.2.2 Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11.

En el mismo grupo de pacientes que en el apartado anterior se analizaron los casos con presencia de CBF $\beta$ /MYH-11. La frecuencia encontrada fue del 8,3%. Las características clínicas con respecto al resto de la serie se resumen en la siguiente tabla:

|   | Enfermos con CBF $\beta$ /MYH-11 | Resto de los enfermos | <i>P</i> |
|---|----------------------------------|-----------------------|----------|
| <b>Edad, media (extremos)</b>                         | 42 (18-54)                       | 43 (16-60)            | ns       |
| <b>Sexo (%)</b>                                       |                                  |                       |          |
| <i>Hombres</i>  | 13 (59)                          | 135 (56)              | ns       |
| <i>Mujeres</i>  | 9 (41)                           | 107 (44)              | ns       |
| <b>Cifra de leucocitos al dx, media (extremos)</b>    | 41 (2,3-150)                     | 49 (0,8-360)          | ns       |
| <b>Cifra de blastos en MO al dx, media (extremos)</b> | 62 (20-97)                       | 67 (20-100)           | ns       |
| <b>Respuesta al ttº de inducción</b>                  |                                  |                       |          |
| <i>RC</i>   | 17 (77,3)                        | 178 (73,5)            | ns       |
| <i>Resistencia</i>                                    | 1 (4,5)                          | 39 (16)               |          |
| <i>Muerte por toxicidad</i>                           | 4 (18,2)                         | 23 (9,5)              |          |
| <i>Pendiente</i>                                      | 0                                | 2 (1)                 |          |
| <b>Supervivencia</b>                                  |                                  |                       |          |
| <i>SG</i>   | 56 $\pm$ 12%                     | 34 $\pm$ 4%           | ns       |
| <i>SLE</i>  | 53 $\pm$ 13%                     | 40 $\pm$ 4%           | ns       |
| <i>REC</i>  | 37 $\pm$ 13%                     | 55 $\pm$ 4%           | ns       |

Dx: diagnóstico; MO: médula ósea; RC: remisión completa; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de evento; REC: recaída ; ns: no significativo.

A la luz de estos resultados los pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11 no mostraron diferencias en cuanto a la edad, sexo, cifra de leucocitos, porcentaje de blastos en médula ósea ni respuesta al tratamiento quimioterápico de inducción. Si presentaron una mayor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad y menor probabilidad de recaída siendo intensificados al igual que los pacientes con AML-1/ETO únicamente dosis altas de ARA-C, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Realizamos un análisis de la supervivencia en este subgrupo de pacientes según dos de los factores pronósticos publicados previamente en la literatura: la hiperleucocitosis ( $>100 \times 10^9/L$ ) y la edad ( $>50$  años). En nuestra serie, únicamente tres pacientes presentaron al diagnóstico una cifra de leucocitos  $>100 \times 10^9/L$  y no detectamos diferencias en cuanto a la supervivencia global y la probabilidad de recaída en ambos grupos. Si que encontramos diferencias significativamente estadísticas al realizar el análisis según la edad. Los pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11 mayores de 50 años presentaron menor supervivencia global y mayor probabilidad de recaída.

A continuación se especifican las características biológicas de estos pacientes, así como las curvas de supervivencia.

**Características biológicas de los pacientes con CBFβ/MYH-11**

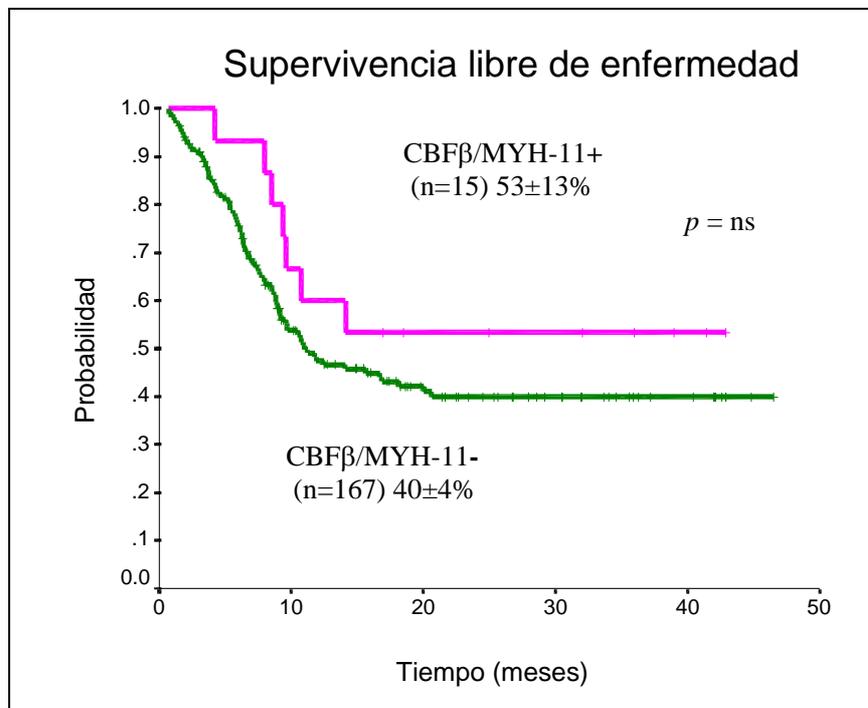
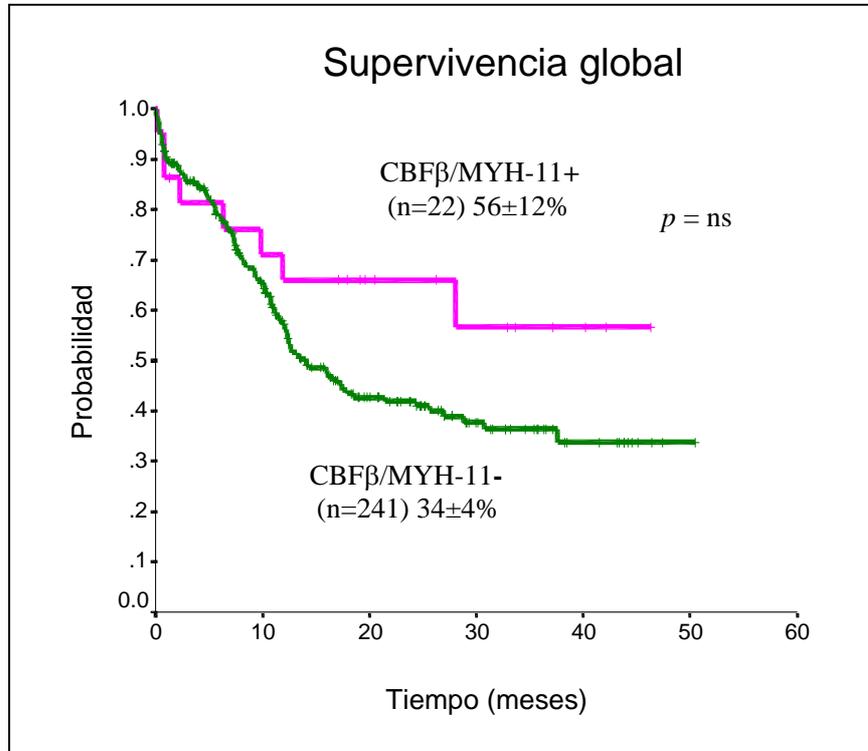
|    | FAB  | Cariotipo                                   | CBFβ/MYH-11 | Reordenamiento MLL | FLT3 duplicado |
|----|------|---|-------------|--------------------|----------------|
| 1  | M4   | 46,XX/ 46,XX,inv (16) (p13;q22)             | +           | -                  | -              |
| 2  | M4Eo | 46,XX,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 3  | M5a  | 48,XY,+8,+22                                | +           | -                  | -              |
| 4  | M5a  | 46,XX,inv (16) (p13;q22),9q-                | +           | -                  | -              |
| 5  | M4Eo | 46,XY, t(4;16) (q35;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 6  | M4Eo | 46,XX,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 7  | M2   | 46,XY,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 8  | M4   | 46,XX,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 9  | M4Eo | 46,XY, inv (16) (p13;q22)/46,XY             | +           | -                  | -              |
| 10 | M2   | 46,XY, inv (16) (p13;q22)/46,XY             | +           | -                  | -              |
| 11 | M4   | 46,XY, inv (16) (p13;q22)/46,XY             | +           | -                  | +              |
| 12 | M4Eo | 46,XY,t(16;16) (q35;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 13 | M2   | 46,XX,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 14 | M5   | 46,XY, inv (16) (p13;q22)                   | +           | -                  | -              |
| 15 | M4Eo | 46, XY, t(5;12) (p14;p11)                   | +           | -                  | -              |
| 16 | M4Eo | 46,XX, del (7)(q32), inv (16) (13;q22), +22 | +           | -                  | -              |
| 17 | M4   | 46,XY, inv (16) (p13;q22),+22               | +           | -                  | -              |
| 18 | M4Eo | 46,XX,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 19 | M4Eo | 46,XY, inv (16) (p13;q22)                   | +           | -                  | -              |
| 20 | M4   | 46,XY, inv (16) (p13;q22)                   | +           | -                  | +              |
| 21 | M2   | 46,XX,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |
| 22 | M4Eo | 46,XX,inv (16) (p13;q22)                    | +           | -                  | -              |

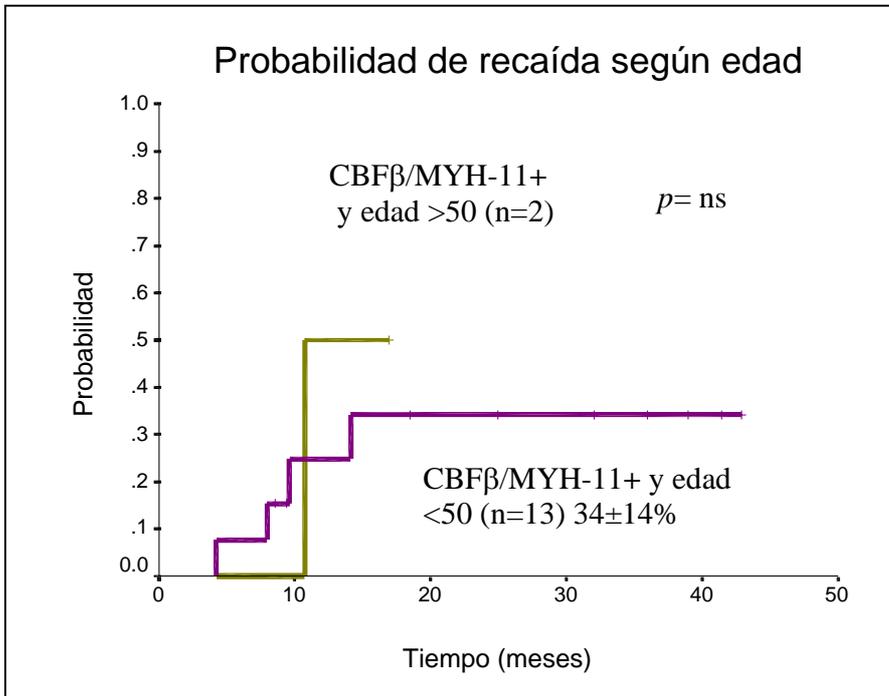
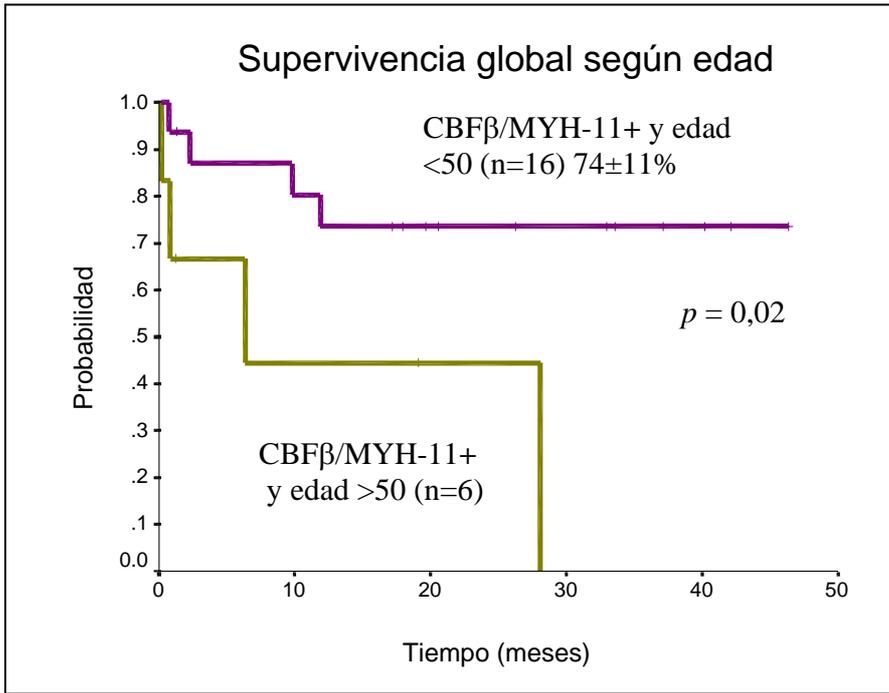
**Inmunofenotipo de los pacientes con CBFβ/MYH-11**

|    | CD |    |            |    |    |    |    |    |    |   |     |    |   |    |    |    |    |    |     |    | MPO<br>cit | 79a<br>cit | 3<br>cit | Tdt<br>Nuc |     |   |    |
|----|----|----|------------|----|----|----|----|----|----|---|-----|----|---|----|----|----|----|----|-----|----|------------|------------|----------|------------|-----|---|----|
|    | 34 | 15 | HLA-<br>DR | 10 | 20 | 19 | 33 | 2  | 13 | 3 | 117 | 45 | 7 | 56 | 66 | 64 | GA | 36 | 11B | 41 |            |            |          |            | 123 | 4 | 14 |
| 1  | +F | +  | +          | -  | -  | +D | +  | +  | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 2  | +F | -  | +          | -  | -  | -  | -  | +S | ++ | - | -   | +  | - | -  | -  | +S | -  | +S | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 3  | +F | +  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | ++ | - | -   | +  | - | -  | -  | +S | -  | +  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 4  | +  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | +D | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +S | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 5  | +F | +  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +D | -  | +D | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 6  | +  | +  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +S | -  | +S | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 7  | +  | -  | +          | -  | -  | -  | +  | -  | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 8  | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +D | -  | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +S | -  | +S | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 9  | +F | +  | +          | -  | -  | +D | +  | +D | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 10 | +F | +  | +          | -  | -  | -  | +  | +S | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 11 | +F | +  | +          | -  | -  | -  | +D | -  | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +D | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 12 | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | -  | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +S | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 13 | +F | +  | +          | -  | -  | -  | +  | +  | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +S | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 14 | +F | +  | +          | -  | -  | +  | +D | -  | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 15 | +F | +  | +          | -  | -  | -  | +  | +S | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +S | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |
| 16 | +F | +  | +          | -  | -  | +D | +  | +D | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +S         | +   | - | -  |
| 17 | +F | +  | +          | -  | -  | -  | +  | +  | ++ | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +S         | +   | - | -  |
| 18 | +F | +  | +          | -  | -  | +D | +  | +  | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | +          | -          | -        | +          | -   | - | -  |

GA: Glicoforina A; cit: citoplasma; F: Fuerte; D: débil; Nuc: nuclear, S: Subpoblación

Todos los casos excepto 2 mostraron varias poblaciones celulares con fenotipo mielomonocítico con diferente grado de maduración. Todos los casos presentaban una o varias poblaciones blásticas inmaduras CD34, HLA-DR, CD13 fuerte, CD123, MPO (100%) con frecuente expresión de antígenos mieloides: CD117 (89%), CD15 (83%), CD33 (83%). Es interesante que en todos los casos la expresión de CD13 fue superior a la de CD33. La coexpresión en estas poblaciones más inmaduras de antígenos monocíticos o bien la presencia de otra población monocítica más madura fue un hecho muy frecuente. En 14 casos detectamos expresión de antígenos de diferenciación monocítica, el más frecuente el CD64 que se expresó en 17 casos, aunque en 5 de ellos fue en una subpoblación, el antígeno CD36 fue positivo en 8 casos, la mitad de ellos en subpoblaciones minoritarias, y el antígeno CD14 solo fue positivo en 3 casos, también en todos ellos en subpoblaciones. El antígeno CD56 fue negativo en todos los casos. En cuanto a la expresión de antígenos linfoides la frecuencia observada fue variable. El CD19 se detectó en 7 todos ellos con diferenciación monocítica. El antígeno CD2 fue positivo en 7 casos (38%), aunque con expresión variable: en 3 casos fue débil y en otros 3 sólo se expresó en subpoblaciones minoritarias, mientras que el CD7 no se detectó en ningún caso. Otro dato interesante es la detección de un porcentaje elevado de eosinófilos en la mayoría de estos pacientes analizados mediante patrón de FSC/SSC y autofluorescencia. La mediana de eosinófilos fue del 10,3 %, y se detectaron cifras superiores al 10% en 8 casos.

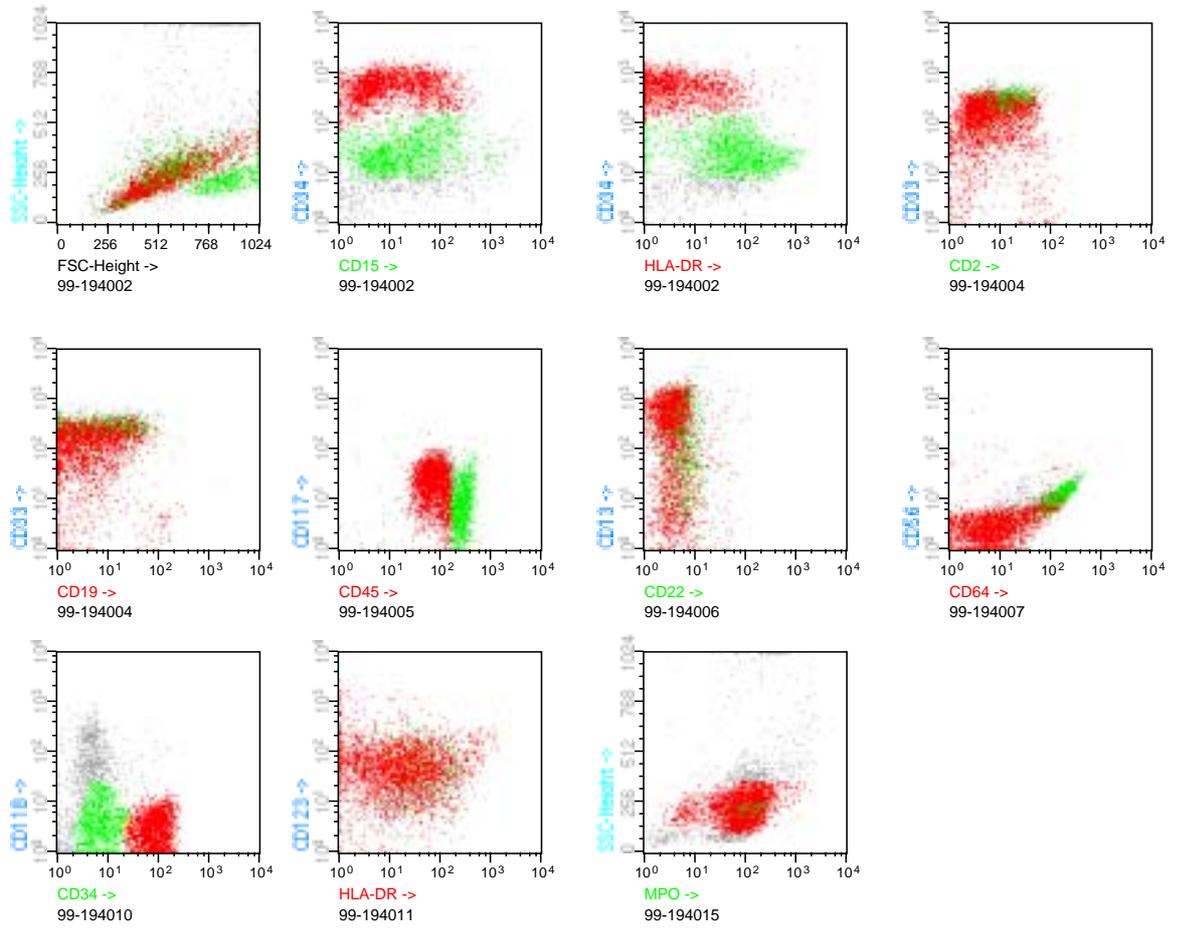




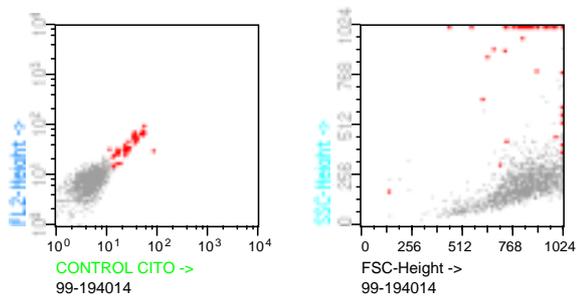
**ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LOS PACIENTES CON LMA Y  
PRESENCIA DE CBF $\beta$ /MYH-11**



**Caso 12**

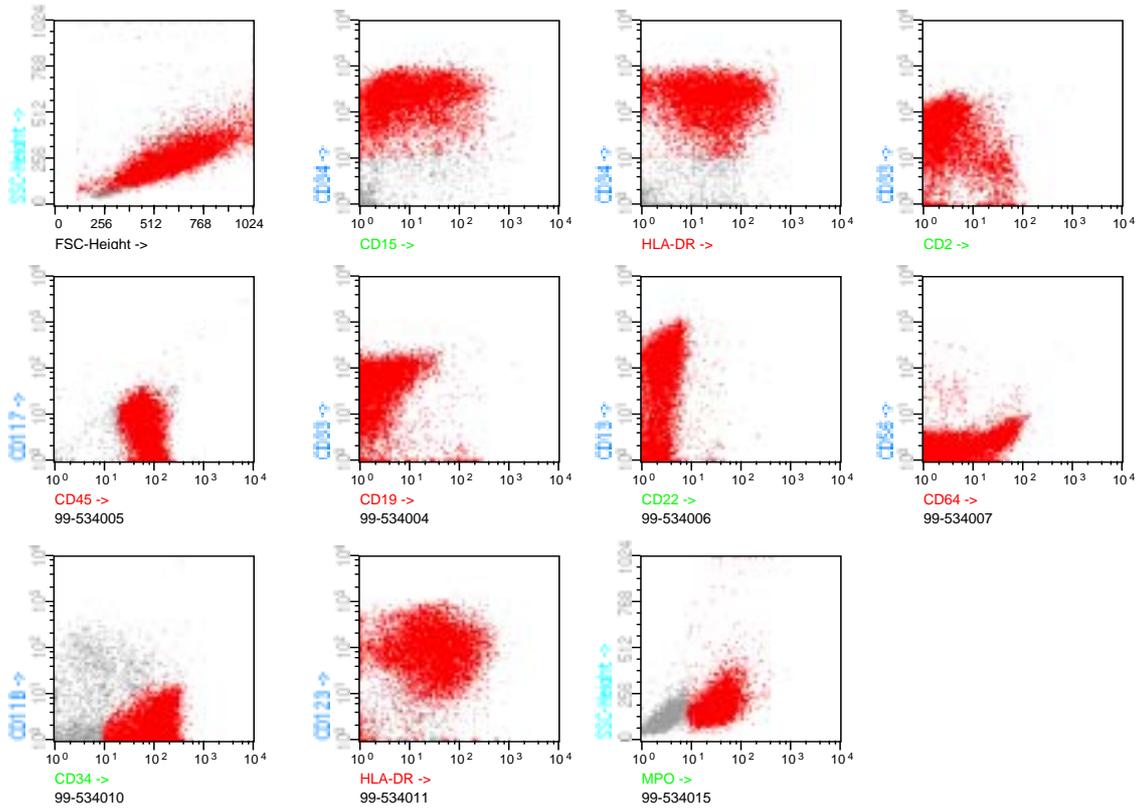


**2% Eosinófilos**

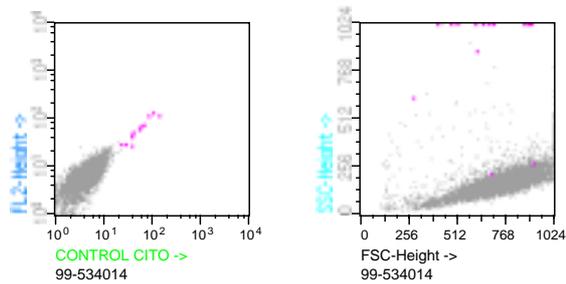


**Inmunofenotipo:** subpoblación 1 (rojo): CD34++, CD15+, HLA-DR+, CD33+, CD2+, CD19 + débil, CD117 +, CD13++, CD64+, CD56-, CD11b -, CD123+, MPO+, Tdt-. Subpobalció 2 (verde): CD34+, HLA-DR++, CD117-, resto igual.

## Caso 16

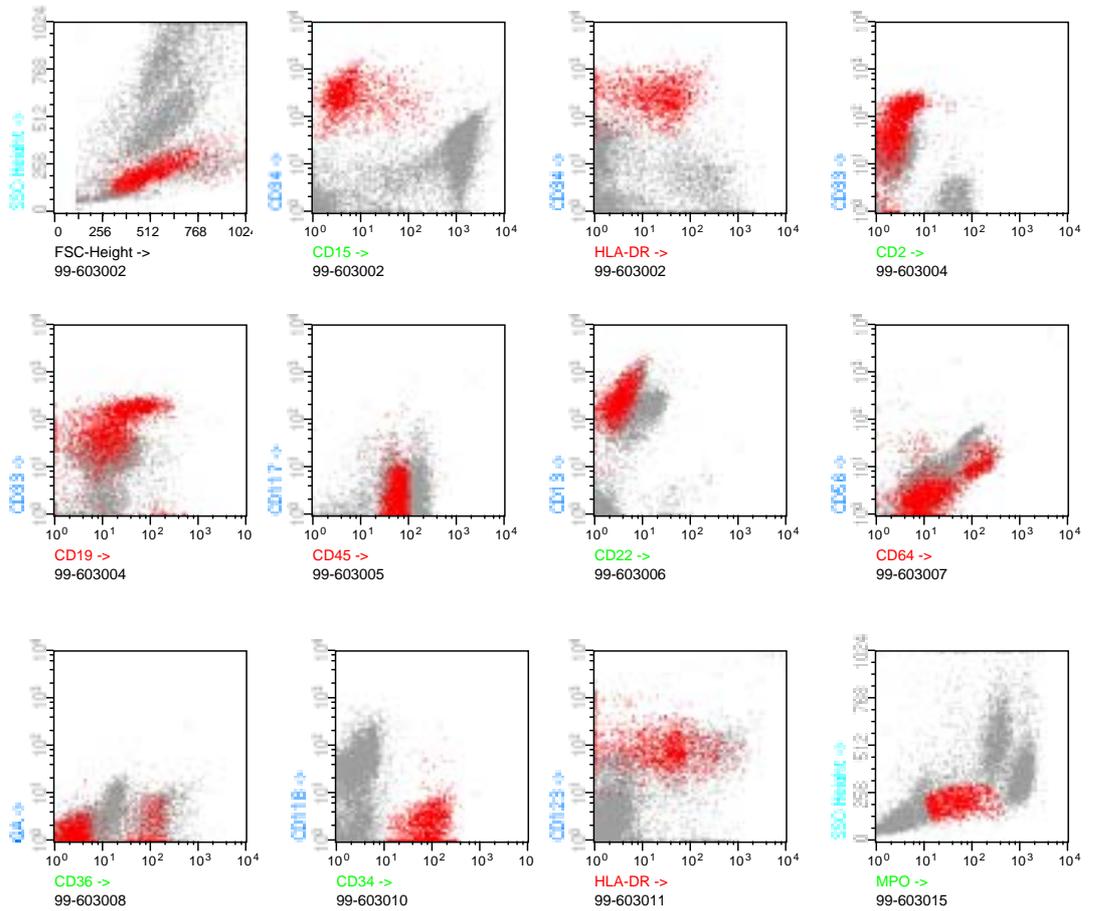


### 0,2% Eosinófilos

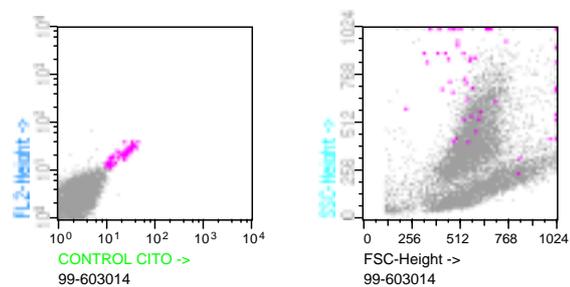


**Inmunofenotipo:** CD34+, CD15+ HLA-DR+, CD33+, CD2+(subpoblación), CD117-, CD33+, CD13+, CD64+, CD56-, CD11b-, CD123+, MPO+

**Caso 20**

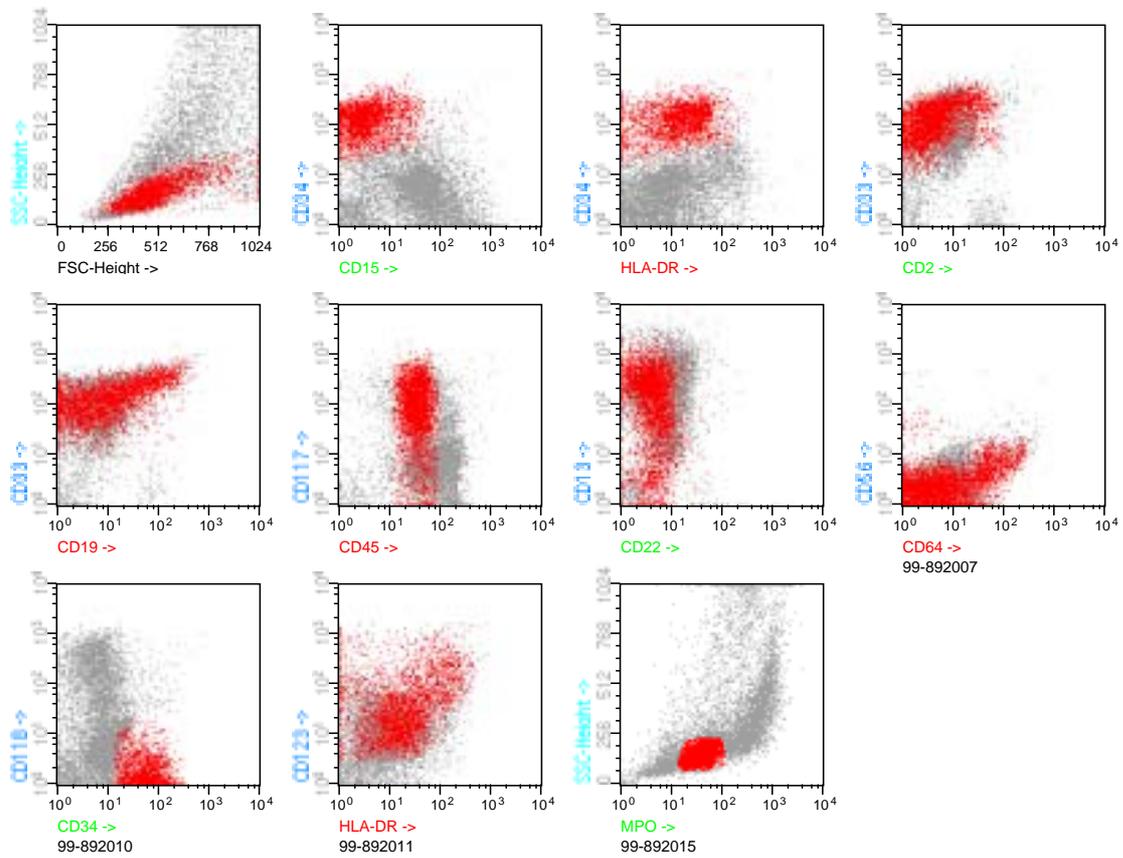


**0,5% Eosinófilos**

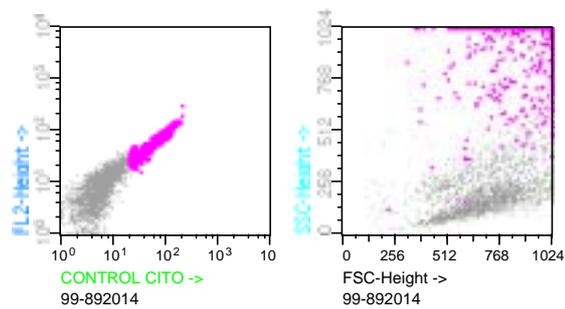


**Inmunofenotipo:** CD34+, CD15+débil, HLA-DR+, CD33+,CD2-, CD19+, CD117-, CD13+ +, CD64+(subpoblación),CD56-, CD36 + (subpoblación), CD11b-, CD123+,MPO+,TDT-

## Caso 36

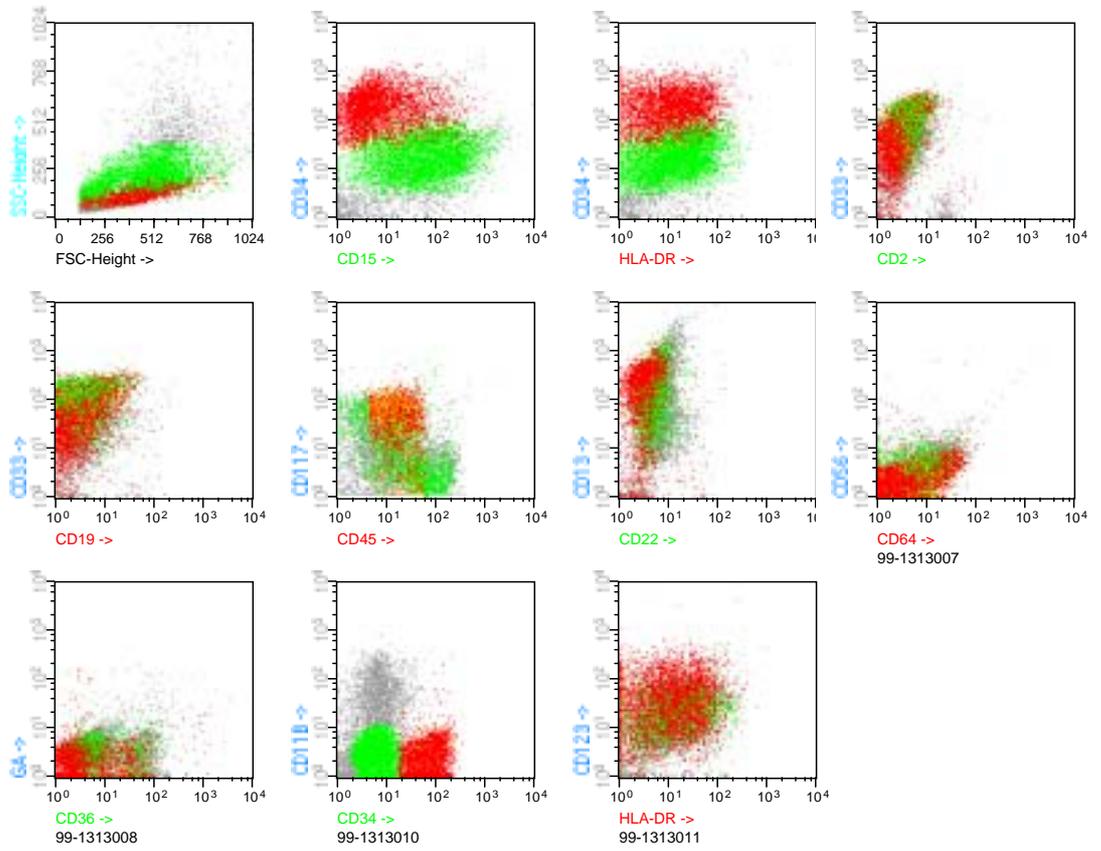


### 23% Eosinófilos

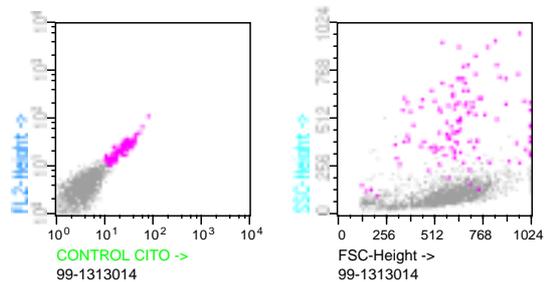


**Immunofenotipo:** CD34+, CD15-, HLA-DR+, CD33+, CD2 + (subpoblación), CD10+, CD117+, CD13+, CD64+ (subpoblación), CD56-, CD11b-, CD123+, MPO+, Tdt-

**Caso 58**

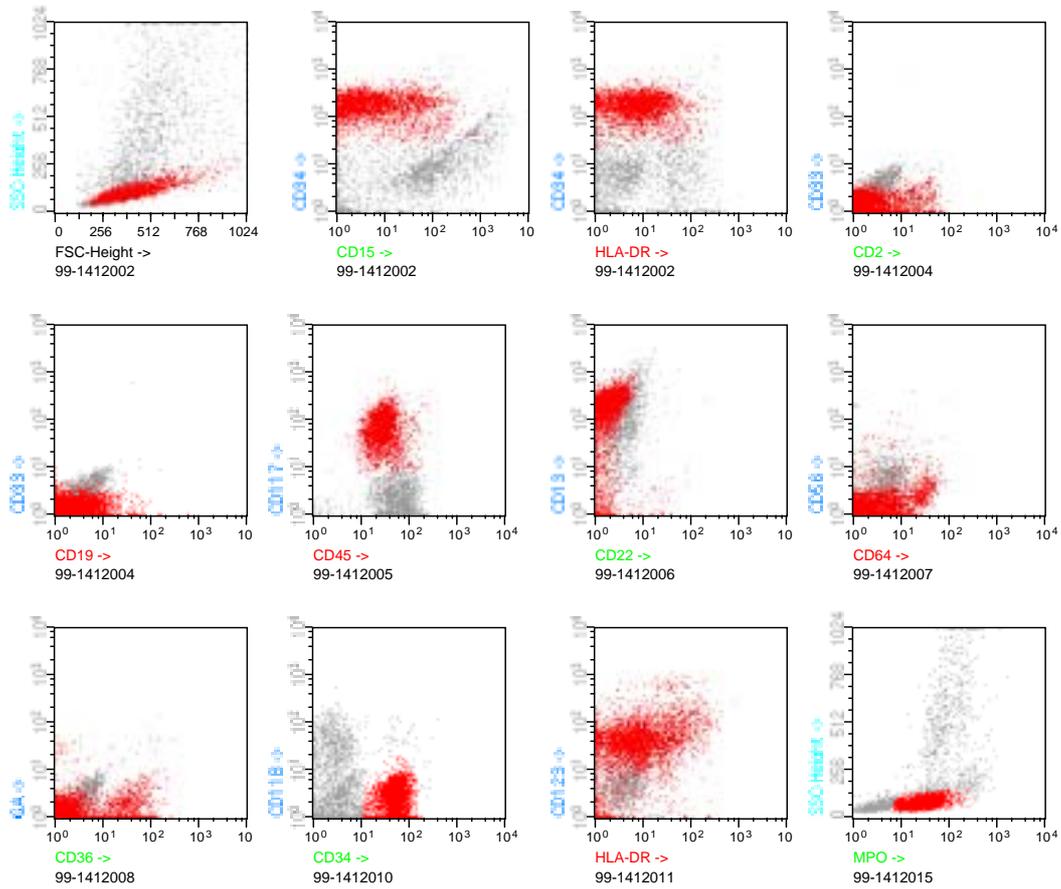


**5% Eosinófilos**

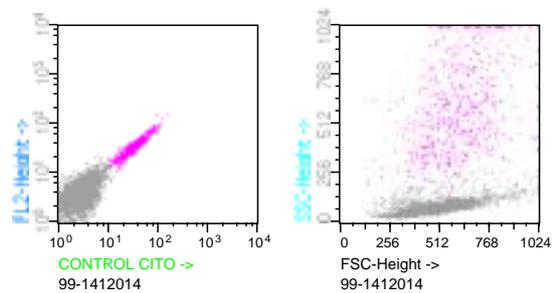


**Inmunofenotipo:** subpoblación 1(rojo):CD34++,CD15+, HLA-DR+,CD33+,CD2-, CD19-,CD117+,CD13++, CD64 + débil, CD56-, CD36 + débil, CD11b - CD123+ MPO+,Tdt-. Subpoblación 2 (verde): CD34+ débil, CD117 + débil, resto igual.

## Caso 63

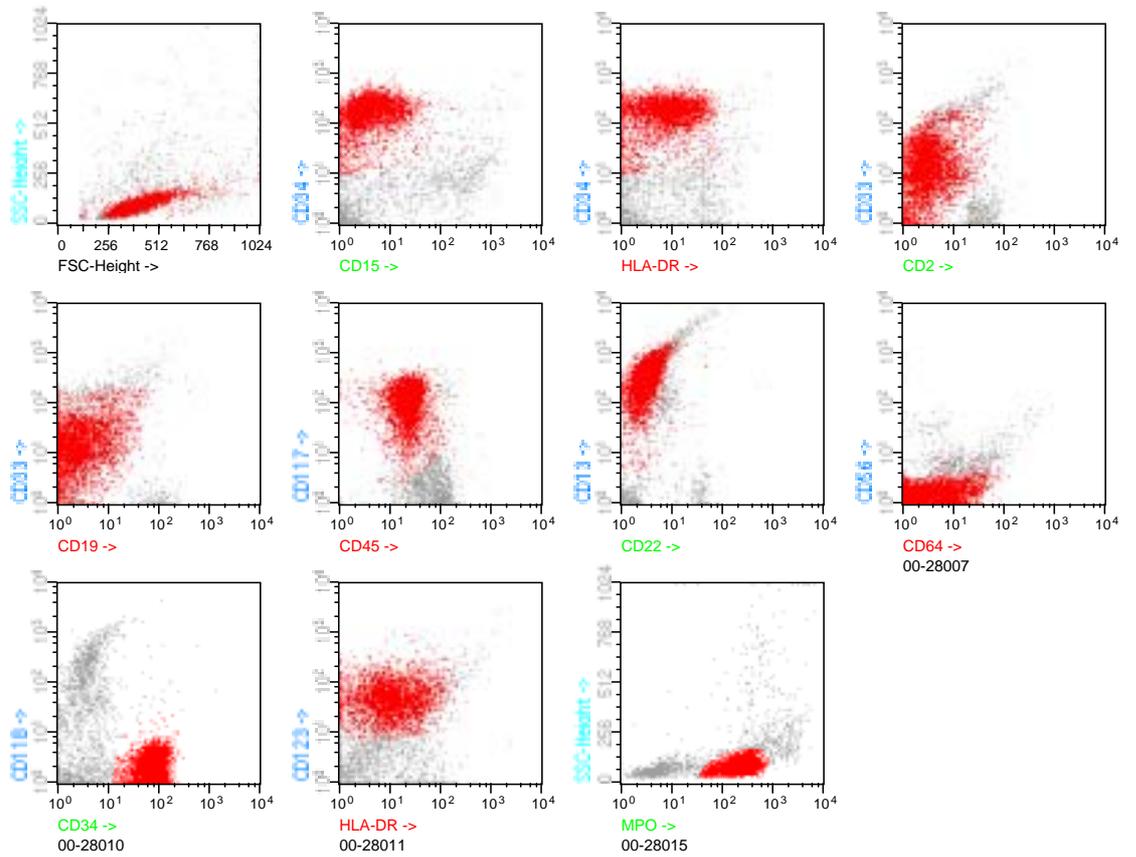


### 11% Eosinófilos

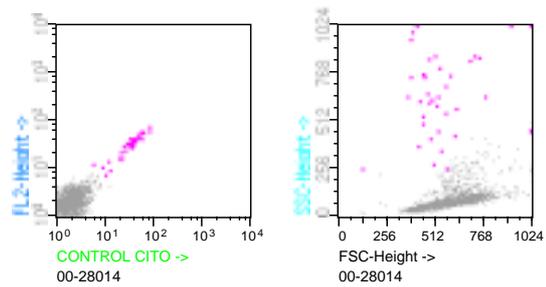


**Inmunofenotipo:** CD34+, CD15+, HLA-DR+, CD33-, CD2 +(subpoblación), CD19-, CD117+, CD13++, CD64 +(subpoblación), CD56-, CD36+ (subpoblación), CD11b-, CD123+, MPO+, Tdt-

**Caso 69**

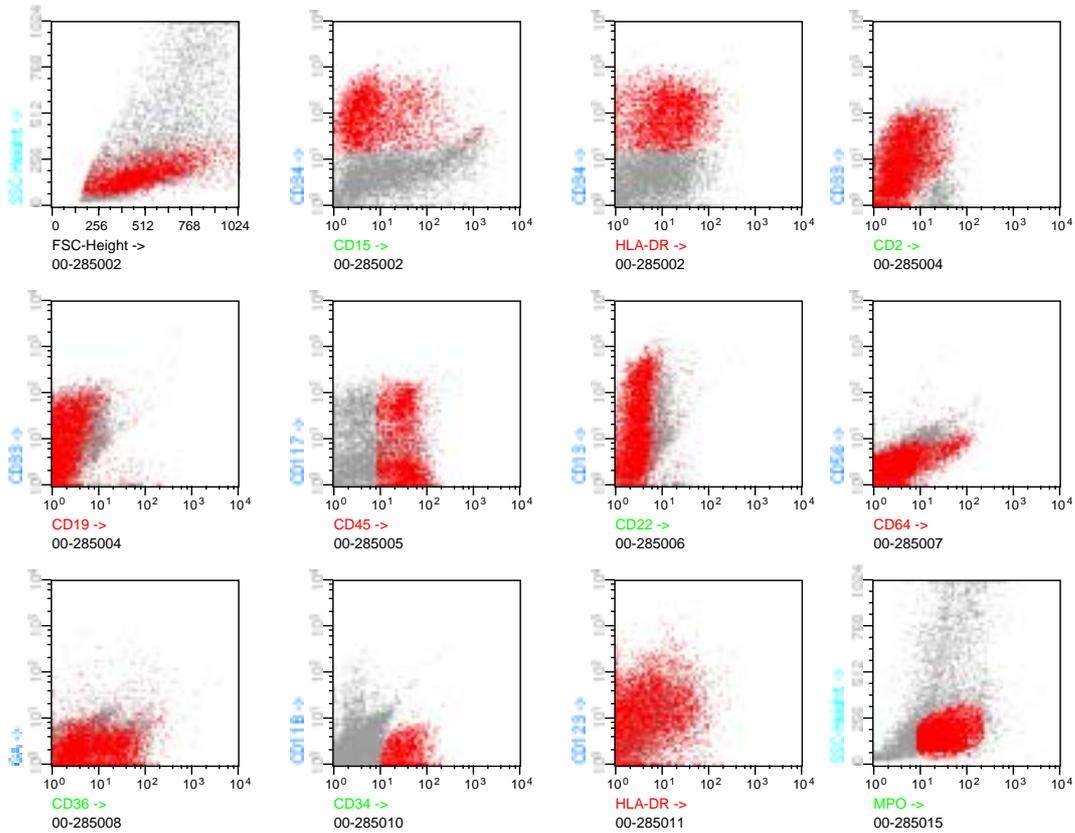


**2,5% Eosinófilos**

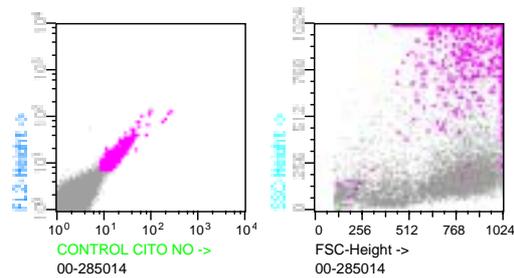


**Inmunofenotipo:** CD34+, CD15-, HLA-DR+, CD33+,CD2-,CD19-, CD117+,CD13++, CD64-,CD56-, CD11b-,CD123+, MPO+, Tdt-

## Caso 74

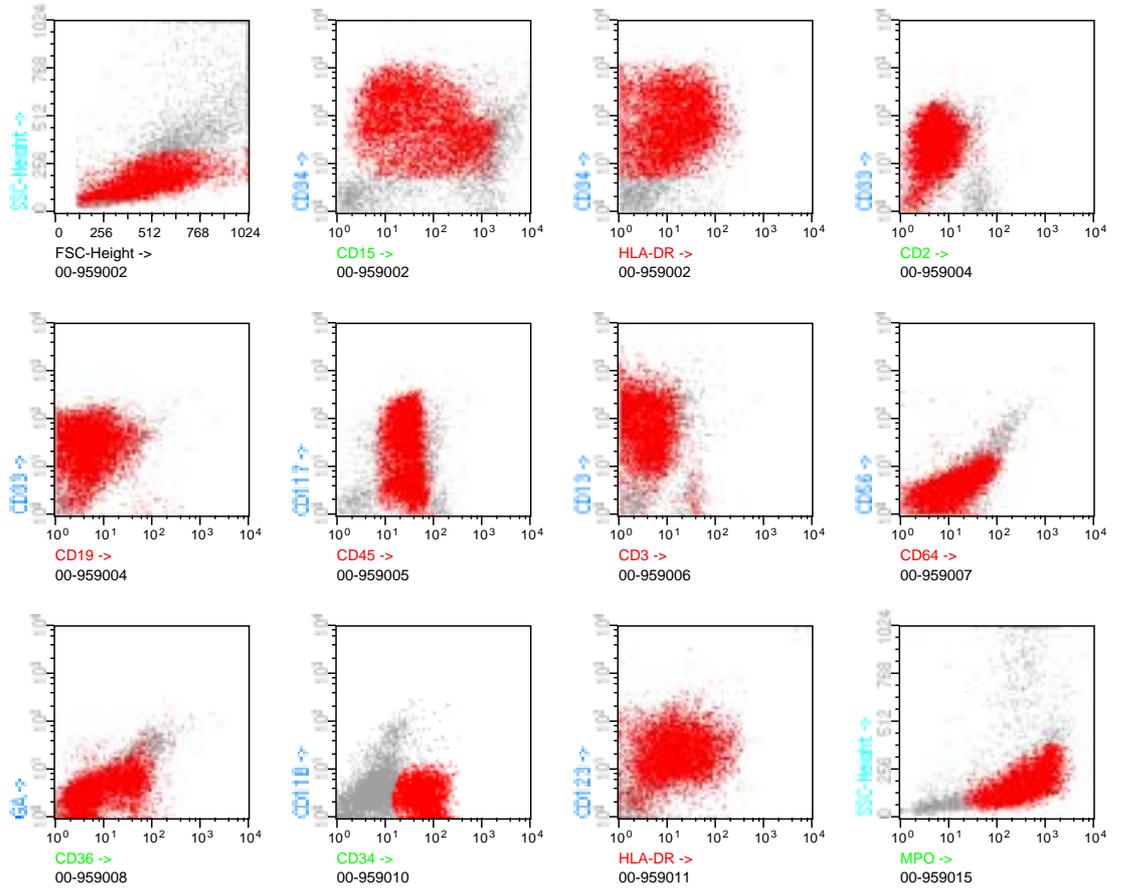


### 10% Eosinófilos

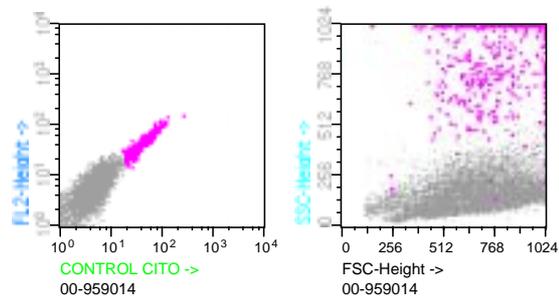


**Inmunofenotipo:** CD34+, CD15+, HLA-DR+, CD33+ débil, CD2-, CD19-, CD117+, CD13+, CD64+ (subpoblación), CD56-, CD36+ (subpoblación), CD11b-, CD123+, MPO+, Tdt-

**Caso 107**

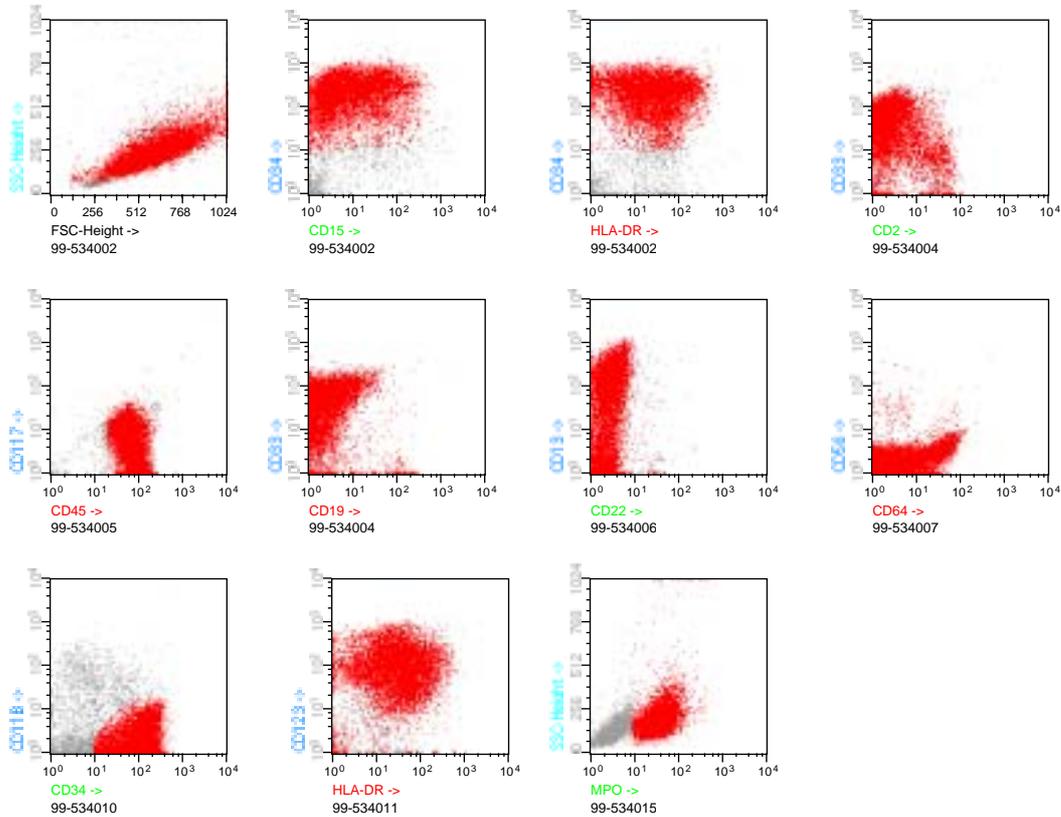


**5% Eosinófilos**

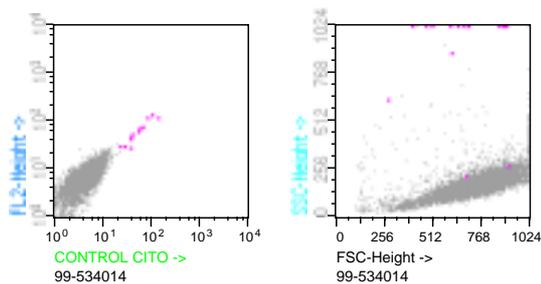


**Inmunofenotipo:** CD34++, CD15+, HLA-DR+, CD33+,CD2-,CD19 + débil, CD117+, CD13+, CD64+, CD56-, CD36+, CD11b-, CD123+,MPO+, Tdt-

## Caso 108

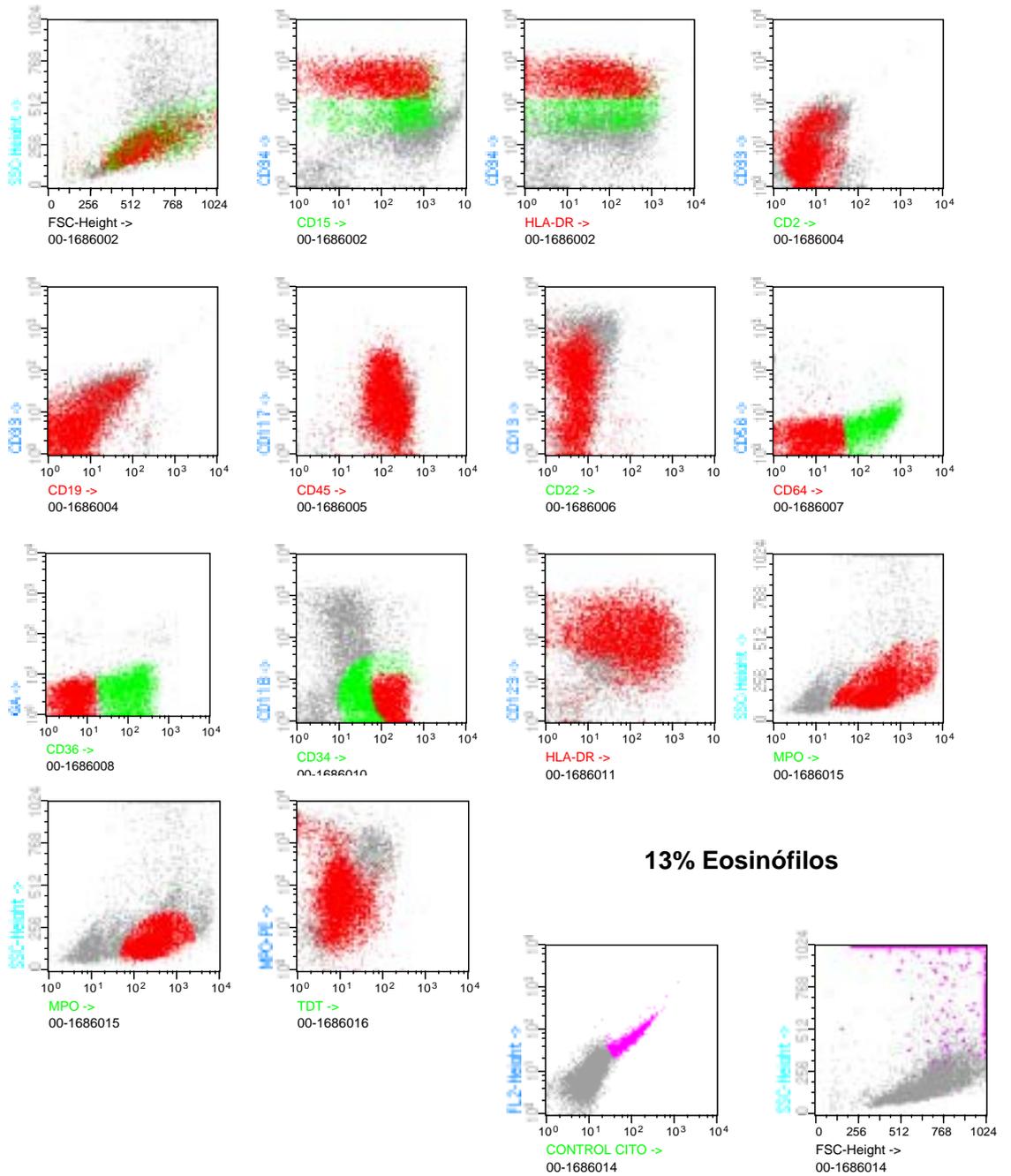


**0,14% Eosinófilos**



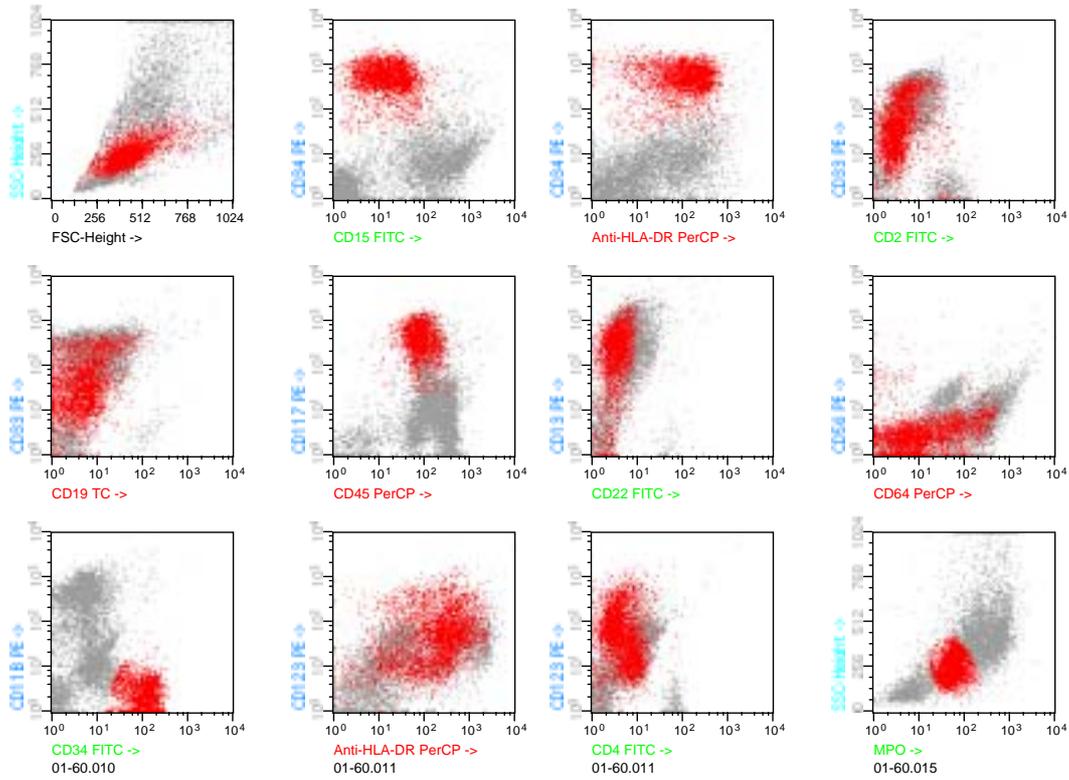
**Inmunofenotipo:** CD34<sup>++</sup>, CD15<sup>+</sup>, HLA<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup> (subpoblación), CD117<sup>-</sup>, CD13<sup>++</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, MPO<sup>+</sup>, Tdt<sup>-</sup>

**Caso 136**

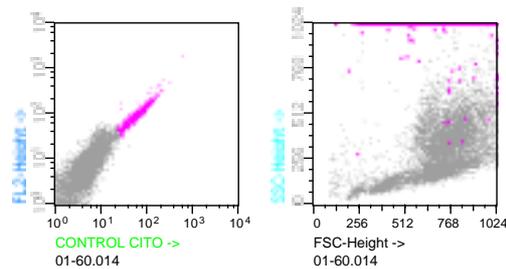


**Inmunofenotipo:** Subpoblación 1 (rojo): CD34++, CD15+, HLA-DR+, CD33+ débil, CD2-, CD19-, CD117+, CD13+, CD64+, CD56-, CD36-, CD11b-, CD123+, MPO+, Tdt-.  
 Subpoblación 2 (verde): CD34+, CD64++, CD36+, resto igual.

## Caso 141

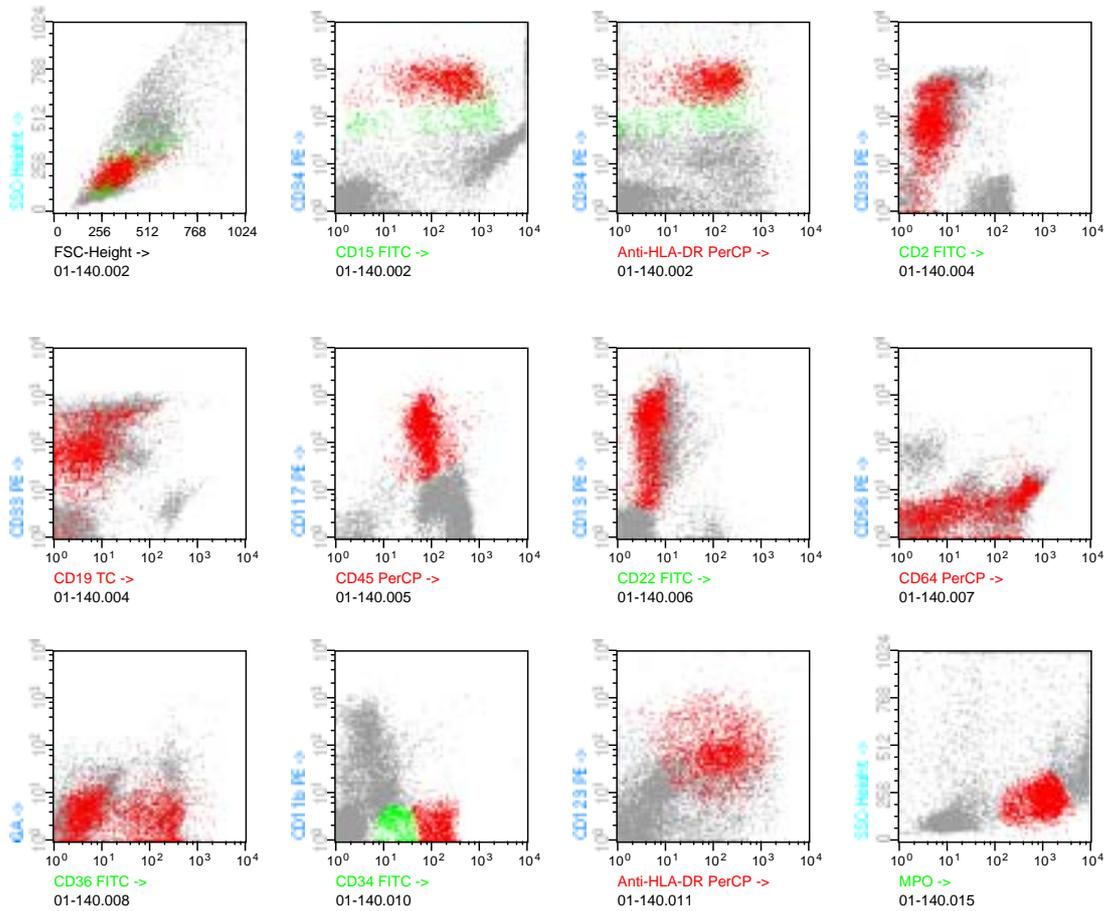


### 8% Eosinófilos

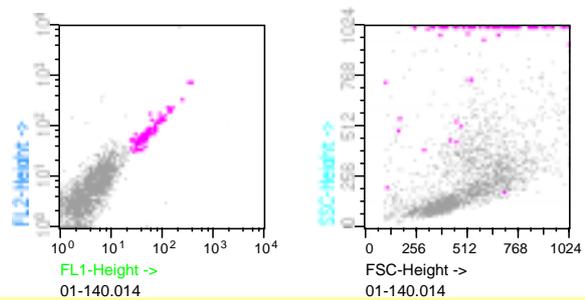


**Inmunofenotipo:** CD34<sup>++</sup>, CD15<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD2<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD117<sup>++</sup>, CD13<sup>++</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, MPO<sup>+</sup>, Tdt<sup>-</sup>

**Caso 145**

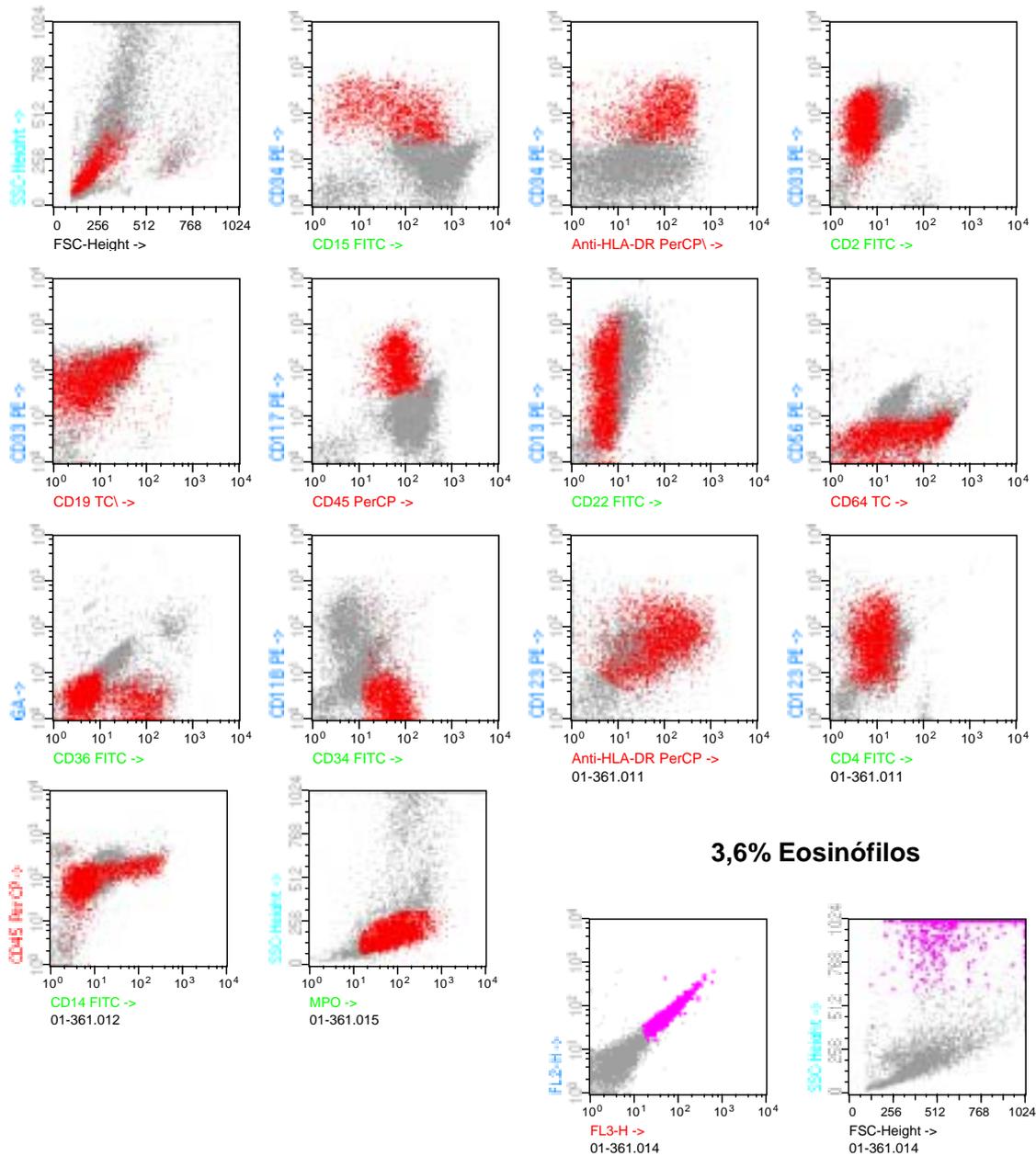


**3,6% Eosinófilos**



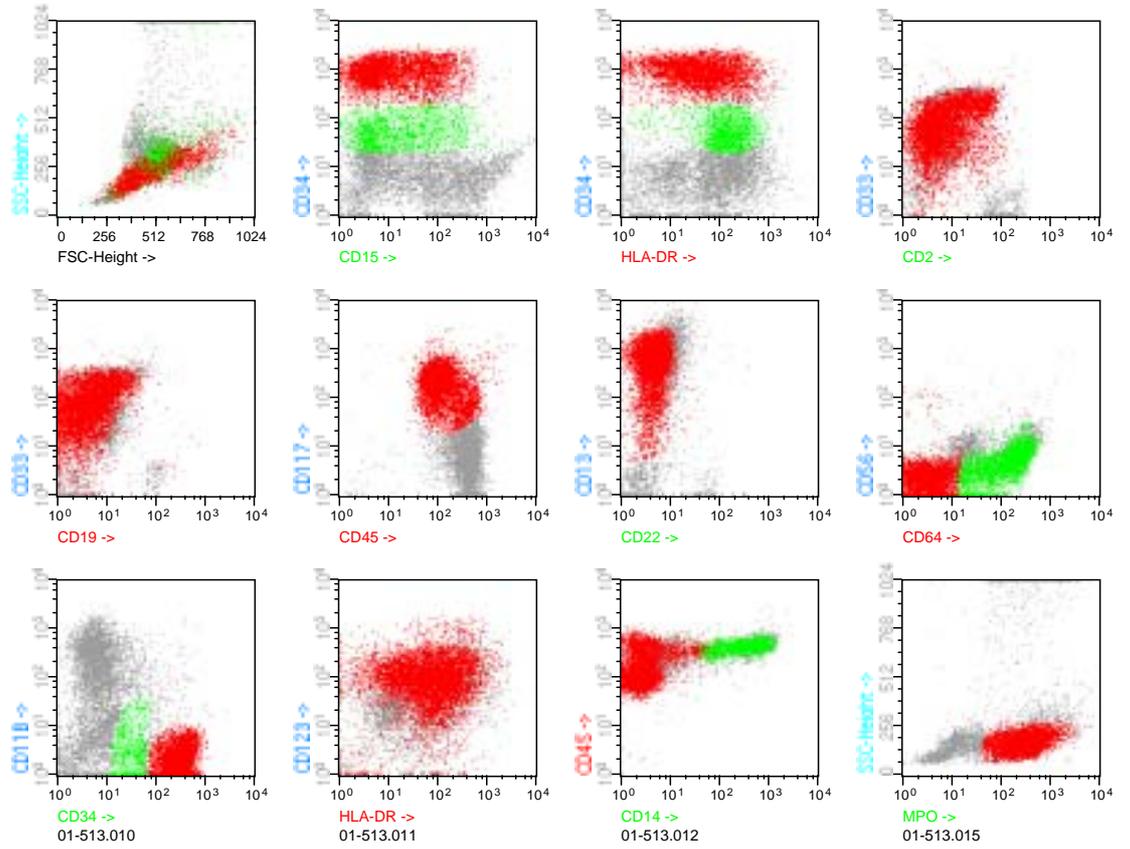
**Inmunofenotipo:** Subpoblación 1 (rojo):CD34+,CD15+,HLA-DR+,CD33+,CD2-, CD117+, CD13+, CD64+,CD56-,CD36+, CD11b-, CD123+, MPO+,Tdt-

## Caso 156

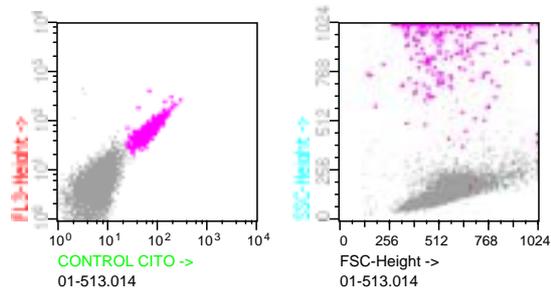


**Inmunofenotipo:** CD34+, CD15+, HLA-DR+, CD33+, CD2-, CD19+ débil, CD117+, CD13+, CD64+, CD56-, CD36 +(subpoblación), CD123+, CD14+ (subpoblación) MPO+, Tdt-

**Caso 164**

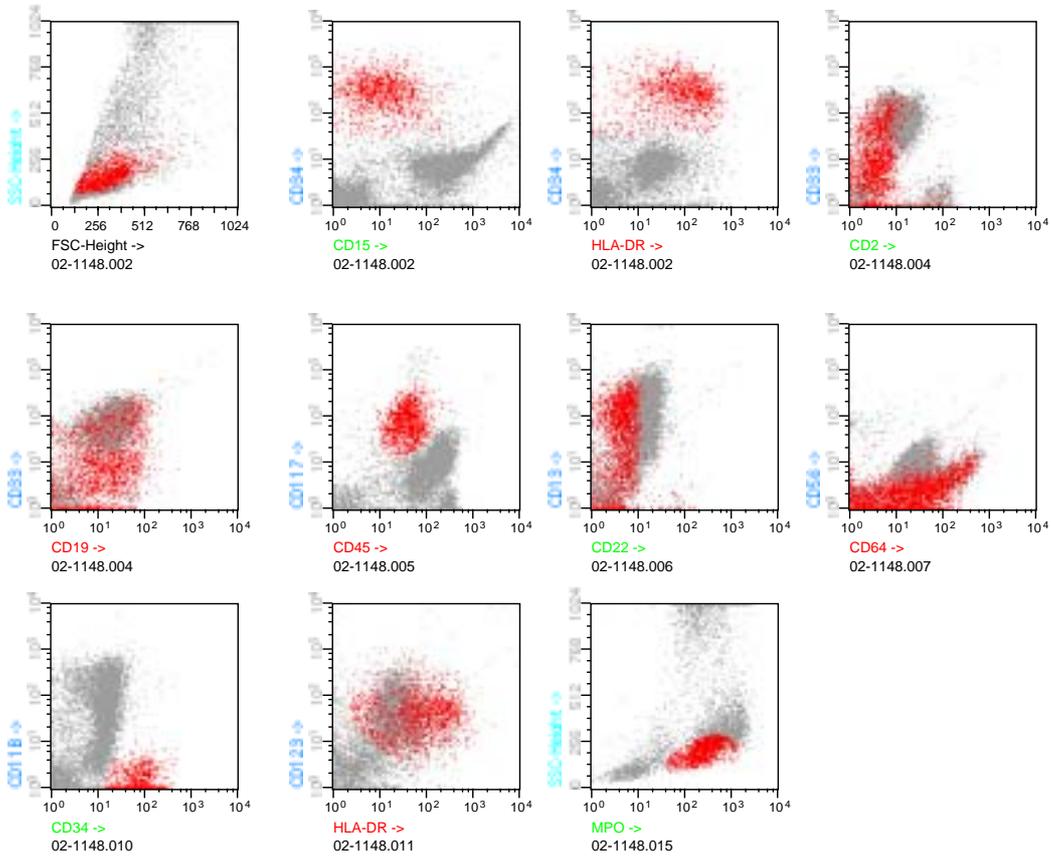


**7% Eosinófilos**

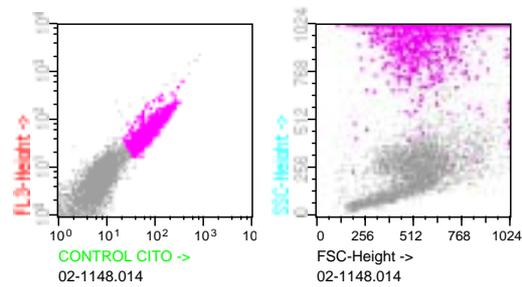


**Inmunofenotipo:** subpoblación 1 (rojo): CD34<sup>++</sup>, CD15<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup> (subpoblación), CD19<sup>-</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD13<sup>++</sup>, CD64<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, MPO<sup>+</sup>, Tdt<sup>-</sup>. Subpoblación 2 (verde): CD34<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, resto igual

## Caso 267

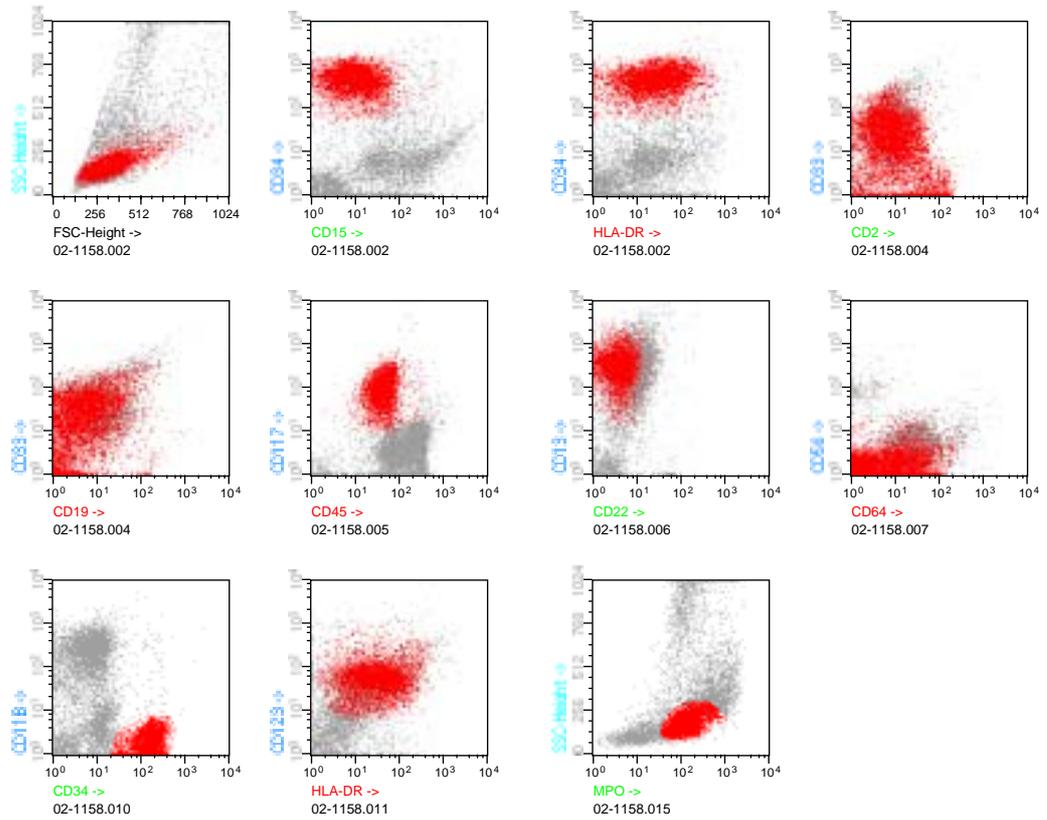


### 50% Eosinófilos

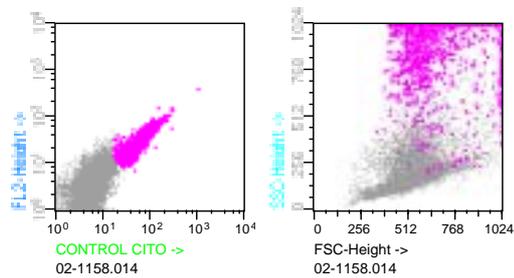


**Inmunofenotipo:** CD34<sup>++</sup>, CD15<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD33 débil, CD2<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, MPO<sup>+</sup>, Tdt<sup>-</sup>

**Caso 269**

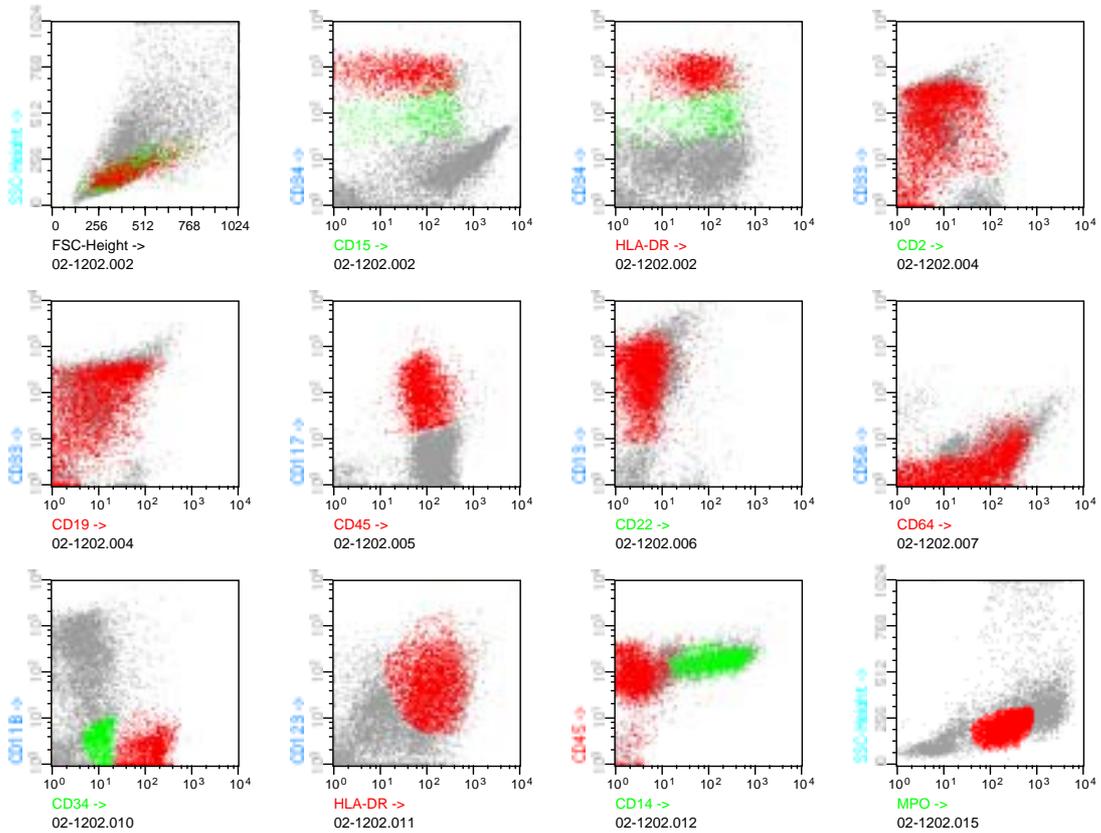


**19% Eosinófilos**

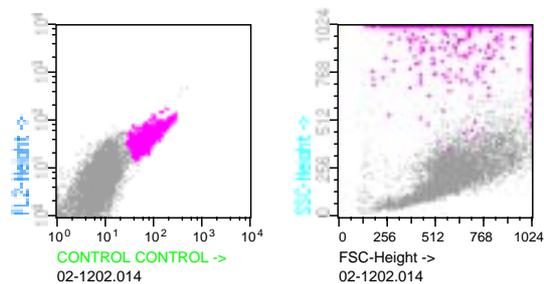


**Inmunofenotipo:** CD34++,CD15+,HLA-DR+, CD33+, CD2+ (subpoblación), Cd19-, CD117+, CD13++, CD64+ (subpoblación),CD56-, CD11b-, CD123+, MPO+,Tdt-

## Caso 275

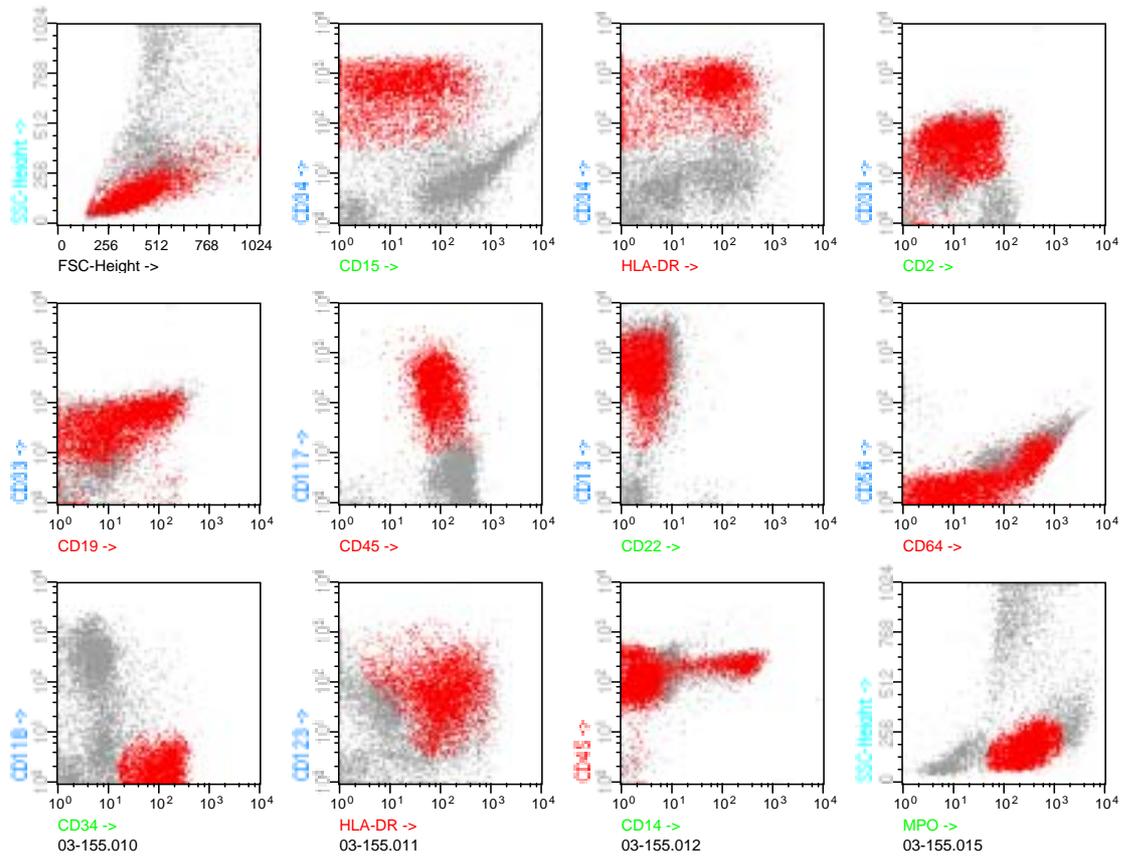


### 12% Eosinófilos

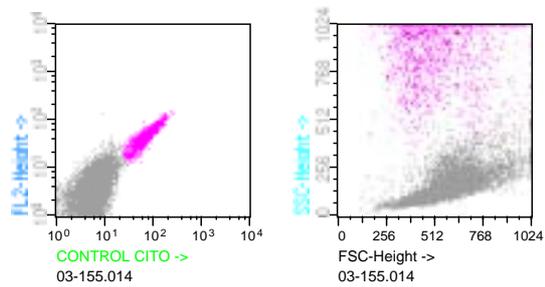


**Inmunofenotipo:** Subpoblación 1 (rojo) CD34<sup>++</sup>, CD15<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD2 + débil, CD19<sup>+</sup> débil, CD117<sup>+</sup>, CD13<sup>++</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, Cd14<sup>-</sup>, MPO<sup>+</sup>, Tdt<sup>-</sup>.  
 Subpoblación 2 (verde): CD34<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, resto igual.

**Caso 280**



**20% Eosinófilos**



**Inmunofenotipo:** CD34++,CD15+,HLA-DR+, CD2+, CD33+, CD19+, CD117++,CD13++, CD64+,CD56-,CD11b-,CD123+,CD14+ (subpoblación), MPO+, Tdt-



**V.2.2.3 Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells.**

**Leukemia 2003; 17: 76-82**

El objetivo de este estudio es analizar la incidencia y el valor pronóstico del reordenamiento del gen MLL en una serie de pacientes con LMA y determinar las características inmunofenóticas de estos casos. Los datos obtenidos muestran una incidencia de esta lesión molecular del 14% siendo más frecuentes en las leucemias con diferenciación monocítica. El reordenamiento de MLL debido a la duplicación parcial en tandem del gen presente en el 10% de los casos se detecta especialmente en pacientes con cariotipo normal. El análisis inmunofenotípico muestra un patrón mieloide con diferenciación monocítica y con frecuentes aberraciones fenotípicas útiles en el seguimiento de la enfermedad residual mínima. En la mayoría de pacientes con reordenamiento de MLL en remisión completa se detectan células leucémicas residuales lo que se traduce en una mayor probabilidad de recaída y menor supervivencia con respecto al subgrupo de pacientes que no presentan esta lesión molecular.



**Análisis inmunofenotípico de los pacientes con reordenamiento de MLL**

De los 264 pacientes analizados en 142 obtuvimos muestra para el estudio del reordenamiento del gen MLL. La frecuencia observada de esta alteración molecular fue del 12%. En cinco casos el reordenamiento fue debido a translocación, en 11 por duplicación parcial en tandem y en un caso por “cleavage”. Las características clínicas y biológicas de parte de esta serie de enfermos se explican en el apartado V.2.2.3, en el artículo correspondiente. En esta sección se comentará más extensamente el patrón inmunofenotipo de estos pacientes. De los 17 casos con reordenamiento de MLL se obtuvo muestra para realizar el análisis inmunofenotípico en 14 de ellos.

***Inmunofenotipo de los pacientes con reordenamiento de MLL***

|    | 34 | 15 | HLA-DR | 10 | 20 | 19 | 33 | 2 | 13 | 3 | 117 | CD 45 | 7 | 56 | 66 | 64 | GA | 36 | 11B | 41 | 123 | 4 | 14 | MPO cit | 79a cit | 3 cit | Tdt Nuc |
|----|----|----|--------|----|----|----|----|---|----|---|-----|-------|---|----|----|----|----|----|-----|----|-----|---|----|---------|---------|-------|---------|
| 1  | -  | +  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +D  | +     | - | +  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | +   | - | -  | +       | -       | -     | -       |
| 2  | -  | -  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | +     | - | +  | -  | +  | -  | -  | +   | -  | +   | - | -  | +       | -       | -     | -       |
| 3  | +  | -  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +     | - | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | +   | + | -  | +       | -       | -     | -       |
| 4  | -  | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | +     | - | -  | -  | -  | -  | -  | +   | +  | -   | + | -  | -       | +       | -     | -       |
| 5  | +  | -  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +     | - | -  | -  | +D | -  | -  | -   | -  | +   | - | -  | +       | -       | -     | -       |
| 6  | +  | +  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | -   | +     | - | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | +   | + | -  | -       | -       | -     | -       |
| 7  | -  | +  | +      | -  | -  | -  | -  | - | -  | - | +D  | +     | - | +  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | +   | + | -  | -       | -       | -     | -       |
| 8  | +  | -  | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +     | + | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | +   | - | -  | -       | -       | -     | -       |
| 9  | -  | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +D | - | -   | +     | - | +  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | +   | - | -  | -       | -       | -     | -       |
| 10 | +  | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +     | - | -  | -  | +D | -  | -  | -   | -  | +   | - | -  | +       | -       | -     | -       |
| 11 | -  | +  | +      | -  | -  | -  | +  | + | -  | - | -   | +     | - | +  | -  | +  | -  | -  | +   | -  | +   | - | -  | -       | -       | -     | -       |
| 12 | -  | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | -  | - | -   | +     | - | +  | -  | +  | -  | -  | +   | +  | +   | + | -  | -       | -       | -     | -       |
| 13 | -  | +  | +      | -  | -  | -  | +  | - | +D | - | +D  | +     | - | +  | -  | +  | -  | +  | +D  | -  | +   | + | -  | -       | -       | -     | -       |
| 14 | +  | +D | +      | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +     | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | +   | - | -  | +       | -       | -     | -       |

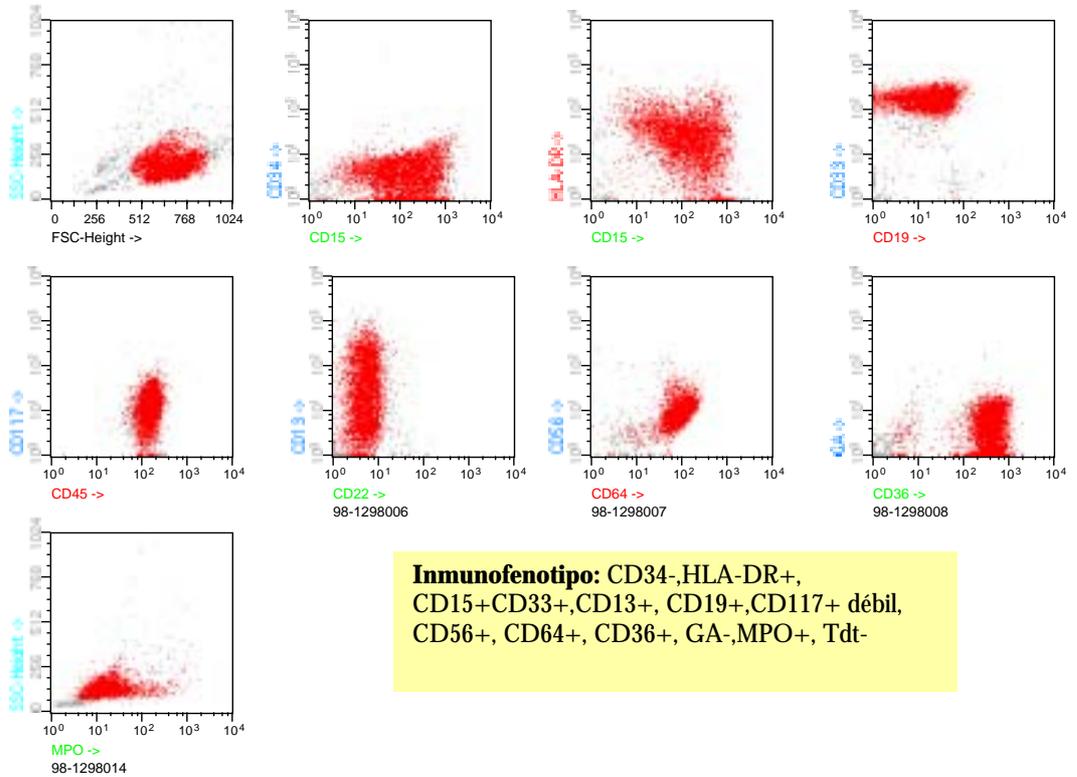
GA: Glicoforina A; cit: citoplasma; F: Fuerte; D: débil; Nuc: nuclear

A diferencia de los pacientes con AML-1/ETO y CBF $\beta$ /MYH-11 explicados en los apartados anteriores, la mayoría de los pacientes con reordenamiento de MLL mostraban una única población blástica (10/14) característicamente monocítica madura. El patrón inmunofenotípico más frecuente fue: CD34- (57%), HLA-DR+ (100%), CD123+(100%), CD13+(78%), CD33+(93%), CD117+(57%). La mieloperoxidasa de citoplasma solo fue positiva en el 50% de los casos. Todos los pacientes presentaban expresión de antígenos monocíticos, el más frecuente el CD64 (93%) seguido del CD11b (50%) y CD56 (50%), CD36 (43%) y CD4 (38%). La coexpresión de antígenos linfoides fue una característica poco habitual en este subtipo de pacientes. El CD19 relacionado con la diferenciación monocítica fue positivo en 6 pacientes, mientras que el CD2 y CD7 solo fueron expresados en dos casos respectivamente. No se detectó en ningún caso positividad para Tdt.

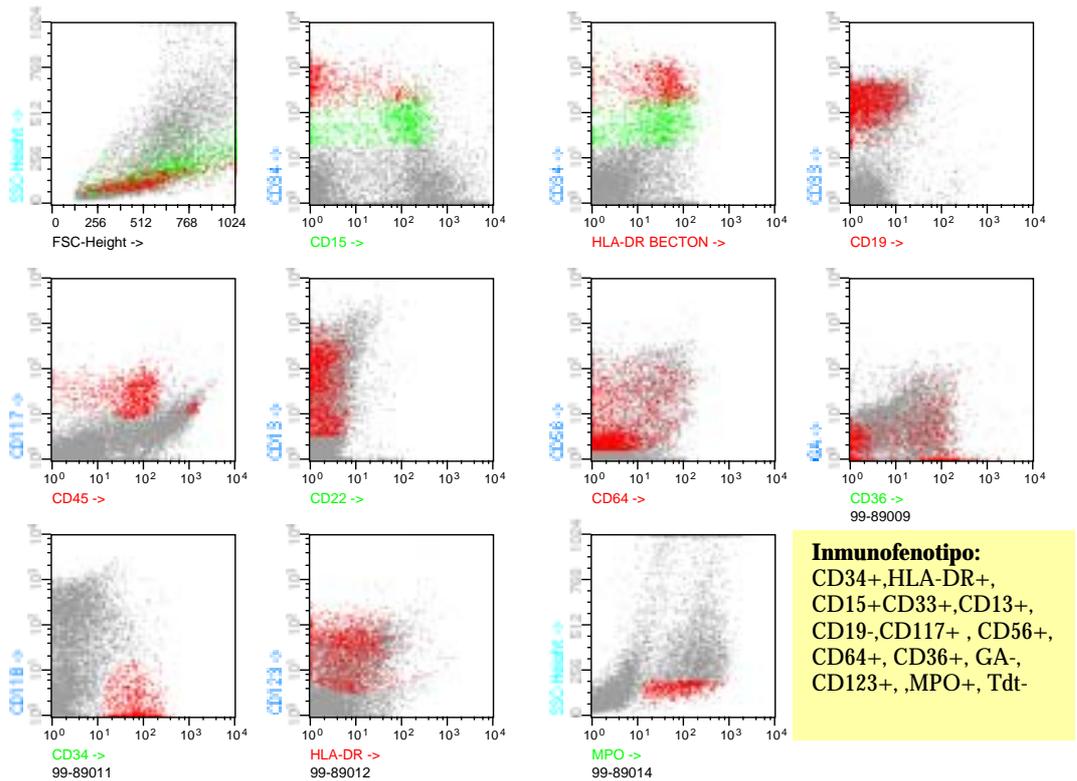
**ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE LOS PACIENTES CON LMA  
Y REORDENAMIENTO DE MLL**



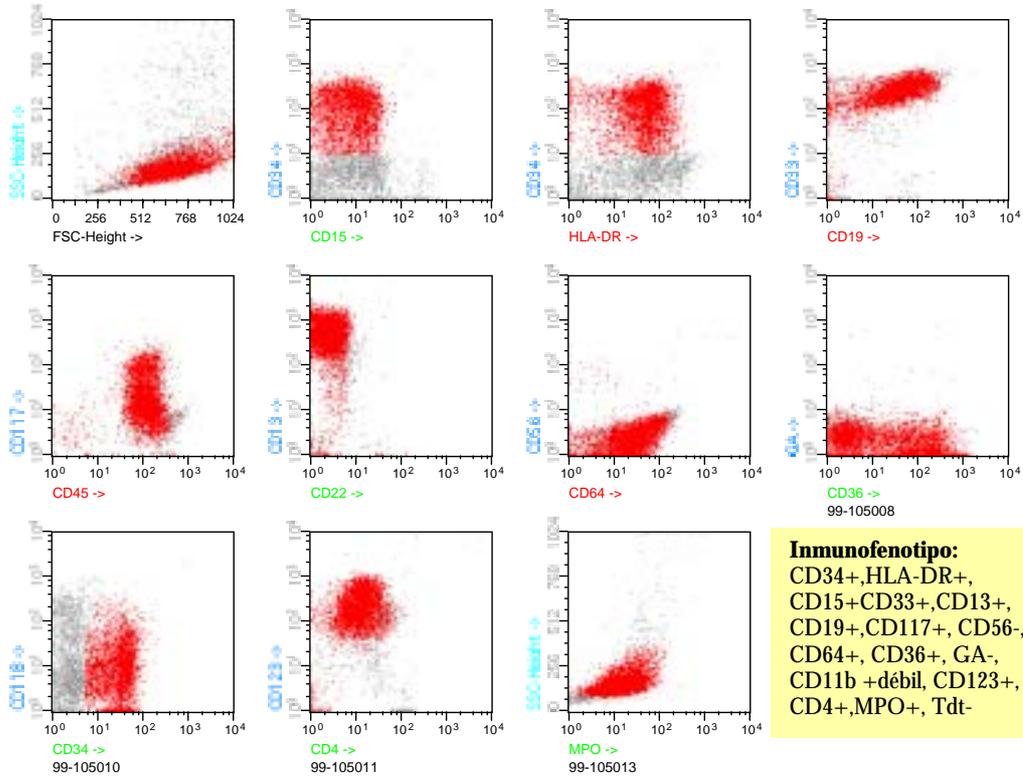
**Caso 6**



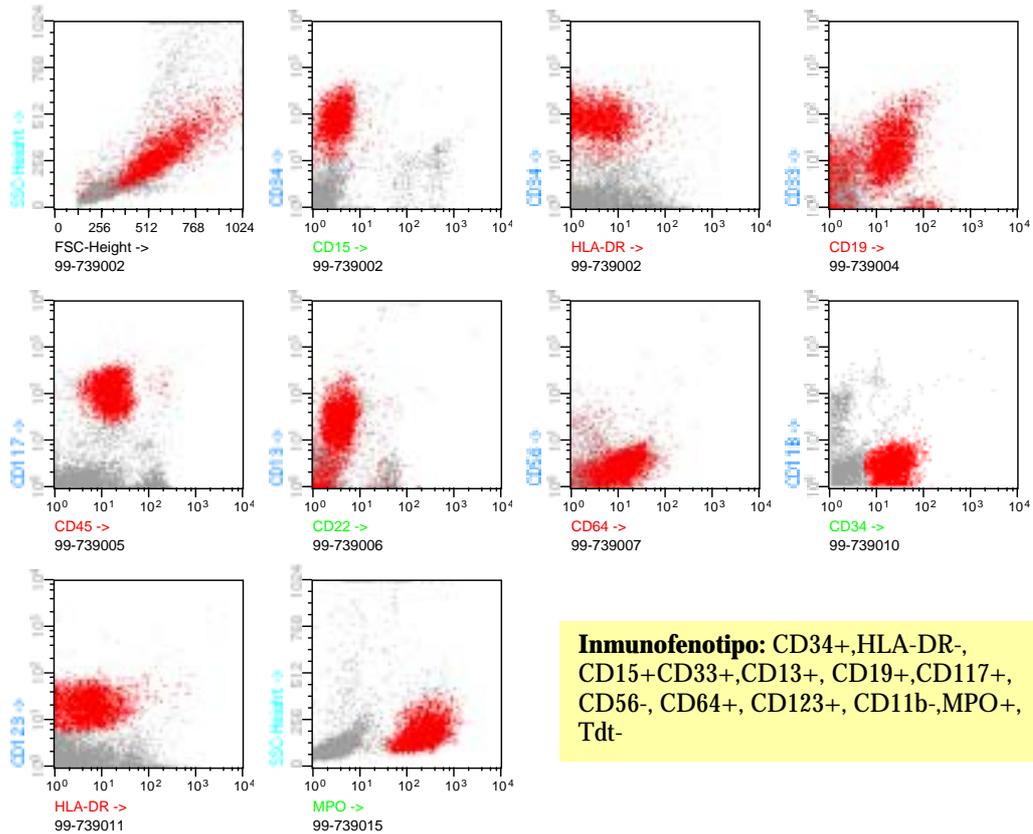
**Caso 9**



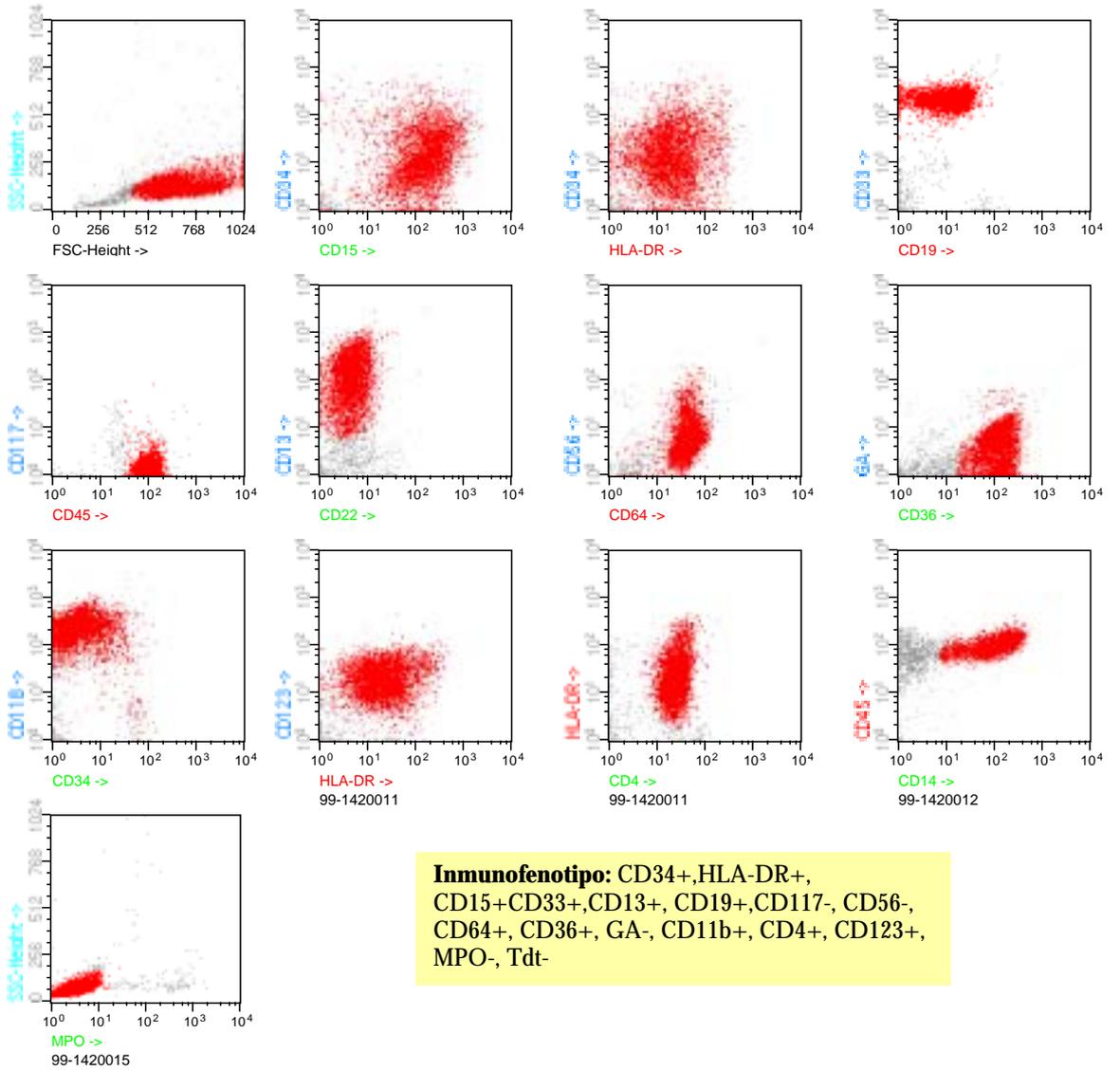
## Caso 11



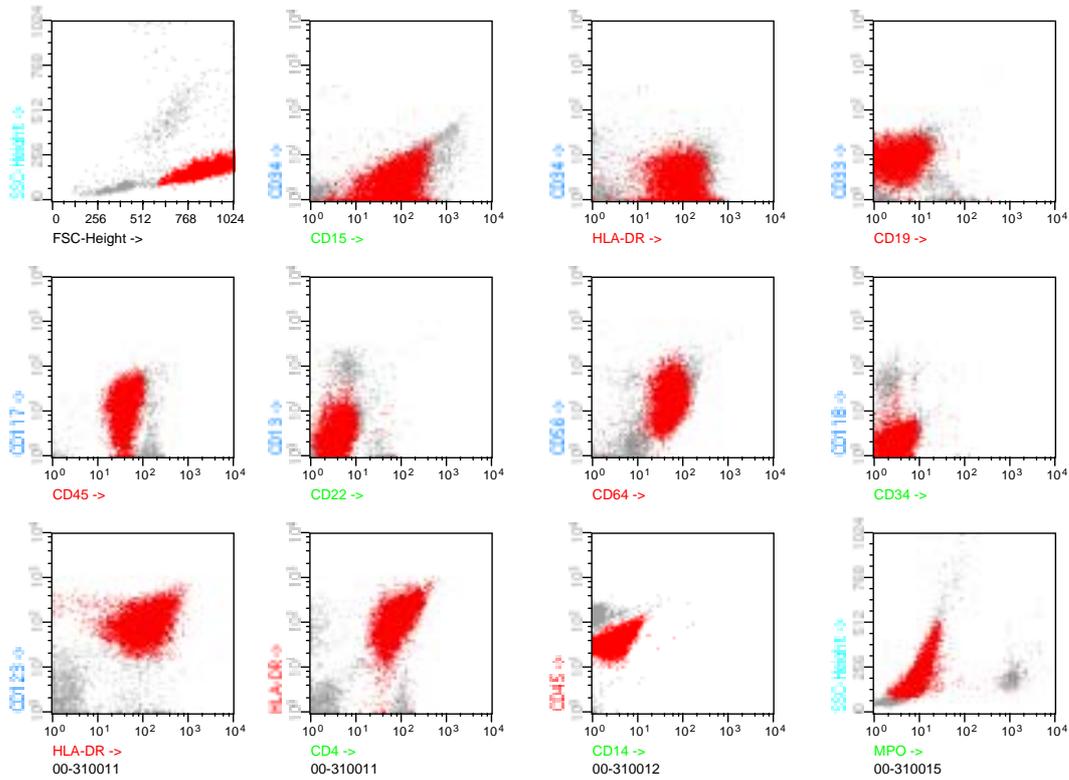
## Caso 13



**Caso 63**

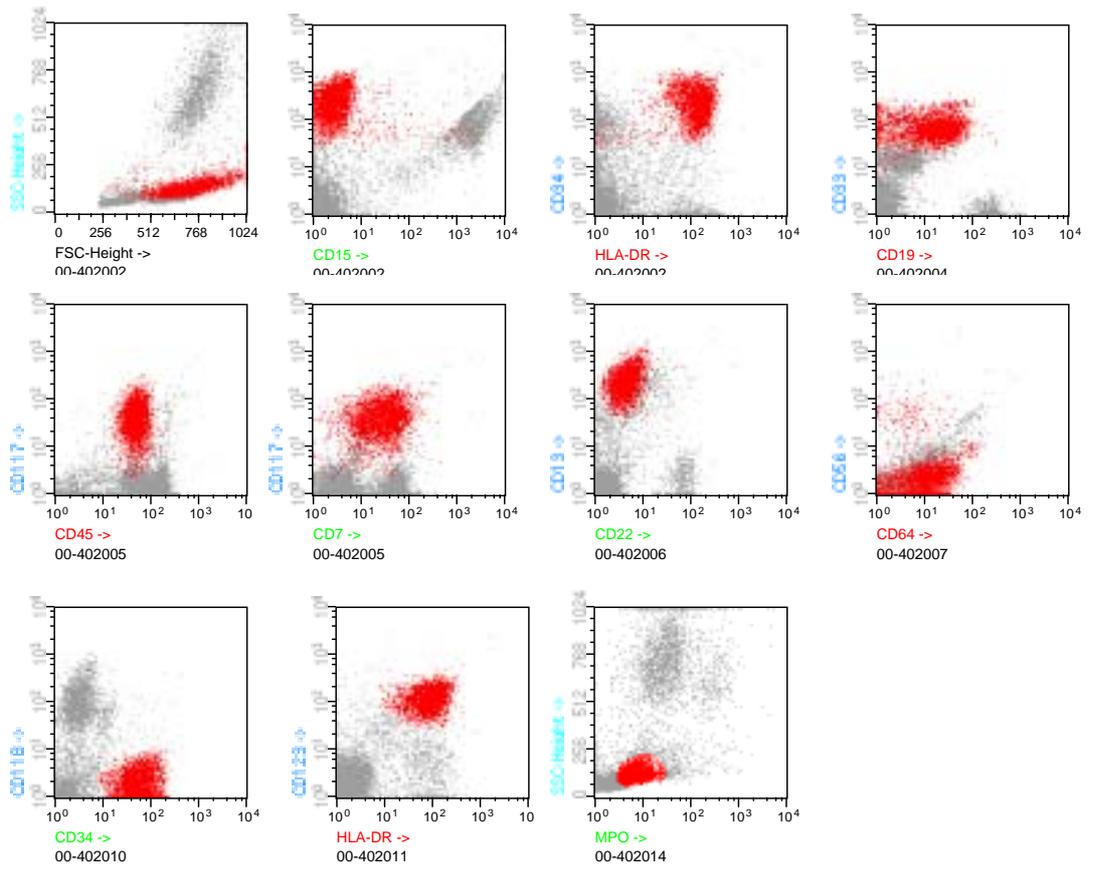


## Caso 75



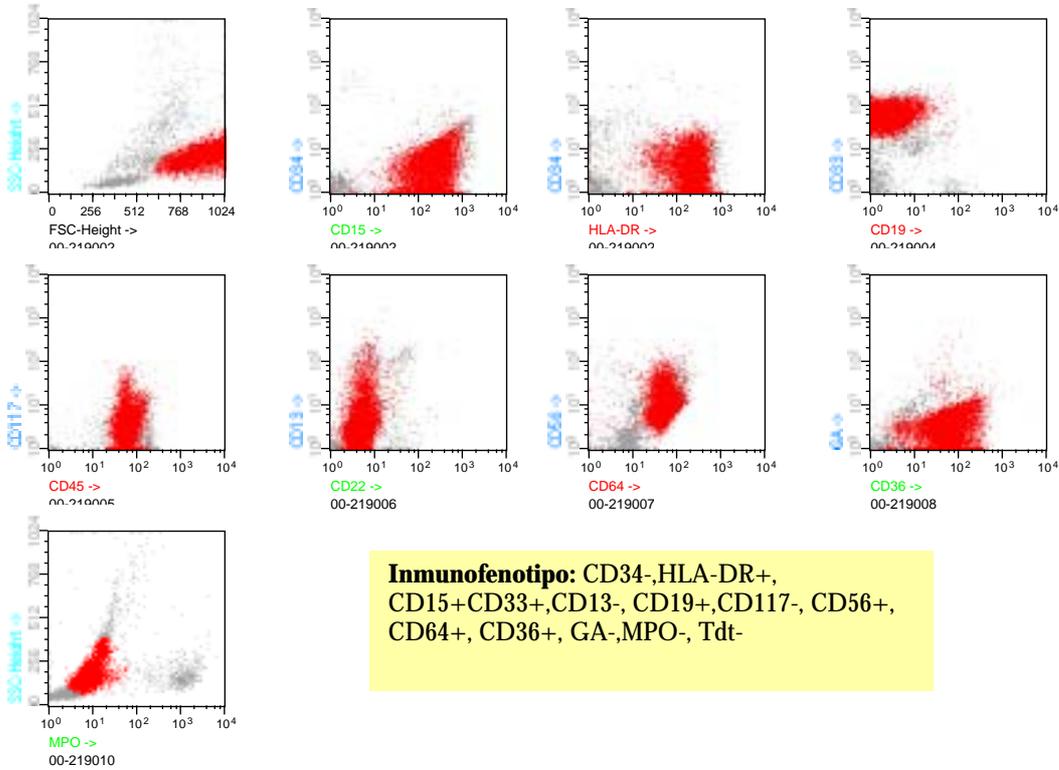
**Inmunofenotipo:** CD34-,HLA-DR+, CD15+CD33-,CD13-, CD19-,CD117+ débil, CD56+, CD64+, CD123+, CD4+, CD14-,MPO-, Tdt-

**Caso 78**

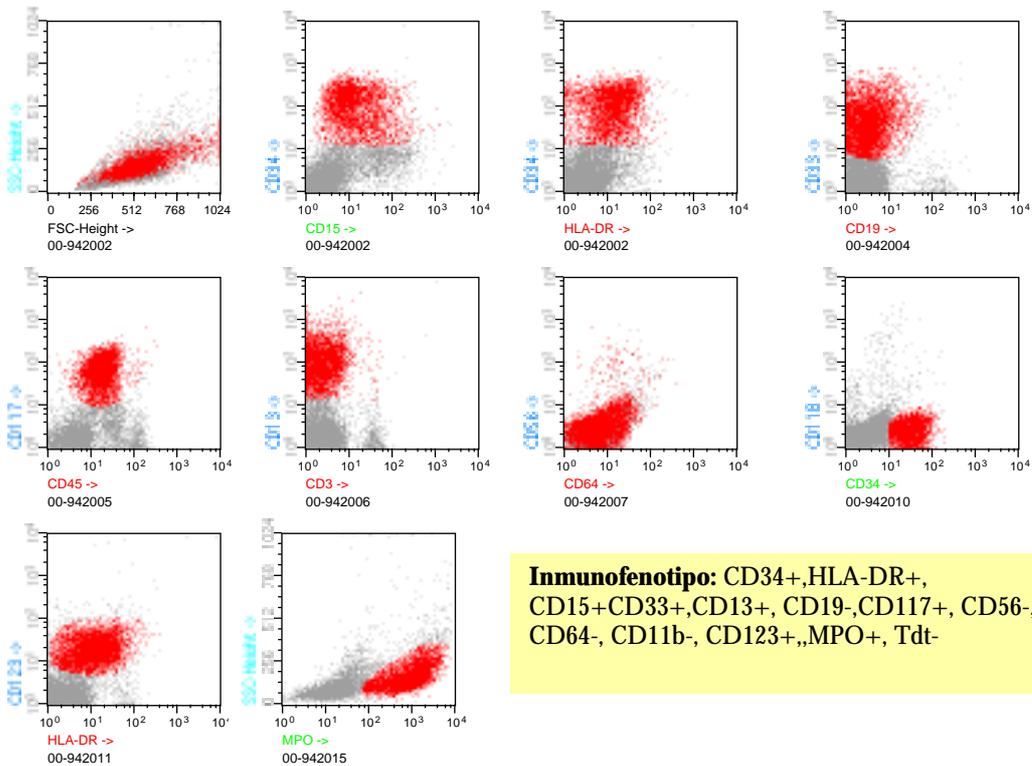


**Inmunofenotipo:** CD34+, HLA-DR+, CD15-, CD33+, CD13+, CD19+, CD117+, CD7+, CD56-, CD64+, CD11b-, CD123+, MPO-, Tdt-

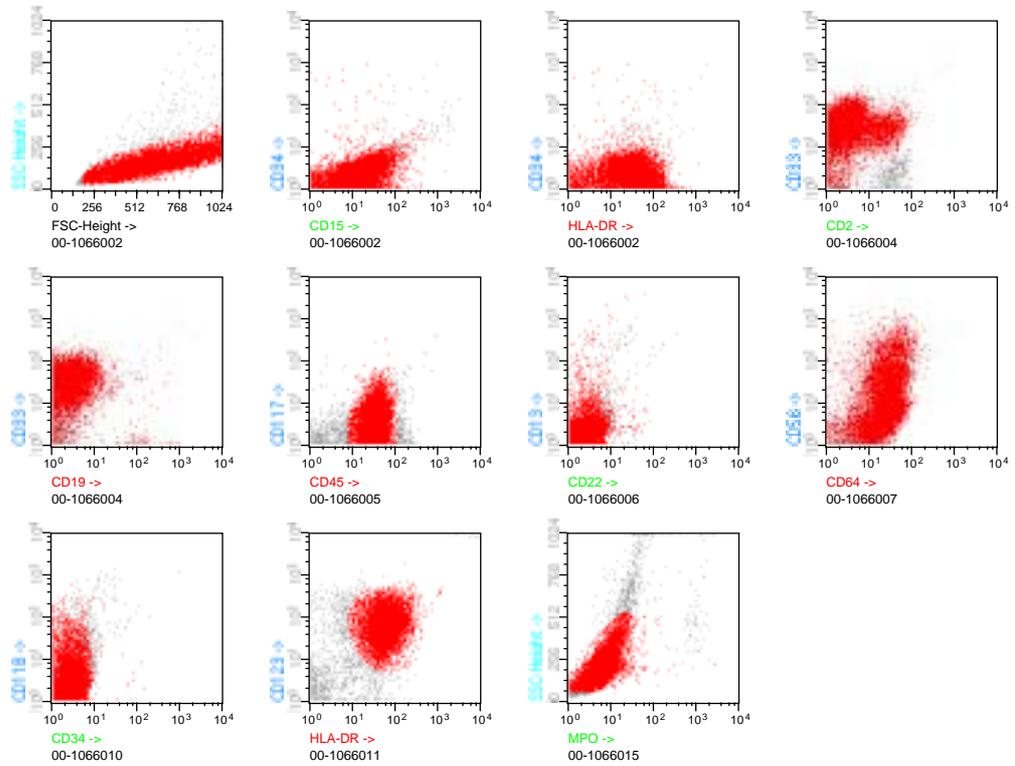
## Caso 95



## Caso 101

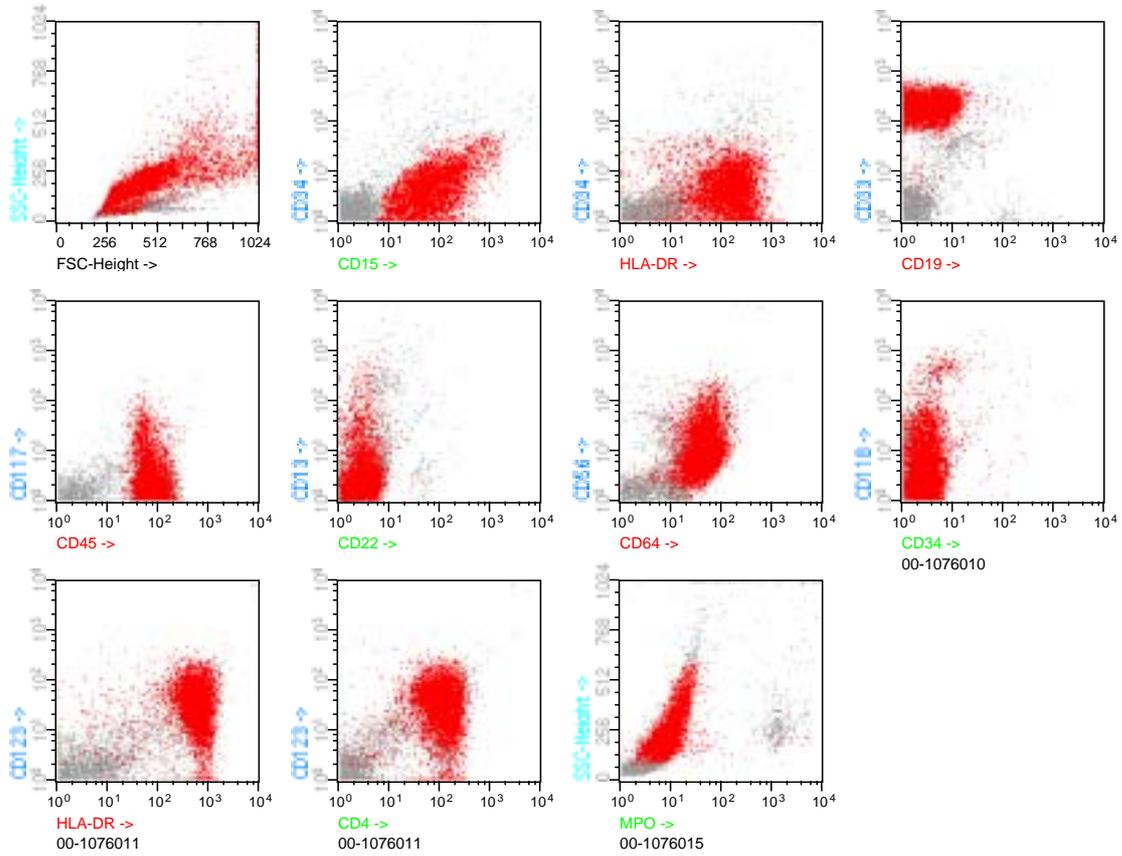


**Caso 110**



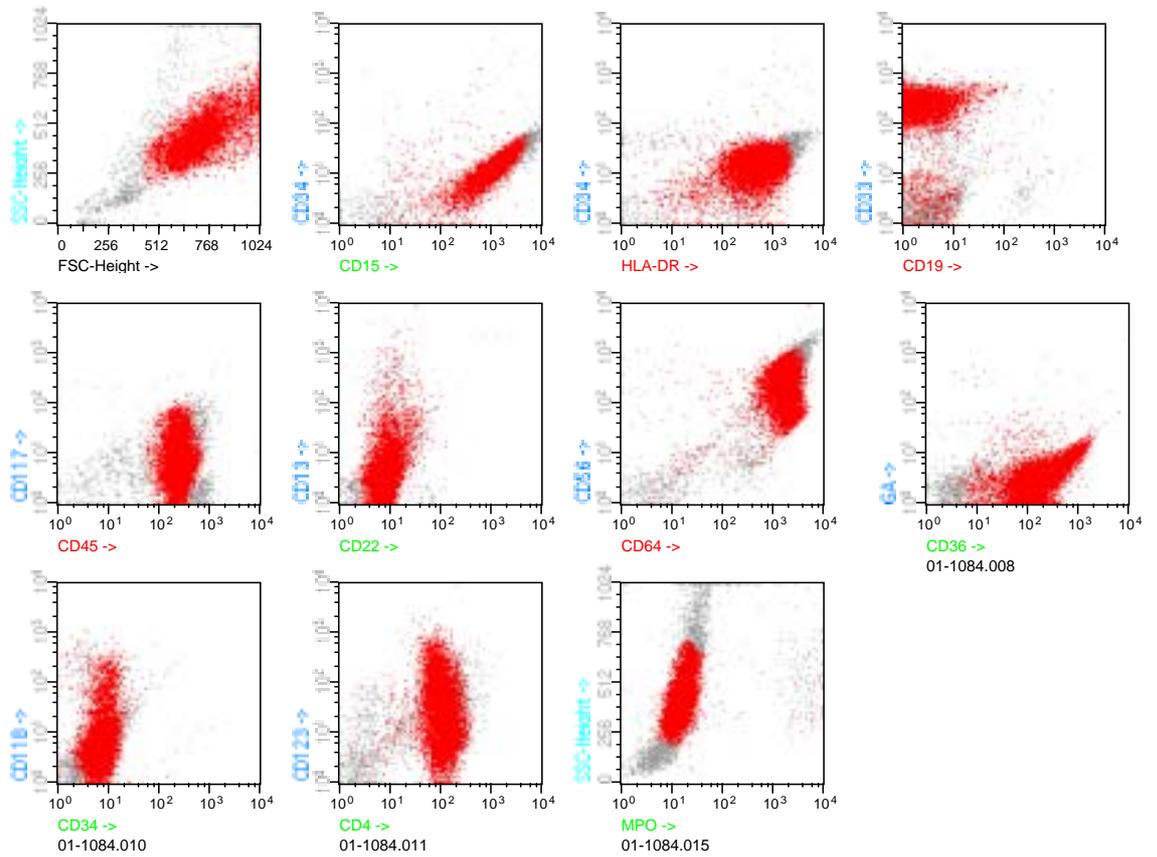
**Inmunofenotipo:** CD34-,HLA-DR+, CD15+CD33+,CD2+ (subpoblación), CD13-, CD19-,CD117-, CD56+, CD64+, CD11b-, CD123+,MPO-, Tdt-

## Caso 112



**Immunofenotipo:** CD34-,HLA-DR+, CD15+CD33+,CD13-, CD19-,CD117-, CD56+, CD64+, CD11b+ débil, CD123+, CD4+,MPO-, Tdt-

**Caso 188**



**Inmunofenotipo:** CD34-,HLA-DR+, CD15+CD33+,CD13-, CD19-,CD117+ débil, CD56+, CD64+, CD36+, GA-, CD123+, CD4+, MPO-, Tdt-



**V.2.2.4 Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication.**

**Haematologica 2003;88: 637-645**

Se analiza el patrón inmunofenotípico y las características clínico-biológicas de los pacientes con duplicación del gen FLT3 en una serie de pacientes con LMA. La incidencia de esta lesión molecular es del 27% y se asocia a alta leucocitosis, subtipo FAB M5, cariotipo normal y menor supervivencia. El análisis inmunofenotípico muestra un patrón mieloide con diferenciación monocítica. Las diferencias más significativas con el resto de pacientes de la serie es la mayor expresión de antígenos monocíticos maduros y la menor frecuencia de antígenos de inmadurez en el subgrupo con duplicación de FLT3. La presencia de varias subpoblaciones leucémicas al diagnóstico, la escasa detección de fenotipos aberrantes y la existencia de cambios inmunofenotícos y genéticos en las recaídas en los pacientes con duplicación de FLT3 dificultan el estudio de la enfermedad residual mínima mediante citometría de flujo y PCR en este subgrupo molecular.



**Análisis inmunofenotípico de los pacientes con duplicación del gen FLT3.**

De los 264 pacientes de la serie obtuvimos muestra para el análisis de la duplicación del gen FLT3 en 187. La frecuencia observada de esta lesión molecular fue del 27%. En el artículo correspondiente se describe los datos clínicos así como el patrón fenotípico de 41 de estos pacientes. En esta sección se especifica el fenotipo de cada uno de los casos analizados.

Los pacientes analizados mostraban en su mayoría varias subpoblaciones celulares de diferente estadio de diferenciación mielomonocítica. El fenotipo más frecuente de las subpoblaciones blásticas más mayoritarias fue: MPO+ (92%), CD13+(100%), CD33+ (100%), CD123+ (100%), HLA-DR+ (81%), CD15+ (67%) CD117+(69%), CD34-(64%) con una elevada expresión de antígenos relacionados con la diferenciación monocítica: CD64 (67%), CD36 (50%), CD19 (45%) y con menor frecuencia CD14 (38%), CD11b (33%), CD4 (28%) y CD56 (7%). Las diferencias más significativas con el resto de pacientes de la serie es la mayor expresión de antígenos monocíticos maduros y la menor frecuencia de antígenos de inmadurez en el subgrupo con duplicación de FLT3. En cuanto a la expresión de antígenos de línea linfóide únicamente fue positivo el CD7 en 6 casos mientras que no se detectó reactividad para el resto de los antígenos linfóide B ni T. Tampoco se detectó ningún caso con expresión de Tdt.

***Inmunofenotipo de los pacientes con duplicación del gen FLT3***

|    | CD |    |            |    |    |    |    |   |    |   |     |    |   |    |    |    |    |    |     |    | MPO<br>cit | 70A<br>cit | 3<br>cit | Tdt<br>Nuc |     |   |    |   |
|----|----|----|------------|----|----|----|----|---|----|---|-----|----|---|----|----|----|----|----|-----|----|------------|------------|----------|------------|-----|---|----|---|
|    | 34 | 15 | HLA-<br>DR | 10 | 20 | 19 | 33 | 2 | 13 | 3 | 117 | 45 | 7 | 56 | 66 | 64 | GA | 36 | 11B | 41 |            |            |          |            | 123 | 4 | 14 |   |
| 1  | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | +  | -   | -  | +          | +          | -        | +          | -   | - | -  |   |
| 2  | -  | -  | -          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | +  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 3  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +D | + | -  | -  | -  | +  | -  | +   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 4  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | +  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | +          | -          | +        | +          | -   | - | -  | - |
| 5  | +  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 6  | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | -  | + | +  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | -          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 7  | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | -  | + | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | +          | +   | - | -  | - |
| 8  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | -   | -  | + | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 9  | +  | -  | -          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | -   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | -          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 10 | -  | -  | -          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | +  | + | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 11 | +  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | -          | +          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 12 | +  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 13 | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 14 | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 15 | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 16 | -  | -  | -          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | + | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | -          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 17 | +  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 18 | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | -   | +  | - | -  | -  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | +          | +   | - | -  | - |
| 19 | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 20 | +  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | -   | - | -  | - |
| 21 | -  | -  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 22 | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | +  | +  | -  | +  | -   | -  | -          | +          | -        | +          | +   | - | -  | + |
| 23 | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | +  | - | -  | +  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | -        | -          | -   | - | -  | - |
| 24 | -  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | + | -  | -  | +  | +  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 25 | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | -   | +  | - | -  | +  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | -          | -   | - | -  | - |
| 26 | -  | -  | -          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 27 | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | +  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | +          | +   | - | -  | - |
| 28 | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | -  | + | -  | -  | +  | +  | -  | +   | +  | -          | -          | +        | +          | -   | + | -  | - |
| 29 | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | +  | +  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 30 | -  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 31 | -  | -  | -          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | -          | +        | -          | -   | + | -  | - |
| 32 | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 33 | +  | +  | +          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | + | -  | +  | +  | -  | +  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 34 | +  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | +  | +  | -  | +  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 35 | -  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | +  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 36 | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | -   | +  | - | -  | +  | +  | -  | +  | +   | -  | -          | +          | +        | +          | +   | - | -  | - |
| 37 | -  | +  | -          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 38 | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | + | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | +        | -          | +   | - | -  | - |
| 39 | -  | -  | -          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | -   | -  | + | -  | -  | +  | -  | +  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 40 | +  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 41 | +  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | - | +  | - | +   | +  | + | -  | -  | +  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |
| 42 | -  | -  | -          | -  | -  | -  | +  | - | +  | - | +   | +  | - | -  | +  | -  | -  | -  | -   | -  | -          | +          | -        | -          | +   | - | -  | - |

GA: Glicoforina A; cit: citoplasma; F: Fuerte; D: débil; Nuc: nuclear.

### V.2.2.5 Detección de dos pacientes con reordenamiento de MLL y duplicación de FLT3.

De la serie de pacientes analizada, dos presentaron simultáneamente al diagnóstico duplicación parcial en tandem del gen MLL y duplicación del gen FLT3. Las características clínicas y biológicas de estos pacientes se resumen en la siguiente tabla:

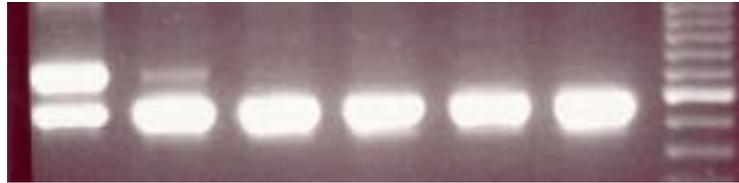
| UPN | Edad | FAB | Cifra Leucocitos X10 <sup>9</sup> /L | Cariotipo | Respuesta tratamiento inducción | TPH       | Recaída | Exitus |
|-----|------|-----|--------------------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|---------|--------|
| 6   | 39   | M5a | 199                                  | 46,XY     | RC                              | Autólogo  | no      | no     |
| 11  | 54   | M5a | 89                                   | 46,XY     | RC*                             | Alogénico | si      | si     |

RC: remisión completa; \* : tras dos ciclos de quimioterapia de inducción

El inmunofenotipo de ambos está especificado en el apartado V.2.2.3. Ambos presentaban un fenotipo mieloide con clara diferenciación monocítica. El paciente 11 mostró una población blástica más inmadura CD34+ CD117+. En este enfermo se realizó un seguimiento de la ERM y un análisis de la recaída mediante PCR y citometría de flujo. Analizamos un total de 6 muestras de MO: una procedente del diagnóstico, otra tras el primer ciclo de inducción, tras el que el paciente alcanzó una remisión parcial, 3 muestras posteriores del segundo ciclo de inducción, intensificación y post-alotrasplante, en las que el paciente se encontraba

en RC y finalmente la muestra de la recaída. En la muestra número 2 correspondiente al control post 1º ciclo de inducción pudo observarse como persistía un pequeño porcentaje de blastos con el mismo fenotipo que al diagnóstico y una banda en el análisis de PCR en la zona de la duplicación del gen FLT3 aunque mucho más débil que al diagnóstico. Mediante citometría de flujo se detectó en las tres muestras siguientes en las que el paciente estaba en RC la persistencia de una pequeña población de células con fenotipo aberrante similar al del diagnóstico: CD34+ CD19+ CD33+ CD64+ CD13+++ . En cambio el análisis por PCR de la duplicación del gen FLT3 mostró la desaparición de esta lesión molecular en estas tres muestras. A los 11 meses del diagnóstico y 5 meses post-alotrasplante el paciente presentó una recaída. El estudio inmunofenotípico mostró una población blástica más inmadura que la diagnóstico: CD34+ CD33+ CD117+ CD19+ débil, CD11b -. En cambio el análisis de la duplicación del gen FLT3 mostró un patrón germinal.

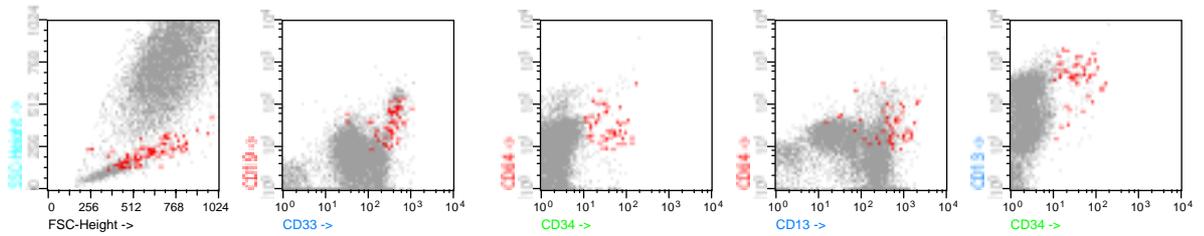
**SEGUIMIENTO DE LA ERM EN EL PACIENTE CON CODUPLICACIÓN DE MLL Y FLT3**



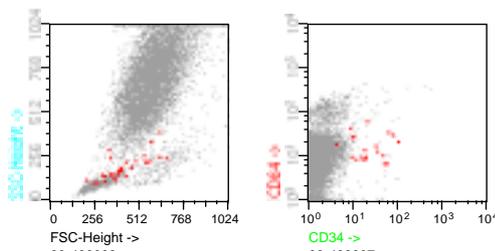
**EVOLUCIÓN DE LA DUPLICACIÓN DE FLT3 MEDIANTE PCR**

La primera muestra corresponde al diagnóstico, la segunda a la RP tras el 1º ciclo de inducción, las 3 posteriores corresponden a la post 2º ciclo de inducción, postintensificación y postrasplante y la última es de la recaída. Destaca la desaparición de la duplicación de FLT3 durante la RC morfológica y en la recaída.

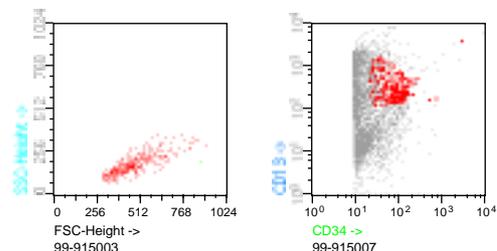
**EVOLUCIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO . CASO 11 (fenotipo al diagnóstico pag 140)**



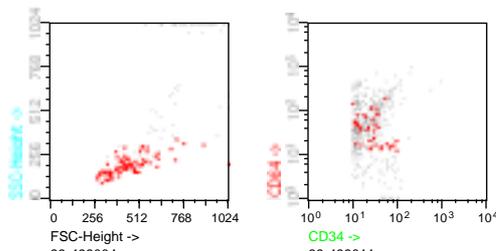
**Muestra tras 1º ciclo de inducción.** El enfermo alcanzó una RP. Presencia de un 4% de células con el mismo fenotipo aberrante que al diagnóstico: CD34+ CD64+ CD33+ CD13++



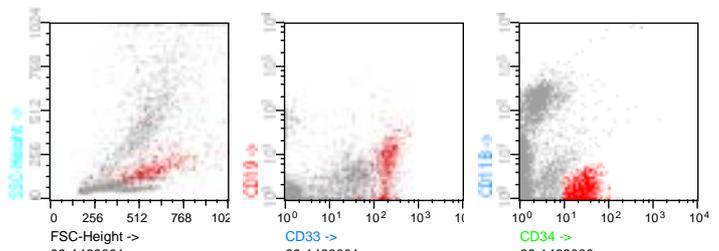
**Muestra tras 2º ciclo de inducción.** El enfermo alcanzó una RC morfológica. Persiste cociente de CD34 aberrante y 0,1% células CD34+ CD64+



**Muestra tras intensificación.** RC morfológica. Persistencia de cociente de CD34 aberrante y 0,1% células CD34+ CD13++



**Muestra tras alotrasplante.** Persiste cociente de CD34 aberrante y 0.05% células CD34+ CD64+.



**Recaída tras alotrasplante.** Se detecta un 6% de blastos con fenotipo diferente al diagnóstico: CD34+ CD19- CD11b-.



## **VI. DISCUSIÓN**



## **VI. 1. TRABAJOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS EN LA CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS**

### **Expresión del antígeno CD66 y de la cadena $\alpha$ del receptor de la IL-3 (CD123) en las leucemias agudas.**

La frecuencia en la expresión de antígenos mieloides en la LLA-B varia según las series entre el 5% y 54% y su valor pronóstico es todavía controvertido. En niños, la presencia de antígenos mieloides no parece influir en la supervivencia, sin embargo su valor pronóstico en adultos no es claro (Boldt DK, Leukemia 1994). Los antígenos mieloides más expresados en la LLA-B son el CD13 y CD33 seguidos con menor frecuencia del CD15 y CD14 y muy rara vez el CD117. En nuestro estudio detectamos una alta frecuencia de expresión de CD66 (66,7%) en los pacientes con LLA-B, muy superior a la que encontramos en los pacientes con LMA que fue solo del 6,8%. Estudios previos en niños habían demostrado una restricción de expresión de CD66c en las LLA-B CD10+ (Boccum P, Tissue Antigens 1998). Sin embargo, nosotros detectamos un caso CD10- CD66+. En nuestra serie de adultos con LLA-B la expresión de CD66 se asoció a la presencia del gen bcr-abl. Sin embargo, no podemos afirmar que esta asociación sea estadísticamente significativa dado que la serie de pacientes era muy pequeña y que además estaba sesgada, puesto que la mayoría de los casos eran referidos de otros hospitales para realizar un alotrasplante en nuestro centro y por tanto todos tenían

factores de mal pronóstico. Se necesitan estudios con un mayor número de pacientes para establecer el valor pronóstico de la positividad de CD66 en los adultos con LLA-B y su posible asociación con la presencia del gen bcr-abl.

Nuestro estudio en médulas óseas de individuos sanos no mostró coexpresión de CD66 en los precursores linfoides CD34+ CD19+. Este dato, junto con la alta frecuencia de expresión aberrante en la LLA-B hacen que este antígeno sea un buen marcador en el seguimiento de la ERM en la LLA-B.

En cuanto a la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-3, o antígeno CD123, en las LLA encontramos una clara restricción hacia las de fenotipo B. Todos los pacientes con LLA-B analizados mostraron expresión de CD123, con una intensidad superior a la expresión detectada en los blastos mieloides. Esta elevada positividad contrasta con la nula expresión de CD123 en los precursores linfoides normales detectada en nuestro análisis, así como en estudios previos (Jordan CT, Leukemia 2000).

La IL-3 es una glicoproteína que estimula la proliferación de los precursores hematopoyéticos normales a la vez que mantiene su viabilidad e inhibe su apoptosis (Blalock WL, Leukemia 1999). Este factor de crecimiento actúa a través de la activación de proteínas tirosín-quinasa. Con todo, su acción aberrante en las células leucémicas no está todavía aclarada. La alta frecuencia de expresión de CD123, encontrada en todos los pacientes con LLA-B y en la mayoría de casos de LMA, está en relación con previos estudios que sugieren un posible papel de la IL-3 en la leucemogénesis (Hapel AJ, Anticancer Res 1987; Russell NH, Blood Rev 1992; Jordan CT, Leukemia 2000).

La frecuencia de expresión del antígeno CD123 es muy elevada en la LMA. En nuestro estudio se encontró una frecuencia del 93%, similar a los datos publicados previamente en la literatura (Jordan CT, Leukemia 2000). No detectamos diferencias en cuanto a su reactividad en relación al subtipo FAB, citogenética, lesiones moleculares ni expresión de otros antígenos.

La elevada frecuencia de expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-3 en las células blásticas y su práctica ausencia en los progenitores hematopoyéticos normales apoyan también el posible papel de esta citoquina en la leucemogénesis de la LMA. Existen publicaciones que han relacionado a la IL-3 con factores de transcripción asociados a la LMA, como el AML1 o genes homebox. Estos estudios sugieren que serían necesarios dos tipos diferentes de procesos para producir una leucemia: por un lado un bloqueo en la diferenciación hematopoyética normal debido a la expresión inadecuada de ciertos genes y, por otro lado, un aumento en la proliferación e inhibición de la apoptosis de esos progenitores anormales mediado por la IL-3 (Perkins A, Proc Natl Acad Sci USA 1990). Otros análisis experimentales han demostrado la acción de esta citoquina en el crecimiento autocrino de las células leucémicas (Rusell NH, Blood Rev 1992). Todos estos estudios implican a la IL-3 en el proceso de leucemización. Esta interleuquina actúa a través de la estimulación de señales de transducción en las que están implicadas las vías de las proteínas Jak, STAT, etc (Blalock WL, Leukemia 1999). Algunos estudios no han podido demostrar fosforilización en las vías de transducción mediadas por MAPK, Akt y STAT5 en las células leucémicas

CD123+, tras la estimulación con IL-3 (Jordan CT, Leukemia 2000). Existen varias explicaciones para este hecho: una de ellas es que la sobreexpresión del antígeno CD123 en las células leucémicas sea un fenómeno aberrante pero no funcional; otra posibilidad es que la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-3 necesite la expresión de la  $\beta$  para que dicho receptor sea activo; y finalmente, puede ser que la IL-3 en las células blásticas actúe a través de otras vías de transducción diferentes a las de las proteínas JaK/STAT. Sin embargo, más recientemente Testa y col si demostraron activación de STAT5 tras la administración de IL-3 únicamente en los blastos que presentaban una expresión elevada de CD123 (Testa U, Blood 2002). En este mismo estudio se muestra como estas células con elevada expresión de la cadena  $\alpha$  de la IL-3 presentaban una alta actividad de ciclinas y un aumento de la resistencia a la apoptosis, así como una espontánea activación de señales de transducción y transcripción implicadas en la fosforilización de STAT5. Clínicamente los pacientes con elevada expresión de la cadena  $\alpha$  de la IL-3 mostraron una inferior tasa de remisión completa e inferior supervivencia que los enfermos con expresión normal de IL-3R $\alpha$  (Testa U, Blood 2002). Estos resultados sugieren que en la LMA, la IL-3R $\alpha$  tendría un papel importante en la leucemogénesis. Por tanto, son necesarios futuros estudios dirigidos a conocer mejor la función biológica del antígeno CD123 y sus mecanismos de acción aberrante en las células malignas. Si se confirmara esta funcionalidad, este antígeno sería una buena diana en la destrucción de células leucémicas, al ser sobreexpresado selectivamente en las células leucémicas de la gran mayoría de pacientes con LMA y LLA-B.

Otra utilidad de esta expresión anómala es el estudio de la ERM. La combinación de CD123 con antígenos inmaduros como el CD34 y antígenos tanto mieloides como linfoides B podría ser útil para la diferenciación de células leucémicas inmaduras de progenitores hematopoyéticos normales.

## **VI. 2 TRABAJOS SOBRE PERFIL INMUNOFENOTÍPICO Y OTRAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE LEUCEMIAS AGUDAS CON ALTERACIONES MOLECULARES ESPECÍFICAS**

### **Análisis conjunto de la ERM mediante citometría de flujo y PCR en la LLA con t (9;22)**

Las técnicas más utilizadas en la detección de la ERM son el análisis del inmunofenotipo mediante citometría de flujo y la PCR. Ambas son altamente sensibles y reproducibles, pero requieren una importante experiencia en su interpretación y ambas pueden dar lugar a falsos resultados. Una de las principales causas de falsos resultados negativos, aplicable a las dos técnicas, es la distribución no homogénea de las células leucémicas en la médula ósea durante la remisión clínica. La principal limitación de la citometría de flujo en el seguimiento de la ERM es la evolución clonal de la leucemia durante el tratamiento que puede dar lugar a cambios en el inmunofenotipo de las células blásticas, con respecto al diagnóstico. Estos cambios suelen ser pérdidas o ganancias de uno o más antígenos presentes al diagnóstico. La frecuencia de estos cambios fenotípicos es muy variable según las diferentes series y en general depende de la cantidad de combinaciones antigénicas utilizadas al diagnóstico (Van Wering ER, Leukemia 1995; Campana D, Leukemia 1999; Baer MR, Blood 2001). Otra causa de cambios fenotípicos en las recaídas es la presencia de subpoblaciones blásticas muy

minoritarias al diagnóstico, que se expanden en la recaída con el consiguiente cambio inmunofenotípico. La identificación de todas las subpoblaciones, aunque sean muy pequeñas al diagnóstico, así como la utilización de amplios paneles de AcMo puede resolver en parte este problema. En cuanto a la PCR las principales limitaciones que conllevan falsos resultados son la contaminación del ADN y la falta de pureza o escasez de cantidad de éste.

En nuestro estudio se utilizó una estrategia combinada de ambas técnicas en la detección de ERM en 10 pacientes diagnosticados de LLA-B Filadelfia +. Ambos métodos fueron útiles en la detección de células leucémicas residuales en todos los pacientes que recayeron, con una buena correlación entre ellos. Sin embargo, obtuvimos resultados discordantes en 5 muestras, en las que se detectó ERM únicamente con una de las técnicas. Los resultados negativos fueron en todos los casos falsos negativos puesto que todos los pacientes recayeron. Estos datos junto con otros de la literatura (Neale GA, Leukemia 1999) demuestran que la utilización conjunta de ambas técnicas en la monitorización de la ERM podría disminuir los falsos resultados derivados de problemas técnicos de cada una de las técnicas por separado.

Por otro lado la alta frecuencia de persistencia de células leucémicas y por consiguiente de recaídas, incluso tras el alotrasplante en este subgrupo de pacientes hace necesaria la investigación de nuevas estrategias terapéuticas como podrían ser los inhibidores de las tirosín-quinasa (Carroll M, Blood 1997).

### **Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con AML1-ETO.**

Es una de las alteraciones moleculares más frecuentes en la LMA y se asocia a una tasa alta de remisiones completas y a larga supervivencia (Dastugue N, Leukemia 1995). La frecuencia de esta lesión en nuestra serie fue del 7%, similar a la descrita en la literatura. Los pacientes con AML1-ETO de nuestro estudio mostraron una edad significativamente inferior, una cifra de blastos en MO también inferior, así como una mayor tasa de remisiones completas con el tratamiento quimioterápico de inducción, mayor supervivencia global y menor probabilidad de recaída. Estos datos, por tanto, confirman el buen pronóstico de esta alteración genética.

El fenotipo más habitual de este tipo de leucemia es CD34+ CD13+ CD33+ HLA-DR+ y con frecuencia se expresan marcadores como el CD19 y el CD56 (Kita K, Blood 1992; Porwit- McDonald A, Blood 1996; Seymour JF, Leukemia 1994). Los pacientes de nuestra serie mostraron un patrón inmunofenotípico similar al descrito: todos los casos presentaban una o varias poblaciones mieloides inmaduras CD34+ fuerte, MPO+, CD117+, HLA-DR+, CD13+, CD123+ , CD33+ , CD15+ con expresión del antígeno de inmadurez Tdt en 3 casos. Aproximadamente en la mitad de los casos, se detectó coexpresión de antígenos de diferenciación monocítica tales como el CD64, CD56, CD19 y menos habitualmente el CD14. La presencia de una población blástica mieloides inmadura, con expresión de Tdt y en algunos casos con expresión de antígenos de

diferenciación monocítica, puede hacer pensar en la presencia de la translocación (8;21), aunque este fenotipo no es único ni característico de la presencia de esta lesión genética.

Un tema que todavía está en discusión es el valor pronóstico de la expresión de CD56 en este tipo de leucemia. La molécula de adhesión N-CAM o antígeno CD56 asociada a las células natural killer y que también se expresa normalmente en tejido neural, linfocitos T y monocitos, se expresa en aproximadamente el 40% de las LMA. La presencia de CD56 en la LMA se ha relacionado con una diferenciación monocítica, lo que refleja su expresión normal en monocitos y macrófagos. En algunos estudios la positividad de CD56 en la LMA se asoció con una tendencia a mayor supervivencia (Vidriales MB, *Leukemia* 1993). En otros estudios, la presencia de esta molécula en la LMA con AML1-ETO se ha relacionado con mal pronóstico y mayor afectación extramedular (Baer MR, *Blood* 1997). En nuestro trabajo el antígeno CD56 se expresó en el 55% de los casos. En todos ellos se evidenció diferenciación monocítica, con coexpresión de CD34 y CD15 o bien por la presencia de marcadores monocíticos. Todos los casos CD56- mostraron una vía de diferenciación puramente granulocítica. No encontramos diferencias en cuanto a la supervivencia en relación con la diferente reactividad de CD56. Nuestra hipótesis es que en los pacientes con AML1-ETO existiría una subpoblación blástica CD56+ muy minoritaria y que correspondería a una población comprometida a la diferenciación monocítica. Esto podría explicar la mayor frecuencia de afectación extramedular descrita en casos con AML1-ETO y expresión de CD56. Si la presencia de este antígeno confiere o no mal pronóstico

en este subgrupo de pacientes necesita ser confirmado con estudios que engloben a un mayor número de enfermos.

### **Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11.**

Esta alteración molecular representa el 10-12% de todas las LMA y se ha asociado a buen pronóstico. Sin embargo, parece existir un subgrupo de pacientes con esta lesión genética con alta probabilidad de recaída. Algunos estudios han descrito la elevada leucocitosis y la edad avanzada como factores de mal pronóstico en este subtipo de leucemia (Martín G, Haematologica 2000; Delaunay J, Blood 2003) ). La frecuencia de pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11 en nuestro estudio fue similar a la descrita en la literatura. No encontramos diferencias en cuanto a la edad, leucocitosis, porcentaje de blastos en MO ni respuesta al tratamiento de inducción con el resto de pacientes de la serie. En cuanto a la supervivencia, los pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11 mostraron mayor supervivencia global y menor probabilidad de recaída pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados podrían ser debidos al escaso número de pacientes analizados o bien sugerirían que dentro de este grupo de leucemia existiría un subgrupo de pacientes con pronóstico desfavorable. Según nuestro estudio, solo la edad >50 años fue un factor adverso en los pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11 y se asoció a una menor supervivencia global y mayor

probabilidad de recaída con una diferencia estadísticamente significativa. En este sentido, son muy importantes los recientes estudios de ERM mediante RT-PCR cuantitativa. Bounamici y col en su estudio mostraron que los pacientes con transcritos de CBF $\beta$ /MYH-11 inferiores al 0,12% durante la remisión completa podían considerarse pacientes curados, mientras que aquellos con niveles superiores al 0,25% tenían una alta probabilidad de recaída (Bounamici S, Blood 2002). Estudios de seguimiento molecular cuantitativo con un mayor número de pacientes nos permitirán profundizar en el comportamiento biológico del gen CBF $\beta$ /MYH-11, así como definir subgrupos de enfermos con diferente pronóstico y por tanto candidatos a un tratamiento de intensificación distinto.

Otro tema de estudio de esta tesis ha sido el patrón fenotípico de esta lesión molecular. Los datos publicados hasta ahora muestran un perfil de blastos mieloides con coexpresión de antígenos monocíticos o bien presencia de subpoblaciones monocíticas con una frecuente expresión del antígeno CD2 (Hrusák O, Leukemia 2002). Nuestros resultados confirman este perfil. El fenotipo más habitual encontrado en nuestro estudio fue mieloide inmaduro con diferenciación monocítica en la mayoría de los casos, con presencia de varias subpoblaciones celulares, en general diferenciadas por la expresión de CD34 o bien por la expresión de antígenos de diferenciación de línea monocítica. En el 33% de los casos encontramos expresión de CD2, aunque en general fue una expresión muy débil o bien una expresión parcial de una de las subpoblaciones. Un dato interesante es la elevada eosinofilia detectada en estos pacientes que en el

60% de los casos fue superior al 5% y en algunos enfermos fue especialmente alta. Este patrón inmunofenotípico aunque sugestivo no es característico de la presencia de CBF $\beta$ /MYH-11 ya que es similar a los pacientes con AML-1/ETO y diferenciación monocitoide o también a los pacientes con duplicación del gen FLT3 y presencia de una población mielóide inmadura. Existen sin embargo algunas diferencias entre ellos como por ejemplo que en los casos con AML-1/ETO la población monocítica suele ser muy minoritaria, con una clara expansión de los blastos mieloides inmaduros y los antígenos monocíticos más frecuentes son el CD64 y el CD56, mientras que en los casos con CBF $\beta$ /MYH-11 las poblaciones monocíticas pueden llegar a ser importantes en cuanto a porcentaje y los antígenos de esta línea celular más frecuentes son el CD64, mientras que ningún paciente mostró positividad de CD56.

### **Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con reordenamiento del gen MLL.**

El reordenamiento de MLL es una de las lesiones moleculares más frecuentes asociada a una gran variedad de procesos hematopoyéticos malignos. Esta alteración molecular puede ser debida a deleciones, duplicaciones, inversiones, así como a translocaciones recíprocas con más de 30 partners diferentes (Rubnitz JE, Leukemia 1996). En nuestra serie de pacientes con LMA

de novo, la incidencia observada fue del 12% y al igual que lo descrito en la literatura fue más frecuente en leucemias monocíticas según la clasificación FAB o con componente monocítico por inmunofenotipo (Caligiuri MA, *Can Res* 1998; Schnitter S, *Leukemia* 2000). A este subgrupo de leucemias más inmaduras, sin componente monocítico mediante citoquímica pero si por inmunofenotipo correspondían la gran mayoría de pacientes con reordenamiento de MLL debido a duplicación parcial o en tandem. La MLL PTD fue observada inicialmente en pacientes con trisomía 11 y posteriormente se ha asociado a cariotipo normal. La frecuencia descrita en la literatura de esta lesión es muy variable, con extremos entre el 4 y 21% (Caligiuri MA, *Cancer Res* 1998; Schnittger S, *Blood* 2002). Esta amplia variabilidad puede ser debida en parte, a los criterios de selección de pacientes y al método utilizado para su diagnóstico. Consideramos que la técnica de Southern blot es el método de “screening” de elección, ya que de esta manera pueden detectarse todos los posibles reordenamientos del gen MLL (Cimino G, *Haematologia* 1998). En nuestro estudio la incidencia de MLL-PTD fue del 10%. En este subgrupo, 6 de los 9 pacientes presentaban un cariotipo normal.

Existen pocos estudios en la literatura referidos al inmunofenotipo de los pacientes con reordenamiento de MLL en la LMA, en contra de los numerosos artículos que existen en la LLA. En nuestro estudio realizamos un análisis fenotípico de los pacientes con MLL reordenado (MLL+) y lo comparamos con los pacientes MLL-. El perfil más típico fue el mielóide maduro, con una clara diferenciación monocítica. Los antígenos monocíticos más frecuentes fueron CD64, CD11b, CD56 y con menor frecuencia CD36 y CD4. A diferencia de otras

lesiones moleculares con un perfil fenotípico similar, la mayoría de pacientes con MLL+ presentaban una única población blástica y con frecuencia CD34-. Sin embargo no encontramos diferencias significativas entre este fenotipo y el de los pacientes MLL-. Probablemente esto sea una traducción de la heterogeneidad de los casos ya que están incluidos translocaciones, duplicaciones, etc.

Otro dato interesante de nuestro estudio fue la alta incidencia de fenotipos aberrantes de la serie de pacientes con MLL+. Todos los pacientes presentaron al menos un fenotipo aberrante al diagnóstico. Esto hace del inmunofenotipo una técnica útil en el estudio de la ERM en este subgrupo de pacientes, especialmente en aquellos con duplicación en tandem en los que la RT-PCR no parece ser una buena técnica para la detección de células leucémicas residuales. La detección de ERM mediante citometría de flujo en la mayoría de pacientes MLL+ en RC es un reflejo del mal pronóstico que tiene esta lesión molecular. En general el reordenamiento del gen MLL se asocia a mal pronóstico, sin embargo existen datos diferentes en cuanto a su impacto en la supervivencia en relación a los diferentes mecanismos moleculares. Estudios previos han demostrado que los pacientes con la t(9;11) presentan una supervivencia superior al resto de translocaciones de 11q23 (Mrózek K, Blood 1997). También parece existir diferencias en los resultados publicados en cuanto a la MLL-PTD. Varios grupos demostraron un valor pronóstico negativo de esta lesión molecular (Schnittger S, Leukemia 2000), sin embargo en otro estudio más reciente con una numerosa serie de enfermos, la MLL PTD se asoció únicamente a menor supervivencia libre de enfermedad, pero no demostró ser un factor independiente de mal pronóstico.

Una posible razón es que es en este último estudio se analiza también la presencia de la duplicación de FLT3 y se detecta una frecuente coexistencia de las dos alteraciones moleculares en los pacientes con cariotipo normal (Steudel C, Genes, Chromosomes Cancer 2003). En nuestro análisis, los pacientes MLL+ presentaron menor supervivencia global y mayor probabilidad de recaída que los pacientes MLL-. Y esto es especialmente interesante si se analizan los pacientes con cariotipo normal por separado. En este subgrupo de pacientes, y a pesar del pequeño número de enfermos incluidos, también mostraron menor SG los pacientes MLL+ . En estos casos obviamente el reordenamiento de MLL era debido a la duplicación parcial en tandem. Nuestros datos coinciden con previos que sugieren que dentro del grupo de pacientes con cariotipo normal la duplicación parcial de MLL está asociada a mal pronóstico (Schittger S, Leukemia 2000).

### **Análisis inmunofenotípico y características clínico-biológicas de los pacientes con duplicación del gen FLT3.**

La duplicación interna en tandem del gen FLT3 es una lesión molecular muy frecuente en la LMA y se asocia a cifra de leucocitos elevada y a menor supervivencia. Sin embargo, existen todavía controversias en cuanto a su valor pronóstico ya que otras variables parecen influir en éste como la edad y la asociación con otras alteraciones genéticas como la presencia del gen PML/RAR $\alpha$ .

Si parece estar demostrado que la duplicación de FLT3 tiene un impacto pronóstico adverso en los pacientes con LMA menores de 65 años y con cariotipo normal. Los datos de nuestro estudio así lo confirman: una elevada frecuencia de esta lesión en nuestra serie y una menor SG y SLE, así como mayor probabilidad de recaída de los pacientes con duplicación de FLT3. Especialmente interesantes son los datos de los pacientes con cariotipo normal, ya que detectamos una alta frecuencia de esta anomalía molecular en este subgrupo de pacientes, que son clasificados como de riesgo intermedio y que en nuestro estudio mostraron menor supervivencia y mayor probabilidad de recaída que los pacientes con cariotipo normal pero sin duplicación de FLT3.

Al igual que lo descrito en la literatura, los enfermos con FLT3 duplicado mostraron una cifra de leucocitos más elevada al diagnóstico. FLT3 juega un importante papel en la regulación del crecimiento y diferenciación normal de las células hematopoyéticas. Estudios *in vitro* han demostrado que la activación de FLT3 a través de la unión con su ligando (FL) da lugar a una proliferación celular e inhibición de la apoptosis en las células blásticas de la mayoría de enfermos con LMA al parecer a través de la vía JAK-STAT (Lisovsky M, Blood 1996; Kiyoi H, Oncogene 2002). La mutación de FLT3 parece producir una activación en el dominio tirosín-quinasa de su receptor con el consecuente aumento de su acción proliferativa. Esto podría explicar la elevada leucocitosis que presentan los pacientes con FLT3 duplicado (Dehmel U, Leukemia 1996).

El perfil inmunofenotípico de los pacientes con FLT3 duplicado de nuestra serie fue mieloide con una clara diferenciación monocítica madura, con

una elevada expresión de antígenos mieloides como del CD13, CD33, MPO y monocíticos maduros como el CD64 y CD36. En cambio, antígenos de inmadurez como el CD34 solo se expresó en el 36% de los casos y la Tdt únicamente fue positiva en un caso. Aunque encontramos diferencias significativas en la expresión de algunos de estos antígenos entre los pacientes con y sin la duplicación, no detectamos un perfil inmunofenotípico único y específico de los pacientes con esta lesión molecular. Este dato apoyaría la hipótesis de que la mutación de FLT3 no sería una lesión genética específica como lo pueden ser PML/RAR $\alpha$  o BCR/ABL que se asocian a un fenotipo específico, si no que se trataría de una anomalía molecular relacionada con la progresión leucémica. La asociación de mutación de FLT3 con otras lesiones genéticas no es infrecuente. En nuestra serie detectamos varios casos de reordenamiento de MLL y FLT3 duplicado, al igual que reordenamiento de CBF $\beta$ /MYH-11 y FLT3 duplicado. La inactivación del factor de unión al core junto con una activación de un receptor tirosín-quinasa es una asociación molecular común en los mecanismos de la leucemogénesis.

En nuestro estudio detectamos una elevada frecuencia de cambios tanto fenotípicos como genotípicos entre el diagnóstico y la recaída en los pacientes con FLT3 duplicado. Esto podría ser consecuencia de una elevada inestabilidad genética en estos pacientes, a la vez que apoya la idea de que se trataría de una lesión molecular relacionada con la evolución y progresión de la leucemia. Este hecho además pone de manifiesto la dificultad en el seguimiento de ERM en estos enfermos. En estos casos el inmunofenotipo parece ser la técnica de elección ya

que la duplicación detectada por RT-PCR desaparece en la recaída en numerosos pacientes. La detección de células leucémicas residuales mediante citometría de flujo también está dificultada por la presencia de diferentes subpoblaciones blásticas en estos enfermos al diagnóstico y los frecuentes cambios fenotípicos en las recaídas como demuestran nuestros datos.

Por tanto la duplicación de FLT3 es una lesión frecuente y asociada a mal pronóstico en la LMA, incluido el subgrupo de pacientes con cariotipo normal. La acción de esta mutación a través de receptores tirosín-quinasa ofrece nuevas perspectivas de tratamiento en estos pacientes basadas en inhibidores selectivos de estos receptores. Es necesario profundizar en el estudio de la variabilidad genética de esta lesión durante la progresión de la enfermedad, así como en su asociación con otras alteraciones moleculares, para conocer mejor su papel en la leucemogénesis.

### **Coexistencia de dobles alteraciones genéticas: coduplicación de MLL y FLT3 y presencia de CBF $\beta$ /MYH-11 y FLT3/ITD.**

La existencia de dos lesiones moleculares coincidentes al diagnóstico en un mismo caso de LMA no es infrecuente. Existe un modelo de leucemogénesis de la LMA que se basa en la interacción de al menos dos tipos de alteraciones moleculares: 1) las mutaciones de clase I que conferirían una ventaja proliferativa y de supervivencia a los precursores mieloides pero sin acción en la diferenciación,

como las alteraciones en la activación de proteínas tirosín-quinasa: FLT3, c-kit, bcr-abl, ras, etc y 2) las mutaciones de clase II son aquellas que producen un bloqueo en la diferenciación mieloide normal y en este grupo se encuentran diferentes reordenamientos o mutaciones que engloban a CBF: AML1-ETO, CBF $\beta$ /MYH-11, AML1, así como los reordenamientos del gen MLL. Según este modelo es necesaria al menos la cooperación de mutaciones de clase I y de clase II para que se desarrolle el proceso leucémico (Gilliand DG, Curr Opin Hematol 2001).

La duplicación de FLT3 se asocia con frecuencia, con otras alteraciones moleculares. Entre ellas destaca el reordenamiento de PML/RAR $\alpha$ . FLT3/ITD se detecta hasta en el 38% de los pacientes con este reordenamiento. Sin embargo la presencia de esta alteración en este subgrupo no parece influir en el pronóstico de los enfermos con t(15;17) (Kainz B, Haematol J 2002).

Otra asociación, aunque menos frecuente, es la duplicación de los genes FLT3 y MLL. En una amplia serie de enfermos con LMA se detectaron ambas duplicaciones en el 1,7% de los pacientes y esta asociación fue superior en los pacientes con cariotipo normal (Steudel C, Genes Chromosomes Cancer 2003). La coexistencia de mutación de FLT3 con otras alteraciones moleculares es mucho menos frecuente. Se han publicado algunos casos en pacientes con CBF $\beta$ /MYH-11 y todavía más esporádicamente con AML1/ETO. El número de enfermos con estas asociaciones moleculares es muy pequeño por lo que el factor pronóstico de estas coexistencias no está todavía aclarado (Kottardi P, Blood 2001).

En nuestra serie se detectaron dos casos de coduplicación de FLT3 y MLL y dos casos de CBF $\beta$ /MYH-11 y FLT3/ITD, mientras que no se encontró ningún paciente con AML1/ETO y presencia de otra alteración molecular. Los dos pacientes con coduplicación de FLT3 y MLL presentaban una leucemia monocítica con cariotipo normal y un fenotipo mieloide con diferenciación monocítica. La asociación de duplicación de FLT3 en los enfermos con duplicación de MLL parece conferirles peor pronóstico, aunque no existen estudios con series numerosas de pacientes para poder afirmarlo con seguridad. En nuestro análisis, uno de los enfermos fue exitus por recaída a los 5 meses de un alotrasplante, mientras que el otro permanece vivo en RC tras 3 años de un autotrasplante. En cuanto a la asociación de FLT3/ITD y CBF $\beta$ /MYH-11, sólo existen algunos casos aislados publicados, por lo que no se puede extraer ninguna conclusión en cuanto al pronóstico de estos enfermos. En nuestra serie los dos pacientes presentaban la inv (16) como única anomalía citogenética y mostraban un fenotipo mieloide con expresión fuerte de CD34 y presencia de componente monocítico. Uno de los pacientes murió durante el tratamiento de inducción como complicación de éste, mientras que el otro permanece en RC a los 4 meses del diagnóstico.

Aunque los mecanismos por los que se producen estas alteraciones moleculares son diferentes su asociación sugiere que en estos enfermos existiría de base una inestabilidad genética como consecuencia de errores en la reparación del ADN. Se necesitan estudios con mayor número de pacientes para entender mejor

el mecanismo de estas lesiones genéticas múltiples así como su implicación pronóstica.

## **VII. CONCLUSIONES**



***Trabajos sobre la expresión CD66 y CD123 en la caracterización de las leucemias agudas.***

1- El antígeno CD66 se expresa con elevada frecuencia en las LLA-B, mientras que es poco frecuente en las LMA. El antígeno CD123 se expresa en la mayoría de los pacientes con leucemia aguda, en la LLA su reactividad se restringe a las leucemias de fenotipo B y es positivo en el 93% de las LMA. La nula expresión de CD123 y CD66 en los progenitores linfoides normales y la débil positividad en los mieloides más inmaduros de CD123, convierten la coexpresión de estos antígenos con CD34 y antígenos de línea linfóide o mielóide en fenotipos aberrantes útiles en la detección de ERM.

***Trabajos sobre características clínico-biológicas y análisis del perfil inmunofenotipo en leucemias agudas con lesiones moleculares específicas.***

2- En los pacientes con LLA Ph+ en RC el análisis de la persistencia de células leucémicas mediante CF y PCR muestra una elevada correlación entre las dos técnicas, y la utilización conjunta de ambas disminuye los falsos resultados que cada una de ellas pueden tener por separado.

3- La frecuencia del gen AML1/ETO es del 7% y se asocia significativamente a edad joven, menor infiltración blástica en médula ósea y buen pronóstico. El inmunofenotipo más característico presenta una o varias poblaciones blásticas

mieloides inmaduras con expresión en todos los casos de CD34, MPO, CD117, CD13 y CD123 y muy habitualmente CD33 y CD15. La Tdt es positiva en el 18% de los pacientes. Algunos casos coexpresan antígenos de diferenciación monocítica y no se ha detectado expresión de antígenos linfoides en ningún caso. El antígeno CD56 se expresa en el 37% de la serie y se asocia a diferenciación monocítica.

4- La frecuencia del gen CBF $\beta$ /MYH-11 es del 8,3%, sin que existan diferencias en cuanto a la edad, cifra de leucocitos al diagnóstico, infiltración blástica ni respuesta al tratamiento. Estos enfermos muestran una tendencia a mayor supervivencia global y menor probabilidad de recaída, pero sin diferencia estadística. La edad superior a 50 años es un factor adverso en este subgrupo. El fenotipo característico es mielocito inmaduro con elevada frecuencia de marcadores monocíticos. Todos los pacientes muestran positividad de CD34, CD13, CD123, MPO y con elevada frecuencia: CD117, CD15, CD33, así como antígenos monocíticos especialmente CD64. El antígeno CD56 es negativo en todos los pacientes y en el 33% de los casos se detecta expresión de CD2 como único marcador linfocítico.

5- La frecuencia de reordenamiento del gen MLL es del 12% y la de duplicación parcial en tandem es del 8%. Esta lesión molecular se asocia a mal pronóstico, incluido en pacientes con cariotipo normal. El patrón fenotípico es mielocito maduro con diferenciación monocítica. Todos los casos muestran expresión de CD123 y con elevada frecuencia CD13 y CD33, mientras que los antígenos más

inmaduros como CD34 y CD117 solo se expresan en el 57% de los casos y la MPO solo es positiva en el 50%. Todos los casos presentan expresión de antígenos monocíticos, el más frecuente el CD64 seguido del CD11b y CD56. La coexpresión de antígenos linfoides es poco habitual.

6- La duplicación del gen FLT3 es la alteración molecular más frecuente de la serie, presente en el 27% de los pacientes. Este subgrupo presenta significativamente una morfología monocítica, mayor leucocitosis al diagnóstico y cariotipo normal, junto con menor supervivencia y mayor probabilidad de recaída, incluidos los pacientes con cariotipo normal. El fenotipo típico es mielóide maduro con diferenciación monocítica. Todos los casos muestran expresión de CD13, CD33, CD123, y con frecuencia MPO y HLA-DR. Las diferencias más significativas con el resto de pacientes de la serie es la mayor expresión de antígenos monocíticos maduros, sobretodo CD64 y CD36 y la menor frecuencia de antígenos de inmadurez como CD34 y CD117 en el subgrupo con duplicación de FLT3. La coexpresión de antígenos linfoides es muy poco frecuente.

7- Los pacientes con duplicación de FLT3 muestran frecuentes cambios fenotípicos y genotípicos en las recaídas. Esto dificulta el seguimiento de la ERM, tanto por PCR como por citometría de flujo, debido al alto riesgo de falsos resultados negativos.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abshire TC, Buchanan GR, Jackson JF, Shuster JJ, Brock B, Head D, Behm F, Crist WM, Link M, Boeowitz M. Morphologic, immunophenotypic and cytogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnostic and relapse: a Pediatric Oncology Group Study. *Leukemia* 1992; 6: 357-362.
- Adriaansen HJ, Jacobs BC, Kappers-Klunne MC, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Detection of residual disease in AML patients by use of double Immunologic marker for terminal deoxynucleotidyl transferase and myeloid markers. *Leukemia* 1993, 7:472-481.
- Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 1998; 394, 744-751.
- Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt B, Pinkus GS, Scholssman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 1984; 63: 1424-1433.
- Andrews RG, Torok-Storb B, Bernstein ID. Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Leukemia* 1992; 6, 10: 993-1000.
- Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sule N, Mrozek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 2001; 97: 3574-80.

- Baer MR, Stewart C, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield C. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration in acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22;q22). *Blood* 1997; 9: 1643- 1648.
- Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewiko B, Swartzendruber DE, Gohde W, Andreef M, Freirech E. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983; 43: 3982-97.
- Barr Ig, Toh BH. Routine flow cytometric diagnostic of lymphoproliferative disorders. *J Clin Immunol* 1983; 3; 184-195.
- Bauer KD, Duque RE, Shnkey TV. *Clinical Flow Cytometry. Principles and applications.* Williams and Wilkins, Baltimore, 1992.
- Beaupre DM, Kurzrock R. RAS and leukemia: From basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1071-1080.
- Beishuizen A, Verhoeven MA, Hahlen K, Van Wering ER, van Dongen JJ: Differences in immunoglobulin heavy chain gene rearrangement patterns between bone marrow and blood samples in childhood precursor B-acute lymphoblastic leukemia at diagnosis (corrected and republished article with original paging, article originally printed in *Leukemia* 1993 Jun, 7(6): 60-3). *Leukemia* 1993;7:60-63.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB European Group for the immunological classification of acute leukemias: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1783-1790.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981; 47: 553-61.
- Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, Pannunzio A, Gadner H, Schrappe M, Kamps WA, Bartram CR, Van Dongen JJ, Panzer-Grumayer ER. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control of the international BFM study group. *Leukemia* 2002, 11: 1939-1943.
- Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, Hoyle PE, Wang X-Y, Algate PA, Franklin RA, Oberhaus SM, Steelman LS, McCubrey JA: Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia* 1999; 13: 1109, 1999.
- Bloomfield CD, De la Chapelle A: Chromosome abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia: Clinical and biologic significance. *Semin Oncol* 1987; 14: 372.
- Boccum P, Di Noto F, Lo Pardo C, Villa MR, Ferrara F, Rotoli B, Del Vecchio L. CD66c antigen expression is myeloid restricted in normal bone marrow but is a common feature of CD10+ early-B- cell malignancies. *Tissue Antigens*, 1998; 52: 1-8.

- Borowitz MJ, Rubnitz J, Nash M, Pullen DJ, Cemitta B. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 1998; 12: 1764-1770.
- Boldt DK, Kopecky KJ, Head D, Gehly G, Radich JP, Appelbaum FR. Expression of myeloid antigens by blast cells in acute lymphoblastic leukemia of adults. The Southwest Oncology Group Experience. *Leukemia* 1994; 12: 2118-2126.
- Bradstock KF, Papageourgion ES, Janossy G, Hoffbrand AV, Willoughby ML, Roberts RD, Bollum FJ: Detection of leukemic lymphoblasts in CSF by immunofluorescence for terminal transferase. *Lancet* 1980; 1: 1144.
- Brendel C, Neubauer A. Characteristics and analysis of normal and leukemic stem cell: current concepts and future directions. *Leukemia* 2000; 14: 1711-1717.
- Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Ruggieri L, Li ZH, Lyman SD. Flt3 ligand stimulates/coestimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 1995; 23: 1121- 1127.
- Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, Montefusco V, Visani G, Bonifazi F, Amabile M, Terragna C, Ruggeri D, Piccaluga P, Isidori A, Malagola M, Baccarani M, Tura S, Martinelli G. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv (16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002; 99: 443-449
- Burchert A, Notter M, Menssen H, Schwartz S, Knauf W, Neubauer A, Thiel E. CD82 (KAI1), a member of the tetraspan family, is expressed on the early haemopoietic progenitor cells and up-regulated in distinct human leukaemias. *Br J Haematol* 1999; 107:494-504.

- Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrózek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AM, Rao PN, Herzig GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield C. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res* 1998; 58: 55-59.
- Campana D, Ching-Hon Pui. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 6: 1416-1434.
- Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38: 139-152.
- Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Budhdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland D, Drunker B. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 1997; 90: 4947-52.
- Chen Z, Tong JH, Dong S, et al. Retinoic acid regulatory pathways, chromosome translocations, and acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15: 147-156.
- Cimino G, Rapanotti MC, Sprovieri T, Elia L. ALL1 gene alteration in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologia* 1998; 83: 350-357.
- Cline MJ. *The white cell*. Cambridge, (mass) Harvard University Press, 1975.
- Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennet JM, Bloomfield CD, Brunning R, Gale RP, Grever MR, Keating MJ, Sawitsky A, Stass S, Weinstein H, Woods WG. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on

definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 813-819.

- Chim CS, Tam CY, Liang R, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 genes in adult acute leukemia: lack of prognostic significance. *Cancer* 2001; 91: 2222-9.

- Coustan-Smith E, Behm G, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; 351; 550-554.

- Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M, Bernard P, Lerdoux D, Huguet-Rigal F, Stopa A-M, Marit G, Molina L, Michaller M, Maraninchi D, Attal M, Reiffers J. Prognostic significance of karyotype in the novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 1491-1498.

- Deininger MW, Goldman JM, Lydon N et al: The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 1997; 90: 3691.

- Delaunay J, Vey N, Lejanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F, Lamy T, Auvrignon A, Blaise D, Pigneux A, Mugneret F, Bastard C, Dastugue N, Van Den Akker J, Reiffers J, Casteigne S, Leverger G, Harousseau JL, Dombret H. Prognosis of inv (16)/y(16;16) acute leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML intergroup. *Blood*, 2003 102; 462-9

- De Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG. CD34+AC133+ isolated cells from cord blood are highly enriched in long-term

culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic progenitors. *Stem Cells* 1998; 16: 387-396.

- Dehmel U, Zaborski M, Meierhoff G, Rosnet O, Ludwing WD, Quentmeier H, et al. Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. I. Proliferative response of myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1996; 10: 261-270.

- Di Martino J, Cleary ML. MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *British J Haematol* 1999; 106:614-626.

- Downing JR, Head DR, Curcio-Brent MG, et al. An AML/ETO fusion transcript is consistently detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute myelogenous leukemia containing the (8;21) (q22;q22) translocation. *Blood* 1993; 81: 2860-2865.

- Drach J, Leahy J, Goodacre A, Drach D, Sanchez-Williams G, Weier HU, Pinkel D, Andreef M. Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes: Molecular cytogenetics predict clinical relapse. *Blood* 1994 (manuscrito en revisión).

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

- Drexler HG, Meyer C, Quentmeier H. Effects of FLT3 ligand and proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leukemia Lymphoma* 1999; 33: 83-91.

- Drexler HG, Thiel E, Ludwong WD. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1991, 5: 637-645.

- Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, Fritsch G, Gadner H, Austrian-Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood* 2002, 99 (6) 1952-1958.
- Estey EH. Prognostic factors in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 670-672.
- Edelman P, Vinci G, Villeval JL, Vainchenker W, Henri A, Miglierina R, et al. A monoclonal antibody against erythrocyte ontogenic antigen identifies fetal and adult erythroid progenitors. *Blood* 1986; 67: 56-63.
- Faderl S, Albitar M. Insights into the biologic and molecular abnormalities in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2000, 14: 1267-87.
- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M et al: Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; 94: 696-705.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999, 341: 164-171.
- Fenaux P, Preudhomme C, Laö JL, Morel P, Beuscart R, Bauters F. Cytogenetics and their prognostic value in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 286 cases. *BJ Haematology* 1989, 76: 61-67.
- Fenrick W, Amann JM, Lutterbach B et al. Both TEL and AML1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6566-6575.
- Friedman AD. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia* 1999; 13: 1932-1942.

- Friedman A. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2002; 21, 3377-3390.
- Georgopolous K, Bigby M, Wang JH et al. The Ikfaro gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994; 79, 143-156.
- Gilliland DG. Hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2001; 8:189-1991.
- Givan AL. Flow cytometry. First Principles. Wiley-Liss, New York, 1992.
- Goldman JM, Hughes T. Detection and significance of minimal residual disease in patients with leukaemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 66.
- Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nature Med* 1997; 3: 1337-1345.
- Greaves MF, Chan LC, Furley AJW, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 1986; 67: 1-11.
- Gunji Y, Nakamura M, Ossawa H, Nagayoshi K, Nakauchi H, Miura Y, Yanagisawa M, Suda T. Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KIT<sup>low</sup> cells than in KIT<sup>high</sup> cells. *Blood* 1993; 82: 3286-3289.
- Hapel AJ, Young IG. Abnormal expression of interleukine-3 and leukemia. *Anticancer Res*, 1987; 7: 661-7.
- Henderson E, Lister A, Greaves M. *Leukemia*. Philadelphia, Elsevier Science 2002.

- Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl v, Voliotis D. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells (letter). *Blood* 1999; 93: 1435-1437.
- Hrusák O, Porwit-MacDonald. Antigen expression pattern reflection genotype of acute leukemias. *Leukemia*, 2002; 16: 1233-1258.
- Humeau L, Bardin F, Maroc C, Alario T, Galindo R, Mannoni P, Chabannon C. Phenotypic, molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells. *Blood* 1996; 87: 949-955.
- Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, Kerp JE, Borowitz MJ, Pullen DJ, Civin CI. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1988; 72: 299-307.
- Iravani M, Dhat R, Price CM, Methylation of the multi tumor suppressor gene-2 (MTS2, CDKN1, p15INK4B) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogen* 1997; 69: 2609-2615.
- Ito C, Kumagai M, Manabe A et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: A distinct biological entity with a market propensity to undergo apoptosis. *Blood* 1999; 93: 315-323..
- Jackson JF, Boyett J, Pullen J et al. Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphoblastic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer* 1990, 66: 1183-1190.
- Johansson B, Moorman AV, Haas OA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S, Secker-Walker LM. Hematologic malignancies with t(4;11) (q21;q23) a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. *Leukemia* 1998; 12: 779-787.

- Jordan CT, Upchurch D, Szlivassy SJ, Guzmán ML, Howard DS, Pettigrew AL, Meyerrise T, Rossi R, Grimes B, Rizzieri DA, Luger SM, Philips GL. The interleukine-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000; 14: 1777-1784.
- Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwaringer I, Sperr W, Le T, Weltermann A, Fontsh C, Haas OA, Mannhalter C, Lechner K, Jaeger U. Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17) or inv (16). *Haematol J*, 2002; 6: 283-289.
- Kaspers GJ, Smets LA, pieters R et al: Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: Results of an in vitro study. *Blood* 1995; 85: 751-760.
- Kita K, Nakase K, Miwa H, Masuya M, Nishii K, Morita N, Takakura N, Otsuji A, Shirakawa S, Ueda T, Nasu K, Kyo T, Dohy H, Kamada N. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21) (q22;q22) chromosomal abnormality: Frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood* 1992; 80: 470-477.
- Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 2002; 21:2555-2563.
- Kollet O, Aviram R, Chebath J, Ben-Hur, Naglere A, Shutz L, Revel M, Lapidot T. The soluble interleukine-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein enhances in vitro

maintenance and proliferation of human CD34+ CD38-/low cells capable of repopulating severe combined immunodeficiency mice. *Blood* 1999; 94: 923-931.

- Kottaridis P, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Buernett A, 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.

- Lisovsky M, Estrov X, Zhang X, Consoli U, Sanchez-Williams G, Snell V, et al. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 1996; 88: 3987-3997.

- Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood* 1987; 69:255-263.

- Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70: 1316-1321.

- Lubbert M, Mirro J, Miller CW et al: N-Ras gene point mutations in childhood acute lymphocytic leukemia correlates with a poor prognosis. *Blood* 1990; 75:1163-1171.

- Lucio P, Pareira A, van der Beemd MWM, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfaao A, Janossy G, van Dongen JJM, San Miguel JF. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13: 419-427.

- Lisovsky M, Estrov X, Zhang X, Consoli U, Sanchez-Williams G, Snell V, Munker R, Goodacre A, Savchenko V, Andreeff M. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 1996; 88: 3987-3997.
- Lyman SD, James L, Vanden Bos T, De Vries P, Brasel K, Gliniak B, Hollingsworth LT, Picha KS, McKenna HJ, Splett RR, Fletcher FA, Maraskovsky E, Farrar T, Foxworth D, Williams DE, Beckmann MP. Molecular cloning of a ligand for the flt3/fltk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1993; 75: 1157-1167.
- Macedo, A, Orfao A, Ciudad J, San Miguel J. Caracterización fenotípica de la diferenciación mieloide normal. *Sangre* 1994; 39, 277-282.
- Macedo A, Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Martinez A, Landolfi C, Cañizo C, San Miguel JF. *Leukemia* 1995; 9: 1896-1901.
- Macedo A, Orfao A, González M, Vidriales MB, López-Berges MC, Martínez A, San Miguel JF. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloid leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease. *Leukemia* 1995; 9: 993-998.
- Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, López-Berges MC, Valverde B, González M, Caballero MD, Ramos F, Martínez M, Fernández-Calvo J, Martínez A, San Miguel JF. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol*; 1995, 70: 189-194.
- Martin G, Barragan E, Bolufer P, Chillon C, Garcia-Sanz R, Gomez T, Brunet S,

Gonzalez M, Sanz MA. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica* 2000 Jul;85(7):699-703

- Martinez A, San Miguel JF, Vidriales MB, Ciudad J, Caballero MD, López-Berges MC, Moro MJ, Calmuntia MJ, Ortega F, Orfao A. An abnormal CD34+ myeloid /CD34+ lymphoid ratio at the end of chemotherapy predicts relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Cytometry* 1999; 38:70-75.

- Meyers S, Lenny N, Hiebert SW. The t(8;21) fusion protein interferes with AML1B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1974-1982.

- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 1996; 15, 5647-5658.

- Meierhoff G, Dehmel U, Gruss H-J, Rosnet O, Birnbaum D, Quentmeier H, Dirks W, Drexler HG. Expression for FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995; 9: 1368-1372.

- Metcalf D: Technique for the scoring and analysis of clonal hemopoietic cultures, in *The Hemopoietic Colony Stimulating Factors*. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier, 1984, p149.

- Mitelman F, Heim S. Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Genes Chromosom Cancer*, 1992: 5, 57-65.

- Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru P, Rao K, Strout M, Hutchinson R, Moore J, Mayer R, Schiffer C, Bloomfield C. Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9;11) (p22;q23) have superior outcome to

patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia Group B study. *Blood* 1997;11 : 4532-4538.

- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kanebo H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 19: 1911-1918.

- Neale GA, Coustan-Smith E, Pan Q, Chen X, Gruhn B, Stow P, Behm FG, Pui CH, Campana D. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1999;13:1221-1226.

- Nucifora G, Larson RA, Rowley J. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* 1993; 82: 712-715.

- Orfao A, Chillón MC, Bortoluci AM, López-Berges MC, García-Sanz R, Gonzalez M, Taberero MD, García-Marcos MA, Rasillo AI, Hernández-Rivas J, San Miguel JF. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML/RAR $\alpha$  gene rearrangements. *Haematologica* 1999; 84: 405-412.

- Orfao A, Ruiz-Argüelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: its applications to Haematology. *Haematologica* 1995;80:69-81.

- O'Riordan M, Grosschedl R. Coordinate regulation of B-cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 1999; 11, 21-31.

- Perkins A, Kongsuwan K, Visvader J, Adams JM, Cory S: Homebox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 8398- 402.
- Porwit- McDonald A. Janossy G. Ivory K. Swirsky D. Peters R. Wheatley K. WalkerH. Turker A. Goldtone AH. Buernett A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2. Blood 1996; 87: 1162- 1170.
- Preti A, Huh YO, O'Brien SM et al: Myeloid markers in adult acute lymphocytic leukemia. Cancer 1995, 76: 1564-1572.
- Pui L, Liu J, Gish G et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signaling pathway. EMBO J, 1994: 13: 764-770.
- Quesenberry P, Levitt L. Haematopoietic stem cells (first of three parts). New Engl J Med 1979; 301: 755-760.
- Quesenberry P, Levitt L. Haematopoietic stem cells (second of three parts). New Engl J Med 1979; 301:819- 823.
- Quesenberry P, Levitt L. Haematopoietic stem cells (third of three parts). New Engl J Med 1979; 301: 868-872.
- Román-Gómez J, Castillejo JA, Jimenez A, González MG, Moreno F, Rodríguez MC, Barrios M, Maldonado J, Torres A. 5' CpG islands hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21<sup>CIP1/WAF1/SDI1</sup> gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002, 89: 2291-2297.
- Rombouts WJC, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. Leukemia 2000; 14: 675-683.

- Ross CW, Stoolman LM, Schnitzer B, Schlegelmilch JA, Hanson CA. Immunophenotypic aberrancy in adult acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 590-599.
- Rowley JD. Rearrangements involving chromosome band 11q23 in acute leukemia. *Semin Cancer* 1993;4: 377-385.
- Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 4-82.
- Russell NH. Autocrine growth factors and leukemic haemopoiesis. *Blood Rev* 1992; 6: 149-56.
- Ryan DH, Van Dongen JJM: Detection of residual disease in acute leukemia using immunological markers, in Bennett JM, Foon KA (eds):*Immunologic Approaches to the Classification and Management of Lymphomas and Leukemias*. Norwell, MA, Kluwer Academic, 1988,p 173.
- San Miguel JF, Martínez A, Macedo A, Vidriales MB, López-Berges C, González M, Caballero D, García-Marcos MA, Ramos F, Fernández-Calvo J, Calmuntia MJ, Diaz-Mediavilla, Orfao A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997; 90: 2465-2470.
- San Miguel, JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Cañizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Perez JJ, Gonzalez 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: 1746-1451.

- Sato N, Caux C, Kitamura T, Watanabe Y, Arai K, Benchereau J, Miyajima A. Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood* 1993; 82:752-761.
- Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of Cd34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999; 94: 2548-2554.
- Seiffert M, Cant C, Chen Z, Rappold I, Brugger W, Kanz L, Beown EJ, Ullrich A, HHJ Bh. Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. *Blood* 1999; 94: 3633-3643.
- Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Büchener T, Wörmann B, Hiddermann W, Griesinger F. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavourable subset of AML. *Leukemia* 2000, 14: 796-804.
- Schnittge S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddermann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlations to cytogenetics, FAB subtype and prognosis inhte AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59- 66.
- Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J et al. Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukemia on MRC trial UKALL XA. *Be J Haematol* 1997; 96: 601-610.
- Seymour JF, Pierce SA,. Kantarkjian HM et al. Investigation of karyotypic, morphologic and clinical features in patients with acute myeloid leukemia blast

cells expressing the neural cell adhesion molecule (CD56). *Leukemia* 1994; 8: 823-826.with t(8;21). *Blood* 1996; 87: 1162- 1170.

- Shapiro HM. *Practical Flow cytometry*. New York: Wiley-Liss, 1988.

- Shurtleff SA, Bujis A, Behm FG et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, 1995; 9: 1985-1992.

- Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, Greaves MF. Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation. *Blood* 1982; 60, 3: 703-713.

- Sievers EI, Lange BJ, Buckley JD, Smith FO, Wells DA, Daigneault-Creech CA, Shults KE, Bernstein JD, Loken MR. Prediction of relapse of pediatric acute myeloid leukemia by use of multidimensional flow cytometry. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1483-1488.

- Sobol RE, Mick R, Royston I, LeBien TW et al: Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1987, 316: 1111- 1120.

- Sogo S, Inaba M, Ogata H, Hishida H, Adachi Y, Mori S, Toki J, Yamanishi K, Kanzaki H, Adachi M, Ikehara S. Induction of c-kit molecules on human CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>low</sup> cells: evidence for CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>low</sup> cells as primitive hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 1997;15:420-429.

- Steudel C, Wermke M, Schaich M, Schakel U, Illmer T, Ehnnger G, Thiede C. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37 : 237-251.

- Swansbury GJ, Slater R, Bain BJ, Moorman AV, Secker-Walker LM on behalf of the European 11q23 Workshop participants. Hematological malignancies with t(9;11) (p21-22;q23) – a laboratory and clinical study of 125 cases. *Leukemia* 1998; 12: 792-800.
- Tabertero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, López-Berges MC, Rasillo A, García-Sanz R, Sayagués JM, González M, San Miguel JF, Orfao A. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression that can be used to screen for this translocation. *Leukemia* 2001; 15, 406-414.
- Takahashi Y, horibe K, Kiyoi H et al. Prognostic significance of TEL/AML1 fusion transcript in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 190-201.
- Terstappen LWMM, Loken MR. Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. *Cytometry* 1988; 9: 548-556.
- Terstappen LWMM, Shah VO, Civin CI, Hurwitz CA, Loken MR. Multidimensional flow cytometry as a new approach for discrimination between normal and leukemic cells in peripheral blood and bone marrow. In: *Progress in Cytometry*. Erebodegem: Beckton Dickinson 1989; 4-29.
- Terstappen L, Loken MR. Myeloid differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multidimensional flow cytometry. *An Cel Pathol* 1990; 2: 229-240.
- Terstappen LWMM, Huang S, Saford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991; 77: 1218-1227.

- Terstappen LWMM, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III: Neutrophil maturation. *Leukemia* 1990; 657-663.
- Testa U, Riccionin R, Militi S, et al. Elevated expression of IL-3R $\alpha$  in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood* 2002; 100:2980-2988.
- Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, Morgan G, Lucas GS, Liu Yin JA. *Blood* 2002; 95: 815-819.
- Traganos F. Flow Cytometry: Principles and applications. *Cancer Invest* 1984; 2:239-258.
- Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 1996; 88: 3383-3390.
- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-212.
- Van Dilla MAS, Dean PN, Laerum OD, et al. *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis*. Orlando, Fla: Academic Press, Inc, 1985.
- Van Dongen JJM, Wolvers-Tettero ILM: Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991; 198:1.
- Van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ETJM, Van der Linden-Schrever BEM, Verhoeven MAJ, Hählen K, Hooijikaas H, Van Dongen JJM. Immunofenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995,; 9: 1523-1533.

- Watson JV. Introduction to flow cytometry, Cambridge University Press.  
Cambridge, 1991.