

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología 3102

Estudio de la evolución clonal en leucemia mieloblástica aguda *NPM1* positiva mediante separación celular por citometría de flujo

TESIS DOCTORAL

Beatriz Martín Herreros

Valencia, noviembre 2024

Directores:

Dr. Pau Montesinos Fernández

Dra. Amparo Sempere Talens

Dra. Lourdes Cordón Gallego

Tutora académica:

Dra. María Teresa Donato Martín

PAU MONTESINOS FERNÁNDEZ, Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Barcelona y Profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universitat de València

AMPARO SEMPERE TALENS, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universitat de València y Jefa de Sección de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

LOURDES CORDÓN GALLEGO, Doctora en Biología por la Universitat de València e Investigadora en el Grupo de Hematología del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia

INFORMAN

Que la tesis doctoral titulada: “**Estudio de la evolución clonal en leucemia mieloblástica aguda *NPM1* positiva mediante separación celular por citometría de flujo**” ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Beatriz Martín Herreros**, Graduada en Biología, reúne, a nuestro juicio, condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

En València a 8 de noviembre de 2024

Firmado:

Director: Dr. Pau Montesinos Fernández

Codirectora: Dra. Amparo Sempere Talens

Codirectora: Dra. Lourdes Cordon Gallego

Tutora académica: Dra. María Teresa Donato Martín

«En mi colección de medallas y de arañazos»

— Vetusta Morla, *Los días raros*

AGRADECIMIENTOS

A los tres directores, por su dedicación.

Al Dr. Pau Montesinos, por su paciencia y por depositar su confianza en mí al darme la oportunidad de trabajar en su equipo. A la Dra. Amparo Sempere, por trasmitirme su inmenso conocimiento, por su tiempo, su apoyo constante, su confianza y esfuerzo. A la Dra. Lourdes Cordón, por ser luz en este camino, esta tesis no habría sido posible sin tu ayuda, tiempo, dedicación, esfuerzo, apoyo, confianza, entrega...

A Lola y a Samuel, por su valiosa ayuda y orientación para el desarrollo de este trabajo.

A Amparo, Concha, Inma y Pilar, gracias por su alegría diaria, por su inestimable ayuda y apoyo emocional. A Rafa, Paula, Irene, Malé, Ana y al resto del equipo de la Unidad de Diagnóstico Hematológico y del Servicio de Hematología por su colaboración.

A la Dra. Eva Barragán y Dra. Claudia Sargas por su gran ayuda, junto con todo su equipo, especialmente a José Vicente.

A todo el equipo de leucemias agudas, con especial mención a David Martínez, Blanca Boluda, Rebeca Rodríguez, Antonio Solana y Teresa Martínez.

A la Asociación Española Contra el Cáncer por su extraordinaria labor y por su apoyo económico junto con el Instituto de Salud Carlos III.

A PETHEMA, por su generosa colaboración con los datos de los pacientes.

A los pacientes y familiares.

A Yolanda, Marta, Cristian, Pedro, Mari, Bea, Raquel y Ana, por la ayuda inestimable que me ha aportado cada uno, por ser alegría y por haber compartido día a día conmigo este camino.

A mis amigas de siempre, por haberme escuchado decir tantas veces “cuando acabe la tesis...”, especialmente a Esther por coincidir en este camino hasta el final.

A mis biólogas favoritas, especialmente a Alba y María, pero sin olvidarme de Sara, Sonia y Zaida.

A Ana, por su amistad incondicional.

A Javi, por ser calma, luz, alegría, ejemplo de constancia, por su apoyo, paciencia y comprensión.

A mamá, papá y tete, por su amor incondicional, apoyo, sacrificio, comprensión y por brindarme todas las oportunidades necesarias para llegar hasta aquí.

Y a mí, por todo el esfuerzo, constancia y trabajo que he invertido en este camino.

TABLA DE CONTENIDOS

<u>SECCIÓN</u>	<u>PÁGINA</u>
<u>Glosario de abreviaturas</u>	
<u>Índice de tablas y figuras</u>	
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Leucemia mieloblástica aguda.....	19
1.2. Leucemogénesis	20
1.3. LMA con mutación de la nucleofosmina-1 (<i>NPM1</i>).....	22
1.3.1. Estructura y función de <i>NPM1</i>	22
1.3.2. Diagnóstico de la LMA <i>NPM1</i>	25
1.3.2.1 Diagnóstico genético	25
1.3.2.2 Características inmunofenotípicas.....	26
1.3.2.3 Perfil genético	28
1.3.3. Pronóstico de la LMA <i>NPM1</i>	28
1.3.4. Enfermedad residual medible	29
1.4. Evolución clonal	32
1.5. Resumen.....	33
2. HIPÓTESIS.....	35
3. OBJETIVOS	39
4. PACIENTES Y MÉTODOS.....	43
4.1. Pacientes	45
4.2. Información analítica y estudio morfológico.....	45
4.3. Citometría de flujo multiparamétrica.....	46
4.3.1. Controles de calidad, estandarización y calibración.....	58
4.3.2. Procesamiento de las muestras para citometría	58
4.3.3. Adquisición de células en el citómetro de flujo	59

4.3.4.	Análisis manual de las muestras	59
4.3.4.1	Discriminación de dobletes y eliminación de células no viables	59
4.3.4.2	Identificación de poblaciones celulares	60
4.3.4.3	Análisis por citometría al diagnóstico y en la recaída de la LMA <i>NPM1</i>	62
4.3.4.4	Análisis por citometría de la enfermedad residual medible	66
4.4.	Separación celular	69
4.4.1.	Procesamiento de las muestras	69
4.4.2.	Adquisición de las muestras en el separador celular	69
4.5.	Citogenética	70
4.5.1.	Citogenética convencional	70
4.5.2.	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	70
4.6.	Biología molecular	70
4.6.1.	Extracción de ácidos nucleicos	70
4.6.2.	Detección de la mutación en <i>NPM1</i>	71
4.6.3.	Expresión de <i>NPM1</i> mutado y estudio de enfermedad residual medible mediante RT-qPCR <i>NPM1</i>	72
4.6.4.	Caracterización molecular mediante secuenciación masiva (NGS)	72
4.7.	Tratamiento	75
4.7.1.	Esquemas terapéuticos	75
4.7.2.	Definiciones de respuesta al tratamiento	78
4.8.	Almacenamiento y gestión de los datos	79
4.9.	Análisis estadístico	79
5.	RESULTADOS	81
5.1.	Características de los pacientes	83
5.1.1.	Descripción de la serie global	83
5.2.	Caracterización biológica al diagnóstico	86
5.2.1.	Análisis inmunofenotípico	86
5.2.2.	Alteraciones moleculares	99
5.2.3.	Correlación fenotipo-molecular	103
5.2.4.	Impacto pronóstico de la clasificación inmunofenotípica	107

5.3. Caracterización biológica en la recaída	110
5.3.1. Inmunofenotipo	110
5.3.2. Alteraciones moleculares	120
5.3.3. Correlación fenotipo-molecular	125
5.3.4. Pérdida de <i>NPM1</i> a la recaída	127
5.4. Evolución clonal	136
5.5. Comparativa de la ERM: CFM y RT-qPCR.....	143
6. DISCUSIÓN	145
7. CONCLUSIONES	165
8. BIBLIOGRAFÍA	169

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AcMo: anticuerpo monoclonal
ADN: ácido desoxirribonucleico
Alo-TPH: trasplante alógeno de progenitores hematopoyéticos
APC: alofocianina
APCCy7: alofocianina con cianina 7 en tándem
APCH7: alofocianina con cianina H7 en tándem
AraC: arabinósido de citosina
ARNr: ácido ribonucleico ribosómico
CHIP: clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CD: grupo o *cluster* de diferenciación
CDp: célula dendrítica plasmocitoide
CFM: citometría de flujo multiparamétrica
CI: incidencia acumulada
CNT: celularidad nucleada total
CPH: células progenitoras hematopoyéticas
DfN: *different from normal*
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ELN: *European Leukemia Net*
ERM: enfermedad residual medible
FAB: *French-American-British*
FISH: Hibridación fluorescente *in situ*
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FLC: fluorocromo
FSC: *forward scatter component*
HLA: antígeno leucocitario humano
HSC: hematopoietic stem cells
ICC: *International Consensus Classification*
ITD: *internal tandem duplication*
LAIP: *leukemia associated immunophenotype*
LLA: leucemia infoblástica aguda
LLOQ: límite inferior de cuantificación o *lower limit of quantification*
LMA: leucemia mieloblástica aguda
LMNM: linaje mieloide no monocítico
LOD: límite inferior de detección o *limit of detection*
LPA: leucemia promielocítica aguda

LSC: *leukemic stem cell*

MO: médula ósea

NGS: secuenciación masiva o *Next-Generation Sequencing*

NK: *natural killer*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: ficoeritrina

PECy7: ficoeritrina con cianina 7 en tándem

PerCP: proteína peridín clorofila

PerCPCy5.5: proteína peridín clorofila con cianina 5.5 en tándem

PETHEMA: Programa Español de Tratamientos en Hematología

SG: supervivencia global

SP: sangre periférica

SMD: síndrome mielodisplásico

SSC: side scatter component

TA: temperatura ambiente

TPH: trasplante progenitores hematopoyéticos

VAF: *Variant allele frequency*

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Tubo de orientación a leucemia aguda (del inglés, *acute leukemia orientation tube*, ALOT) propuesto por el Grupo EuroFlow.

Tabla 2. Tubo de orientación a leucemia aguda (del inglés, *acute leukemia orientation tube*, ALOT) basado en EuroFlow.

Tabla 3. Panel de 7 tubos para el estudio de LMA/SMD propuesto por el Grupo EuroFlow.

Tabla 4. Listado de los anticuerpos monoclonales, fluorocromos, clones y volumen de marcaje utilizados en el panel de LMA/SMD propuesto por el Grupo EuroFlow.

Tabla 5. Secuencia de cebadores para la detección de mutación en *NPM1* descritos por Gale *et al.*, 2008.

Tabla 6. Región codificante y *hotspot* de los 19 genes incluidos en el panel *AML Community Panel (Ampliseq)*.

Tabla 7. Genes incluidos en el panel *Oncomine Myeloid Research Assay – Chef Ready* indicado con el círculo rojo y con el panel *Oncomine Myeloid Assay GX v2* indicado con el círculo azul. En dichos genes sólo se estudia la región *hotspot*.

Tabla 8. Genes incluidos en el panel *Oncomine Myeloid Research Assay – Chef Ready* indicado con el círculo rojo y con el panel *Oncomine Myeloid Assay GX v2* indicado con el círculo azul. En dichos genes se estudia toda la región codificante.

Tabla 9. Genes incluidos en el panel *Oncomine Myeloid Research Assay – Chef Ready* indicado con el círculo rojo y con el panel *Oncomine Myeloid Assay GX v2* indicado con el círculo azul. En dichos genes se estudia su expresión y reordenamientos.

Tabla 10. Características de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación de *NPM1*.

Tabla 11. Poblaciones de células leucémicas en pacientes con LMA y mutación *NPM1*: grado de infiltración y distribución de los casos.

Tabla 12. Nivel de expresión de los diferentes antígenos estudiados en las tres principales poblaciones de células leucémicas de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1*.

Tabla 13. Frecuencia de los patrones de maduración asincrónicos de la línea monocítica de la población de células leucémicas monocíticas evaluados en los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación de *NPM1*.

Tabla 14. Distribución de los diferentes estadios de maduración de la serie monocítica en los 53 casos con población de células leucémicas monocíticas.

Tabla 15. Frecuencia de los patrones de maduración asincrónicos de la línea monocítica evaluados en los 38 pacientes en los que esta población no se consideró leucémica.

Tabla 16. Prevalencia de las comutaciones de *NPM1* según el patrón inmunofenotípico de la clasificación-R.

Tabla 17. Comparativa de los resultados de la expresión de los diferentes antígenos analizados en las tres principales poblaciones de células leucémicas entre el diagnóstico y la recaída.

Tabla 18. Perfil mutacional de las poblaciones aisladas mediante separación celular por citometría de flujo en el momento de post-inducción del paciente 66.

Figuras

Figura 1. Esquema de la adquisición gradual de alteraciones genéticas en las células progenitoras hematopoyéticas normales que conducen a la generación de células pre-leucémicas y leucémicas.

Figura 2. Distribución de las diferentes alteraciones citogenéticas y moleculares en pacientes jóvenes con leucemia mieloblástica aguda.

Figura 3. Comparativa de la estructura de la proteína NPM1 no mutada y mutada.

Figura 4. Métodos, sensibilidad y momentos de estudio recomendados por la *European Leukemia Net* para la evaluación de la enfermedad residual medible en leucemia mieloblástica aguda.

Figura 5. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo en los que se muestran la serie granulocítica con diferenciación a neutrófilo según la expresión de CD45 (A), CD117 (B), y según los patrones de maduración de CD10/CD16 (C), CD13/CD11b (D) y CD13/CD16 (E) y el diagrama adimensional de separación automática de poblaciones (del inglés, Automatic Population Separation) (F).

Figura 6. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo en los que se muestran la serie monocítica según la expresión de CD45 (A), CD117/HLA-DR (B), CD34/CD64 (C) y los patrones de maduración CD35/CD14 (D) y CD14/CD300e (E) y el diagrama adimensional de separación automática de poblaciones (del inglés, *Automatic Population Separation*) (F).

Figura 7. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo en los que se muestran los patrones de maduración de la serie eritroide según la expresión de CD45 (A), CD105/CD71 (B), CD36 (C), CD71 (D) CD117/CD105 (E) y CD117/HLA-DR (F) utilizando el tubo 3 del panel de LMA/SMD.

Figura 8. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo que permiten la identificación de las células dendríticas plasmocitoides (ocre), los basófilos (rosa) y los mastocitos (azul) según la expresión de CD45 (A), CD203c/CD123 (B) HLA-DR/CD4 (C), CD117/CD203c (D), CD123/HLADR (E) y HLA-DR/CD4 (F) utilizando el tubo 6 del panel de LMA/SMD.

Figura 9. Diagramas biparamétricos de citometría utilizados para la eliminación de células no viables basándose en el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) relativos.

Figura 10. Diagrama biparamétrico de citometría de CD45 (antígeno leucocitario común) vs. SSC que permite analizar la distribución de las diferentes poblaciones de la médula ósea normal.

Figura 11. Diagramas biparamétricos de citometría de flujo en los que se muestra la expresión de los antígenos comunes a todos los tubos del panel de LMA/SMD del Grupo Euroflow (CD34, HLA-DR, CD117 y CD45) que permiten la identificación de las poblaciones de precursores hematopoyéticos según la expresión de CD34 (A), CD117/HLA-DR (B), CD117 (C) y CD45 (D).

Figura 12. Diagramas biparamétricos de citometría que muestran la distribución de las tres poblaciones de células leucémicas según la expresión de los antígenos CD117 y HLA-DR.

Figura 13. Diagramas biparamétricos de citometría que muestran la distribución de las tres poblaciones de células leucémicas según la expresión de los antígenos CD117 y HLA-DR que dan como resultado los diferentes patrones inmunofenotípicos (1-7).

Figura 14. Diagramas biparamétricos de un análisis representativo de enfermedad residual medible de una muestra de médula ósea mediante citometría de flujo.

Figura 15. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA2007 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LMA desde el inicio del periodo de estudio a marzo de 2011.

Figura 16. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA2010 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LMA desde abril de 2011 hasta el final del estudio.

Figura 17. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA-NPM1-2017 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LMA y mutación *NPM1* desde enero de 2017 hasta el fin del estudio (enmienda de julio 2019).

Figura 18. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA2014 para mayores de 65 años.

Figura 19. Gráficos comparativos de la distribución de la expresión de los diferentes antígenos estudiados en las tres poblaciones leucémicas principales.

Figura 20. Gráficos comparativos de la maduración monocítica de una médula ósea (MO) normal y de un paciente con leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1*.

Figura 21. Diagramas circulares que muestran la distribución de los diferentes patrones inmunofenotípicos según la clasificación establecida por Matarraz *et al.*, 2023 y según la “clasificación-R” establecida en este estudio (B). Diagrama de Sankey que ilustra la reasignación de todos los casos entre ambas clasificaciones (C).

Figura 22. Distribución de los pacientes según los tipos de mutación en *NPM1* (A). Secuencia de codificación y proteína de los tipos de *NPM1* de la serie, además del número y el porcentaje de casos en los que se identificó (B).

Figura 23. Distribución de los pacientes según el número de alteraciones detectadas sin tener en cuenta la mutación de *NPM1*.

Figura 24. Prevalencia mutacional (A) y diagrama de circos (B) que muestran las principales comutaciones de *NPM1*.

Figura 25. Diagrama de cajas y bigotes que muestran la mediana y rango de la frecuencia alélica de *NPM1* (azul oscuro) y las comutaciones más comunes al diagnóstico.

Figura 26. Prevalencia mutacional de las principales comutaciones de *NPM1* según el patrón inmunofenotípico de la clasificación-R.

Figura 27. Mutaciones concomitantes de *NPM1* en los pacientes de la serie distribuidos según el patrón inmunofenotípico de la clasificación-R.

Figura 28. Curvas de supervivencia global e incidencia acumulada de recaída en los pacientes con leucemia mieloblástica aguda *NPM1* tratados con quimioterapia intensiva y estratificados según las poblaciones leucémicas mayoritarias (A, B, C y D) o los diferentes patrones inmunofenotípicos observados al diagnóstico (E, F, G y H).

Figura 29. Gráficos comparativos de la expresión de CD15, CD34 y CD7 en la población de células leucémicas inmaduras al diagnóstico (círculo azul) y en la recaída (círculo rojo).

Figura 30. Gráfico comparativo de la expresión de CD34 en la población de células leucémicas comprometidas a LMNM entre el diagnóstico (cuadrado naranja) y la recaída (cuadrado amarillo).

Figura 31. Gráficos comparativos de la expresión de diferentes antígenos en la población de células leucémicas monocíticas entre el diagnóstico (triángulo verde) y la recaída (triángulo rojo).

Figura 32. Diagramas biparamétricos del patrón madurativo CD14/CD300e de las células monocíticas leucémicas del paciente 61 al diagnóstico (A) y en la recaída (B).

Figura 33. Gráficos comparativos de la distribución de las diferentes subpoblaciones del compartimento leucémico monocítico entre el diagnóstico (D, círculos azules) y la recaída (R, círculos rojos).

Figura 34. Diagrama de Sankey que ilustra el cambio de los patrones inmunofenotípicos entre el diagnóstico (D) y la recaída (R) según la clasificación-R propuesta en este estudio.

Figura 35. Patrón mutacional en muestras pareadas en el momento del diagnóstico (D) y primera recaída (R) de pacientes con mutación *NPM1*.

Figura 36. Patrón mutacional en muestras emparejadas en el momento del diagnóstico (D) y resistencia (R) de los 2 pacientes con mutación *NPM1* en resistencia.

Figura 37. Modelo de evolución clonal basado en las diferencias entre el perfil mutacional del diagnóstico y de la recaída.

Figura 38. Gráfica comparativa de la frecuencia mutacional entre el diagnóstico (azul), recaída (rojo) y resistencia (verde).

Figura 39. Gráfica comparativa de la mediana de la frecuencia alélica de los genes más relevantes entre el diagnóstico (azul), recaída (naranja) y resistencia (gris)

Figura 40. Estudio comparativo de los cambios entre el patrón inmunofenotípico (diagnóstico-recaída) y los grupos de evolución clonal según el perfil mutacional establecidos en este estudio.

Figura 41. Diagramas biparamétricos de citometría que ilustran el análisis del paciente 66 en diferentes momentos evolutivos, en el que se objetivó la pérdida de la mutación *NPM1* en la recaída.

Figura 42. Características moleculares del paciente 66 en la evolución de la leucemia mieloblástica aguda.

Figura 43. Diagramas biparamétricos de citometría que ilustran el análisis del paciente 83 en diferentes momentos evolutivos, en el que se objetivó la pérdida de la mutación *NPM1* en la recaída.

Figura 44. Características biológicas del paciente 83 en la evolución de la leucemia mieloblástica aguda.

Figura 45. Perfil mutacional de las diferentes poblaciones celulares aisladas mediante separación celular por citometría de flujo en el momento del diagnóstico en 8 pacientes.

Figura 46. (A) Perfil mutacional de las diferentes poblaciones celulares aisladas mediante separación celular por citometría de flujo de 2 pacientes en remisión completa (RC). (B) Perfil mutacional de las diferentes poblaciones celulares aisladas mediante separación celular por citometría de flujo de 2 pacientes en recaída/resistencia.

Figura 47. Comparación de la VAF de las mutaciones encontradas al diagnóstico y en diferentes momentos evolutivos en la celularidad total de la médula ósea y en diferentes poblaciones celulares leucémicas o aparentemente normales aisladas mediante separación celular por citometría de flujo para dilucidar la evolución clonal.

Figura 48. Curvas de supervivencia global e incidencia acumulada de recaída en los pacientes con leucemia mieloblástica aguda *NPM1* tratados con quimioterapia intensiva, alcanzando RC, y estratificados según la detección de enfermedad residual medible (ERM) $\geq 0,1\%$ mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Figura 49. Gráfico comparativo de los resultados obtenidos en el análisis de enfermedad residual medible mediante citometría de flujo multiparamétrica (CFM) y RT-qPCR en los pacientes de la serie que recibieron quimioterapia intensiva.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leucemia mieloblástica aguda

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) es una neoplasia hematológica muy heterogénea caracterizada por la proliferación clonal de células precursoras hematopoyéticas mieloides en la médula ósea. Estas células sufren un bloqueo en la diferenciación y desplazan la hematopoyesis normal, condicionando insuficiencia medular e infiltración en la sangre periférica y, en ocasiones, en otros órganos y tejidos.

La insuficiencia medular y la infiltración extramedular desencadenan una variedad de manifestaciones clínicas y biológicas tales como anemia, trombocitopenia, leucopenia o leucocitosis que conllevan, en muchos casos, infecciones y hemorragias, reflejo de una hematopoyesis ineficaz, así como también otras disfunciones metabólicas y de otros órganos implicados.

La LMA puede afectar a pacientes de todas las edades, aunque es más frecuente en adultos, en los que representa el 85% de las leucemias agudas. La mediana de edad en el momento del diagnóstico está en torno a los 65 años (Sasaki *et al.*, 2021), con una incidencia estimada de 2 a 3 casos al año por cada 100.000 habitantes (www.fundacionpethema.es).

La etiología de la LMA no se conoce por completo, no obstante, se han descrito diferentes factores que favorecen la aparición de esta neoplasia. Aproximadamente un 30% de las LMA son secundarias, es decir, precedidas por otras enfermedades hematológicas como los síndromes mielodisplásicos (SMD) o los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC), o por una neoplasia previa tratada con quimioterapia y/o radioterapia (leucemia mieloblástica aguda relacionada con la terapia, t-LMA) (Martínez-Cuadrón *et al.*, 2021). En el grupo infantil, el riesgo de padecer LMA aumenta en los niños portadores de ciertas alteraciones cromosómicas congénitas como las asociadas al síndrome de Down, al síndrome de Klinefelter y a la anemia de Fanconi, entre otros. Otros factores de riesgo son las radiaciones ionizantes y la exposición a productos químicos como el benceno y el humo del tabaco. Por otra parte, el creciente conocimiento de las neoplasias hematológicas hereditarias ha mostrado que aproximadamente el 5-10% de la LMA presentan una predisposición de línea germinal (Rafei & DiNardo, 2019).

A pesar de conocer estos factores que parecen favorecer la aparición de la LMA, la mayoría de los casos surgen *de novo* desconociéndose su etiología.

1.2. Leucemogénesis

El desarrollo de la LMA se produce como resultado de la adquisición secuencial de una serie de mutaciones somáticas en las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *hematopoietic stem cell*), lo que altera su capacidad para diferenciarse hacia células hematopoyéticas maduras normales. Estas HSC mutadas mantienen la capacidad de autorrenovación, lo que permite su división y proliferación clonal, provocando la propagación del clon neoplásico con la subsecuente acumulación de células mieloides leucémicas en la médula ósea. Las mutaciones iniciales conducen a expansiones clonales, aumentando significativamente la probabilidad de que surjan posteriormente nuevas mutaciones en las células clonales originarias.

La adquisición de una mutación pre-leucémica en una única HSC, como por ejemplo es el caso de algunas de las mutaciones en reguladores epigenéticos como *DNMT3A*, *ASXL1* o *TET2*, genera una ventaja proliferativa y conduce a la expansión clonal de esta HSC. A partir de ella, toda la progenie hereda la misma mutación (hematopoyesis clonal de potencial indeterminado, del inglés CHIP, o hematopoyesis clonal pre-leucémica). Posteriormente, la adquisición de nuevas mutaciones necesarias para el inicio de la leucemogénesis, como *NPM1* o *FLT3-ITD* transforma las células madre pre-leucémicas en LSC (del inglés *leukemic stem cells*). Estas células poseen una ventaja proliferativa y un bloqueo en su capacidad de diferenciación, lo que da lugar al desarrollo de la leucemia. Las LSC pueden sobrevivir y persistir tras la quimioterapia, aumentando la probabilidad de recaídas (Shlush *et al.*, 2014; Trumpp & Haas, 2022) (**Figura 1**). Las combinaciones de mutaciones que finalmente impulsan la leucemogénesis están influenciadas por la cooperatividad biológica y las relaciones de exclusividad entre los genes mutados. El estado epigenético de las células leucémicas y el microambiente de la médula ósea también desempeñan un papel importante durante el inicio y la progresión de la leucemia (Batsivari *et al.*, 2021; Çelik *et al.*, 2020).

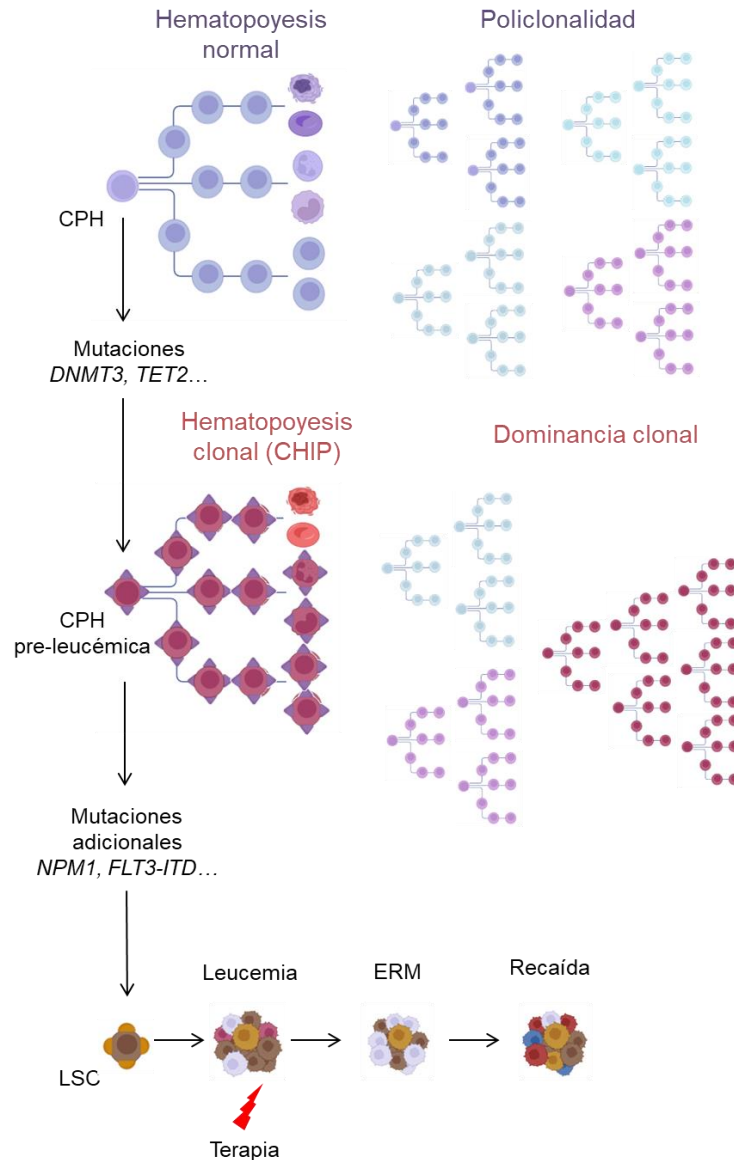


Figura 1. Esquema de la adquisición gradual de alteraciones genéticas en las células progenitoras hematopoyéticas normales que conducen a la generación de células pre-leucémicas y leucémicas (adaptada de Trumpp & Haas., 2022). La hematopoyesis a partir de las células progenitoras hematopoyéticas produce células normales que maduran a través de diferentes vías de diferenciación. La adquisición de determinadas mutaciones como *DNMT3* o *TET2* genera células progenitoras pre-leucémicas que pueden tener una ventaja proliferativa, produciendo la expansión de un clon de células progenitoras con la misma mutación, condición conocida como hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP). La producción de mutaciones adicionales en estas células pre-leucémicas las transforman en células madre leucémicas (LSC), las cuales provocan la leucemia. Las células leucémicas pueden sobrevivir a la terapia y producir fenómenos de resistencia al tratamiento o recaída de la enfermedad. (Figura generada con BioRender).

Las alteraciones genéticas definen diferentes subtipos biológicos y tienen impacto diagnóstico y pronóstico (H. Döhner *et al.*, 2022; Grimwade *et al.*, 2016; Khoury *et al.*, 2022) (**Figura 2**). La disponibilidad cada vez más extendida de las técnicas moleculares ha permitido profundizar en el conocimiento del perfil molecular de la LMA.

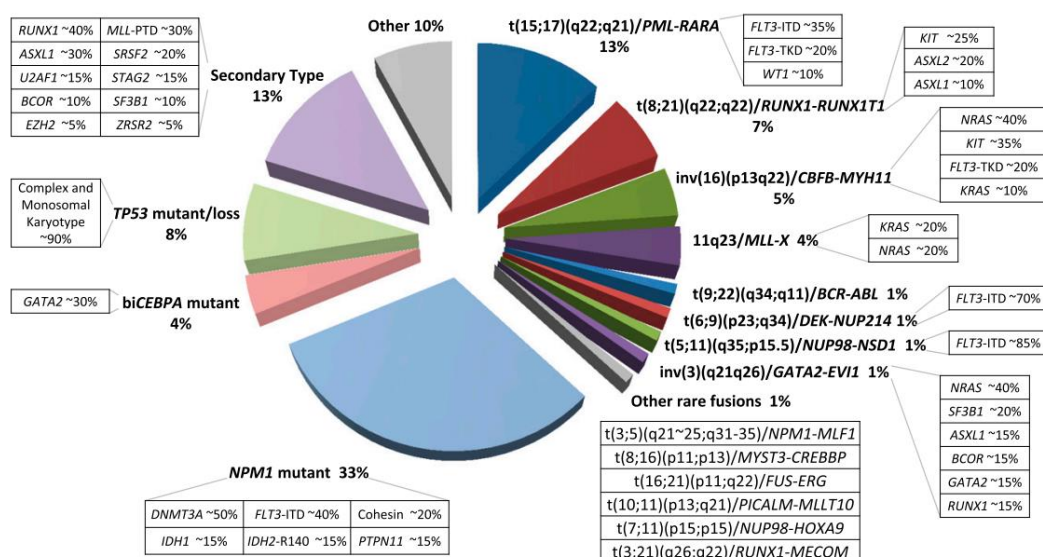


Figura 2. Distribución de las diferentes alteraciones citogenéticas y moleculares en pacientes jóvenes con leucemia mieloblástica aguda (tomada de Grimwade *et al.*, 2016).

1.3. LMA con mutación de la nucleofosmina-1 (*NPM1*)

La mutación en *NPM1* es una de las alteraciones genéticas recurrentes más comunes en la LMA. Se produce aproximadamente en un 30% de los pacientes adultos (Grimwade *et al.*, 2016), siendo más frecuente (45-64% de los casos) en los que presentan un cariotipo normal. Las características clínicas en el momento del diagnóstico incluyen generalmente anemia y trombocitopenia, y, a menudo, los pacientes tienen un recuento de leucocitos y de plaquetas más elevado en comparación con los que padecen otros tipos de LMA. Los pacientes con LMA con *NPM1* mutado pueden mostrar afectación extramedular, siendo las localizaciones más frecuentemente implicadas las encías, los ganglios linfáticos y la piel (Swerdlow *et al.*, 2017).

1.3.1. Estructura y función de *NPM1*

NPM1 codifica la proteína nucleofosmina 1, también llamada B23 o numatina, que es una fosfoproteína multifuncional con localización predominantemente nucleolar en

condiciones normales. Actúa de lanzadera entre el núcleo y el citoplasma, así como también entre el nucleoplasma y el nucleolo (Borer *et al.*, 1989).

El gen se localiza en el cromosoma 5q35, contiene 12 exones y se transcribe en tres principales isoformas NPM1.1 (NM_002520.6), NPM1.2 (NM_199185.3) y NPM1.3 (NM_1037738.2) (Falini *et al.*, 2007), siendo el primer transcrito el más prevalente y largo con 11 exones (1-9 y 11-12) y 294 aminoácidos (Falini *et al.*, 2009).

El extremo N-terminal, es hidrofóbico y contiene 2 señales débiles de exportación nuclear ricas en leucina (NES, del inglés *nuclear export signals*) y un núcleo de auto-oligomerización responsable de la formación de pentámeros de *NPM1*. Este extremo también actúa como chaperona al evitar el plegamiento incorrecto de proteínas en el nucleolo (**Figura 3**).

La porción central de NPM1 es ácida porque contiene dos tramos de 10 a 20 aminoácidos de residuos de ácido aspártico y glutámico cuya carga negativa interviene en la unión de NPM1 no mutada a las histonas. La región central también contiene una señal de localización nuclear bipartita (NLS, del inglés *nuclear localization signal*) que dirige la proteína desde el citoplasma al nucleoplasma.

El dominio básico del extremo C-terminal media la unión a ácidos nucleicos y TP53. La última porción de este dominio, con sus residuos altamente conservados W288 y W290, forma una estructura globular que consiste en un conjunto de tres hélices, responsable de su señal de localización nucleolar (NoLS, del inglés *nucleolar localization signal*).

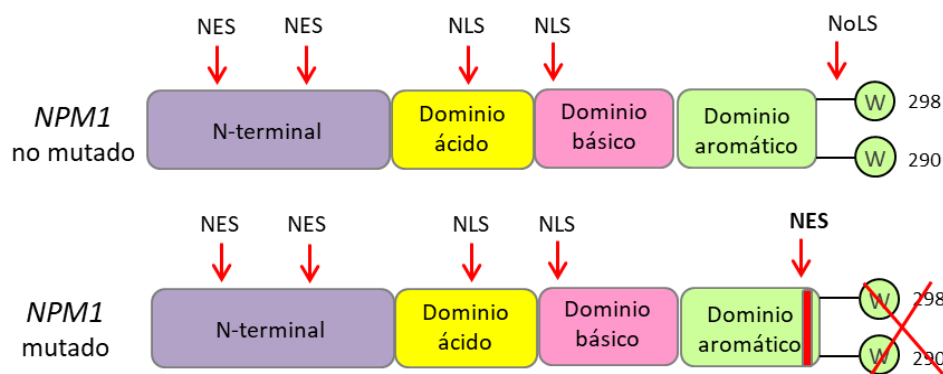


Figura 3. Comparativa de la estructura de la proteína NPM1 no mutada y mutada (adaptada de Falini *et al.*, 2020).

Entre las funciones de esta proteína se encuentran (Falini *et al.*, 2007; Grisendi *et al.*, 2006; Heath *et al.*, 2017; Mitrea *et al.*, 2018; Nachmani *et al.*, 2019; Scott & Oeffinger, 2016):

- la inhibición de la duplicación del centrosoma: durante el ciclo celular NPM1 no mutada se libera del centrosoma para permitir su duplicación y la formación del huso mitótico.
- la participación en la biogénesis de los ribosomas gracias a su localización predominantemente nucleolar y la capacidad de unirse al ARN ribosómico (ARNr) y a las proteínas ribosómicas.
- la participación en la reparación del ADN: NPM1 no mutada se une a TP53, aumentando su estabilidad y actividad transcripcional, así como a APE1, regulando su actividad endonucleasa en función del tipo de daño del ADN.
- NPM1 no mutada actúa como chaperona, con capacidad para unirse a histonas centrales y enlazadoras y regula la formación de heterocromatina perinucleolar.
- Entre las últimas funciones descritas se encuentran la 29-O-metilación del ARNr y la participación en la separación de fases líquido-líquido en el nucleolo.

Falini y sus colaboradores fueron los primeros en identificar la expresión anómala de la nucleofosmina en el citoplasma de una serie de muestras de pacientes con LMA. La expresión anómala de la nucleofosmina se asoció con mutaciones en *NPM1*, en concreto con inserciones de 4 pares de bases en el exón 12 (menos del 1% de las mutaciones afecta a otros exones) (Falini *et al.*, 2005).

En cuanto a los diferentes tipos de mutación, el más frecuente es el tipo A. Se trata de una duplicación de TCTG entre los nucleótidos 860 y 863 y representa entre el 70% y el 80% de los casos, seguida de las mutaciones B (c.863_864insCATG) y D (c.863_864insCCTG) que se observan en aproximadamente en un 5% a 10% de los pacientes respectivamente (Alpermann *et al.*, 2016; Falini *et al.*, 2005).

La proteína NPM1 no mutada migra desde el citoplasma hasta el nucleoplasma, desde donde puede transportarse hasta el nucleolo gracias a la fuerte unión del dominio nucleolar. La interacción de los motivos NES del extremo N-terminal de NPM1 no mutada con la exportina-1 asegura esta exportación nucleolar.

Todas las mutaciones en el exón 12 causan un cambio en el marco abierto de lectura en los últimos aminoácidos del extremo C-terminal, provocando la pérdida de los residuos clave de triptófano W288 y W290 (o sólo W290), con la subsecuente reducción

de su capacidad de interaccionar eficientemente con el nucleolo, y la generación de una nueva NES en el extremo C-terminal (**Figura 3**). Ambos cambios conducen en último término a la deslocalización citoplasmática de la proteína con mutación de *NPM1* (Falini *et al.*, 2005, 2006), así como a una interacción entre la exportina-1 y *NPM1* que permite el mantenimiento de la LMA. La deslocalización de la proteína *NPM1* mutada al citoplasma induce también el cambio de ubicación al citoplasma de otras proteínas nucleares, como ARF y APE1, entre otras.

Por tanto, el papel de *NPM1* en la leucemogénesis puede explicarse en parte por las alteraciones en la función de varias proteínas nucleares que se deslocalizan al citoplasma. Estas proteínas están involucradas en procesos como la apoptosis, la reparación del ADN y la diferenciación. Todo ello resulta en una expresión persistente de genes *homeobox (HOX)* a niveles altos, como los observados en las HSC. En contraposición con lo que ocurre en la diferenciación de progenitores hematopoyéticos normales, esta expresión no disminuye, lo que probablemente contribuye, al menos en parte, a mantener el estado indiferenciado de las células leucémicas (Brunetti *et al.*, 2019; Falini *et al.*, 2020).

1.3.2. Diagnóstico de la LMA *NPM1*

1.3.2.1 Diagnóstico genético

El abordaje integrado de la LMA al diagnóstico debe incluir, además de la historia clínica completa de los pacientes, la información biológica de la morfología, el inmunofenotipo y la genética con un conocimiento más profundo de las alteraciones moleculares (H. Döhner *et al.*, 2022). Esto permite definir mejor la leucemia ayudando en la toma de decisiones clínicas. En la actualidad, el diagnóstico de la LMA se fundamenta en las diferentes clasificaciones de las neoplasias hematológicas que se han utilizado y han ido evolucionando a lo largo de los años.

El primer sistema de clasificación, utilizado durante más de 25 años, se basó en la clasificación Franco-Américo-Británica (FAB), establecida en 1976 (Bennett *et al.*, 1976) y actualizada en 1985 (Bennett *et al.*, 1985) y 1991 (Bennett *et al.*, 1991). Se distinguían 8 tipos de LMA en base fundamentalmente a los hallazgos morfológicos, citoquímicos e inmunofenotípicos según el linaje celular afectado y su grado de diferenciación.

Las clasificaciones posteriores de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Harris *et al.*, 1999; Khoury *et al.*, 2022; Swerdlow *et al.*, 2017; Vardiman *et al.*, 2002, 2009) han ido incorporando e integrando la citogenética y las alteraciones moleculares

a la morfología y el inmunofenotipo. El avance del conocimiento biológico a lo largo de los últimos años sobre la patogénesis molecular ha permitido identificar nuevas alteraciones recurrentes y definir nuevos subtipos de LMA, entre los que se encuentra la LMA con mutación *NPM1*.

En la actualización de la clasificación de la OMS del 2017, la LMA *NPM1* se incluyó en la categoría de LMA con anomalías citogenéticas recurrentes cuyo criterio diagnóstico es la presencia de $\geq 20\%$ de blastos y la detección de dicha mutación.

En la última clasificación de las neoplasias mieloides de la OMS (5ª edición) publicada en 2022 (Khoury *et al.*, 2022), quedan establecidos dos grandes grupos de LMA: LMA con anomalías genéticas definitorias y LMA definida por la diferenciación celular. Asimismo, se considera el sarcoma mieloides como una manifestación de la LMA y se define un grupo de neoplasias mieloides secundarias: a terapia citotóxica y las asociadas a predisposición germinal. La LMA *NPM1* se incluye dentro del grupo de LMA con anomalías genéticas definitorias en la que, si se detecta la mutación, no es necesario un porcentaje mínimo de blastos para su diagnóstico. Además, en el mismo año se publicó la Clasificación de Consenso Internacional (ICC) de las neoplasias mieloides y la leucemia aguda en la que se establece un umbral de blastos de $\geq 10\%$ en sangre o médula ósea como requisito para el diagnóstico de la LMA con mutación *NPM1*.

El diagnóstico de la LMA con mutación *NPM1* se basa en la identificación de esta alteración genética mediante técnicas moleculares. Esta entidad se ha observado en todos los subtipos de la clasificación FAB, a excepción de la M3, siendo más recurrente la asociación con las leucemias con participación monocítica (leucemia mielomonocítica y monocítica aguda), aunque también se detecta en la LMA con o sin maduración, así como en la leucemia aguda eritroide pura (Swerdlow *et al.*, 2017).

1.3.2.2 Características inmunofenóticas

La LMA con mutación *NPM1* se caracteriza por una marcada heterogeneidad inmunofenotípica, posiblemente condicionada por su diversidad genética (Grimwade *et al.*, 2016). En los últimos años, algunos autores han evaluado los perfiles inmunofenotípicos de la LMA con mutación en *NPM1* intentando determinar su relación con las características genéticas y así establecer la posible relevancia clínica de estos hallazgos. Los estudios confirman la elevada heterogeneidad inmunofenotípica de este tipo de LMA y plantean que la caracterización por citometría de flujo podría contribuir a

orientar el diagnóstico molecular inicial y ayudar en la toma de decisiones terapéuticas de los pacientes con LMA y mutación de *NPM1* (Matarraz *et al.*, 2023).

Trabajos más recientes, coinciden en resaltar la gran heterogeneidad de la LMA con mutación de *NPM1* demostrando que el componente leucémico mieloide se encuentra integrado por diferentes tipos celulares en distintas etapas de diferenciación. Se ha señalado la participación de poblaciones leucémicas mieloides con implicación de la línea monocítica, neutrofílica o de células más inmaduras no comprometidas (Mason *et al.*, 2019). La mayoría de los casos presentan negatividad para CD34, con una positividad intensa para CD33 y una expresión variable, a menudo baja, de CD13, además de expresión de antígenos como CD117 y CD123 (Y.-R. Liu *et al.*, 2013; Mason *et al.*, 2018, 2019; Zhou *et al.*, 2019).

En la actualidad, los patrones inmunofenotípicos de esta leucemia no han sido establecidos por completo. Recientemente Matarraz *et al.* han evaluado las características inmunofenotípicas de la LMA con mutación de *NPM1* comparándolo con el del resto de LMA. El objetivo del estudio fue identificar perfiles fenotípicos que permitiesen una detección rápida de la alteración de *NPM1* y orientasen el enfoque molecular del diagnóstico contribuyendo a comprender la heterogeneidad biológica de esta entidad. En su análisis identifican tres poblaciones leucémicas mayoritarias en función de la expresión antigénica de las células leucémicas: un primer subgrupo con un perfil inmunofenotípico mieloide inmaduro (CD117⁺ HLA-DR⁺); otro con un perfil monocítico (CD64^{+/++} CD117^{+/heterogéneo} HLA-DR⁻) que es el que observan con mayor frecuencia; y un tercer subgrupo asociado a células comprometidas a linaje neutrófilo cuyo inmunofenotipo (CD117^{+/heterogéneo} HLA-DR⁻) es similar al de la leucemia promielocítica aguda (LPA).

En función del tipo de infiltración y de la distribución de las tres poblaciones leucémicas definidas en el estudio, los autores proponen una clasificación de la LMA con mutación *NPM1* en la que incluyen 7 patrones inmunofenotípicos (Matarraz *et al.*, 2023):

- Patrones A, B y C: en los que identifican una expansión mayoritaria de una de las tres poblaciones leucémicas que representa $\geq 80\%$ del total de las células leucémicas de la médula ósea (MO).
- Patrones D, E, F y G: con infiltración mixta por más de una de las poblaciones leucémicas principales, cada una de ellas en una proporción $\geq 20\%$ de las células leucémicas de la muestra.

Otra de las aportaciones del trabajo de Matarraz *et al.*, es la valoración de la maduración del componente monocítico leucémico con la identificación de tres perfiles inmunofenotípicos atípicos de diferenciación de la línea monocítica que se observaron en el 90% de los pacientes con LMA y mutación de *NPM1*. Estos patrones alterados de la maduración monocítica incluyen la asincronía en la adquisición del antígeno CD300e antes de CD14 o las alteraciones en la expresión de CD14 y CD35 (ganancia de CD35 antes de CD14 o sobreexpresión de CD14 antes de CD35) (Matarraz *et al.*, 2023).

Se ha observado también la asociación de diferentes conmutaciones con el patrón inmunofenotípico de la población blástica predominante como sucede con las mutaciones de *TET2* e *IDH1/2* detectadas con mayor frecuencia en pacientes con LMA y mutación de *NPM1* con poblaciones leucémicas CD34⁺HLA-DR⁺ cuyo inmunofenotipo es similar al de LPA (Arana-Rosainz *et al.*, 2021; Mason *et al.*, 2018). Finalmente, algunos autores encuentran también diferencias significativas en el pronóstico de los pacientes con LMA y mutación de *NPM1* en función de su perfil inmunofenotípico (Mason *et al.*, 2019).

La información inmunofenotípica disponible hasta hoy de las LMA con mutación *NPM1* deja muchas cuestiones por resolver. Este tipo de leucemia no es biológicamente uniforme y posiblemente abarca diferentes subtipos fenotípicos. Son necesarios más estudios que permitan confirmar los datos planteados en los últimos trabajos, especialmente en lo referente al perfil inmunofenotípico y su correlación con los hallazgos genéticos.

1.3.2.3 Perfil genético

La LMA con mutación *NPM1* suele asociarse con un cariotipo normal en el 85% de los casos (Haferlach *et al.*, 2009). Las mutaciones que suelen ocurrir junto con *NPM1* afectan principalmente a los genes *FLT3* y *DNMT3A*, aunque también se han detectado mutaciones en *IDH1*, *IDH2*, *PTPN11* y en genes del complejo de cohesión (Grimwade *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2017). La mutación en *NPM1* aparece frecuentemente como un evento secundario a alteraciones en modificadores epigenéticos como *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* e *IDH2* y parece preceder a las mutaciones en *FLT3*-ITD (Hirsch *et al.*, 2016; Shlush *et al.*, 2014).

1.3.3. Pronóstico de la LMA *NPM1*

La LMA con mutación *NPM1* generalmente tiene un pronóstico favorable (K. Döhner *et al.*, 2005), aunque el impacto varía según las mutaciones asociadas. Según la European Leukemia Net (ELN) 2017, este pronóstico es favorable sólo si la mutación

FLT3-ITD está ausente o muestra una baja ratio ($<0,5$), clasificándose la LMA con *NPM1* como de riesgo intermedio si supera este umbral (H. Döhner *et al.*, 2017). Recientemente, la actualización en la clasificación de riesgo de la ELN de 2022 incluye la categorización de todas las mutaciones *FLT3*-ITD dentro del grupo de riesgo intermedio, independientemente de la ratio o la comutación *NPM1*. Además, la presencia de anomalías citogenéticas de riesgo desfavorable en la LMA *NPM1* clasifica esta entidad de riesgo desfavorable (H. Döhner *et al.*, 2022). Así como también, varios estudios evidencian que la coocurrencia de mutaciones en *NPM1/WT1* y *NPM1/FLT3*-ITD/*DNMT3A* se relaciona con resultados clínicos particularmente adversos (Bezerra *et al.*, 2020; Eisfeld *et al.*, 2020).

1.3.4. Enfermedad residual medible

La enfermedad residual medible (ERM) es la persistencia de células leucémicas, que son indetectables por técnicas convencionales como la morfología, tras la administración del tratamiento. La evaluación de ERM en LMA se utiliza como biomarcador en la valoración de la respuesta al tratamiento y en el pronóstico del paciente, (Dillon *et al.*, 2021; Short *et al.*, 2020) ya que la presencia de estas células aumenta el riesgo de recidiva de la enfermedad. En las guías de la ELN de 2017 y 2022, se incluyó en los criterios de respuesta al tratamiento la nueva categoría de remisión completa morfológica con ERM negativa (RC ERM-) (H. Döhner *et al.*, 2017, 2022).

A pesar de la información pronóstica que proporciona la detección de la ERM, la recaída sigue produciéndose en pacientes con ERM negativa. Lo que indica que un resultado negativo o no detectable en la prueba no implica necesariamente la erradicación de la enfermedad, sino que pueden persistir células leucémicas por debajo del umbral de detección de la técnica. De forma inversa, no todos los pacientes con ERM detectable recaen (H. Döhner *et al.*, 2022) lo que podría ser consecuencia de falsos positivos.

Las técnicas con alta sensibilidad más empleadas en la actualidad para la detección de ERM en LMA son la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y la citometría de flujo multiparamétrica (CFM). Actualmente, existen otras técnicas moleculares emergentes aún no establecidas a nivel asistencial como la PCR digital (dPCR) y la NGS. Según las últimas recomendaciones de la ELN (Heuser *et al.*, 2021), la técnica molecular establecida para la monitorización de la ERM es la RT-qPCR y se recomienda en aquellos pacientes con las alteraciones de *NPM1*, CBF (*RUNX1*-

RUNXT1 o *CBFB-MYH11*) y LPA (*PML-RARA*) mientras que los pacientes no incluidos en este grupo se pueden monitorizar mediante CFM (**Figura 4**).

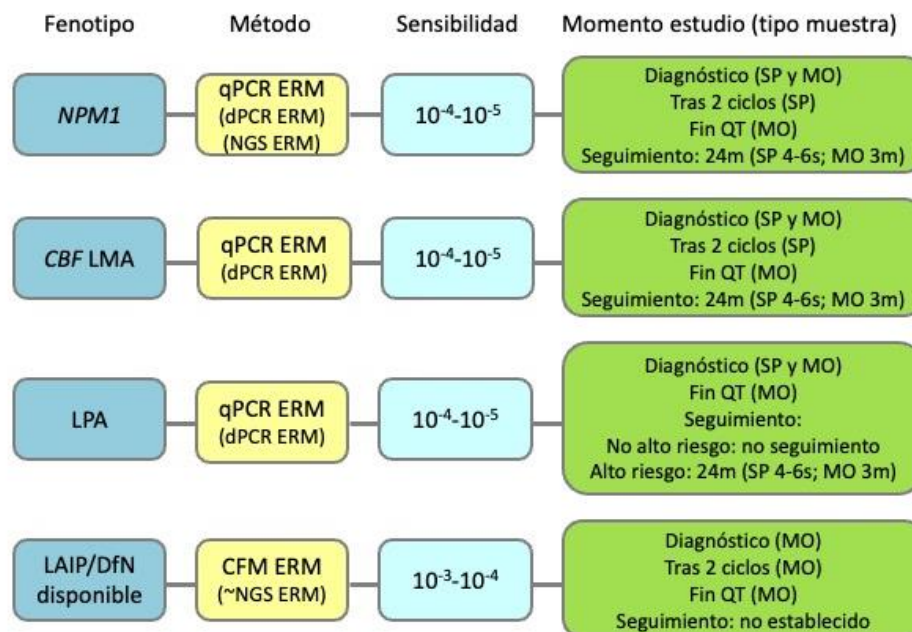


Figura 4. Métodos, sensibilidad y momentos de estudio recomendados por la European Leukemia Net (ELN) para la evaluación de la enfermedad residual medible (ERM) en leucemia mieloblástica aguda (LMA). QT: quimioterapia; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; LAIP: *leukemia associated immunophenotype*; DfN: diferente de lo normal.

Técnicas moleculares en el seguimiento de la LMA *NPM1*

Las técnicas de PCR, como la dPCR y la RT-qPCR, utilizadas para la monitorización de ERM en LMA, se basan en la detección de mutaciones específicas de un solo gen, como inserciones, deleciones y/o reordenamientos previamente identificados al diagnóstico (Duncavage *et al.*, 2022).

Particularmente, RT-qPCR se considera el método de elección para la evaluación de ERM en la LMA con mutación *NPM1* (H. Döhner *et al.*, 2022), puesto que se trata de una mutación presente desde los estadios más iniciales de la LMA y es estable en la recaída en aproximadamente el 90% de los pacientes (Krönke *et al.*, 2013).

Las guías de la ELN de 2017, actualizadas en 2022 para el manejo de la LMA recomiendan realizar una evaluación basal de la expresión del transcrito mutante de *NPM1* al diagnóstico, seguida de controles periódicos cada tres meses durante los primeros dos años de seguimiento para monitorizar la enfermedad (H. Döhner *et al.*,

2022; Heuser *et al.*, 2021; Schuurhuis *et al.*, 2018). Tanto la sangre periférica (SP) como la MO son adecuadas, aunque la muestra de SP parece ser más apropiada para la monitorización. Esto se debe a que, en MO, podrían detectarse transcritos en niveles bajos que no necesariamente indicarían una posterior recaída (Krönke *et al.*, 2011). Sin embargo, la detección de transcritos en SP (en una proporción de ≥ 1 copia *NPM1* en 100.000 copias gen control) después de la consolidación o en el seguimiento se asocia con una probabilidad más elevada de recaída (Ivey *et al.*, 2016).

Todavía es un tema en discusión si otras técnicas como la CFM y la NGS pueden ser empleadas para proporcionar información complementaria, especialmente en aquellos pacientes que presentan recaídas sin la mutación en el gen *NPM1*, a pesar de haber sido positivos para dicha mutación en el momento del diagnóstico (Cocciardi *et al.*, 2019; Giupponi *et al.*, 2023; Herold *et al.*, 2017; Höllein *et al.*, 2018).

Citometría de flujo en el seguimiento de la LMA *NPM1*

La CFM juega un papel importante en el seguimiento de la LMA, siendo aplicable en el 85-90% de los casos de LMA, (Al-Mawali *et al.*, 2008, 2009; DiNardo & Luger, 2012; Kern *et al.*, 2010; Ossenkoppele *et al.*, 2011; Paiva *et al.*, 2021; Terwijn *et al.*, 2014; Vidriales *et al.*, 2003). La posibilidad de analizar un gran número de células y su viabilidad de forma rápida (sensibilidad 10^{-3} a 10^{-5}) son algunas de las ventajas que han facilitado su implementación como técnica de detección de ERM en LMA. La aplicación de esta técnica, que requiere de personal altamente especializado, debe considerar varios factores que abarcan desde la obtención, procesamiento y la adquisición de la muestra hasta la interpretación y el informe de los resultados (Tettero *et al.*, 2022). La complejidad de los análisis se ve incrementada con la detección de diferentes clones leucémicos con rasgos fenotípicos diferentes, junto con la presencia de precursores mieloides en regeneración, en ocasiones con alteraciones inmunofenotípicas transitorias, y de poblaciones minoritarias que pueden confundirse con las células de la ERM (Eckel *et al.*, 2020; Hanekamp *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021).

El panel de expertos de la ELN recomienda una doble aproximación para el análisis de ERM, centrada por una parte en la identificación de células leucémicas a través de la caracterización de los fenotipos asociados a leucemia (LAIP, del inglés *Leukemia Associated ImmunoPhenotypes*) detectados al diagnóstico, combinada con la búsqueda de poblaciones celulares que muestren alteraciones inmunofenotípicas no presentes o infrecuentes en las células hematopoyéticas normales llamada aproximación “Diferente de lo Normal” (DfN, del inglés *Different-from-Normal*) (Heuser

et al., 2021; Schuurhuis *et al.*, 2018). Este abordaje conjunto permite el seguimiento de clones iniciales y emergentes que surgen durante la evolución clonal de la enfermedad y que pueden presentar características inmunofenotípicas diferentes a las detectadas al diagnóstico.

Se ha demostrado que el punto de corte más adecuado para evaluar el pronóstico de los pacientes tratados con quimioterapia intensiva, basándose en el estudio de ERM mediante CFM en post-inducción es del 0,1% (Paiva *et al.*, 2021). Este valor, calculado sobre el total de leucocitos CD45⁺, está también reconocido por la ELN como el umbral de positividad para la detección de ERM por CFM. Sin embargo, niveles de ERM inferiores al 0,1% podrían seguir indicando la presencia de enfermedad activa (Venditti *et al.*, 2019) y posiblemente ser el origen de una recaída de la leucemia.

1.4. Evolución clonal

El proceso de evolución y progresión de la LMA es el resultado de la variabilidad genética adquirida por el clon original y la consecuente selección de subclones con características adaptativas superiores y perfiles mutacionales con fenotipos distintos (Greaves & Maley, 2012; Morita *et al.*, 2020; Nowell, 1976; Vosberg & Greif, 2019).

En las recaídas de la leucemia se identifican dos principales patrones de evolución. En el primero, el clon mayoritario al diagnóstico adquiere nuevas mutaciones y se transforma en el clon que provocará la recaída; mientras que, en el segundo, un clon minoritario presente al diagnóstico adquiere nuevas mutaciones que le permiten adaptarse mejor a su entorno, encontrar un nicho para escapar de la terapia y eventualmente progresar provocando la recaída de la enfermedad (Ding *et al.*, 2012). Estos dos patrones de recaída también se pueden explicar por la presencia de LSC o células más comprometidas que mantienen propiedades de célula *stem* y que sobreviven al tratamiento (Shlush *et al.*, 2017). El modelo de evolución en las LMA que no presentan cambios en el perfil mutacional entre el diagnóstico y la recaída representa un desafío para la comprensión de los mecanismos subyacentes a la recaída.

Por otra parte, la persistencia de mutaciones observadas al diagnóstico en un paciente que ha alcanzado remisión completa puede reflejar:

- Reparición de hematopoyesis clonal que existía antes del diagnóstico de la LMA y que podría implicar sólo un bajo riesgo de recaída.
- Persistencia de células leucémicas residuales con riesgo de recaída.
- Proceso de evolución clonal distinto no relacionado con la LMA inicial.

Por lo tanto, tras el tratamiento puede resultar complicado distinguir qué alteraciones indican la presencia de células leucémicas y cuáles podrían estar relacionadas con hematopoyesis clonal, lo que dificulta determinar qué implicaciones tiene la detección de estas mutaciones con respecto al riesgo de recidiva de la enfermedad (Hasserjian *et al.*, 2020). Esto, unido a que la evolución clonal es un proceso dinámico definido por múltiples características específicas del paciente y del tratamiento que interactúan entre sí y que por otro lado se desconocen los eventos que conducen a cada proceso evolutivo, hacen más complejo su estudio y conocimiento.

1.5. Resumen

El diagnóstico de la LMA con mutación de *NPM1* se basa en la identificación precisa de esta alteración mediante técnicas moleculares. Este diagnóstico debe realizarse desde una perspectiva integradora, complementando la información molecular con el inmunofenotipo, la citogenética y la morfología. Aunque esta mutación delimita una entidad molecular bien definida, la LMA con mutación en *NPM1* presenta una notable heterogeneidad inmunofenotípica, reflejada en diferentes patrones que pueden identificarse mediante CFM.

En general, la presencia de esta mutación se asocia a un pronóstico favorable, aunque su impacto puede variar en función de las comutaciones asociadas. Para la monitorización de la ERM en la LMA con mutación de *NPM1*, el método de elección es la RT-qPCR. Sin embargo, papel de la CFM y la NGS aún no está establecido, especialmente en aquellos pacientes que presentan recaídas sin la mutación *NPM1*, lo que limita el seguimiento exclusivo mediante RT-qPCR. En estos casos, la CFM ofrece la ventaja de detectar células residuales compatibles con ERM a bajas frecuencias, utilizando una doble aproximación para su análisis basada en la detección de *LAIP* y *DfN*.

Finalmente, el estudio de los mecanismos subyacentes a la evolución clonal en pacientes con LMA con mutación en *NPM1* resulta fundamental para comprender el papel de las mutaciones adicionales en las células leucémicas en el contexto de la recaída, así como para evaluar su influencia en el riesgo de recidiva de la enfermedad.

Esta entidad representa una oportunidad para el estudio de la ERM y de la evolución clonal, debido a que la mutación está presente desde los estadios iniciales de la leucemogénesis y a su vez presenta una gran estabilidad a la recaída de la LMA, donde es posible observar clones diferentes al original.

2. HIPÓTESIS

La caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo multiparamétrica junto a la separación celular de las poblaciones leucémicas en la LMA con mutación de *NPM1* en diferentes momentos de estudio permitiría una valoración molecular individualizada mediante NGS de los diferentes compartimentos leucémicos implicados en la enfermedad.

La integración secuencial de estas tres técnicas (citometría de flujo multiparamétrica, separación celular y NGS) para la determinación de la firma genética y funcional de los distintos subclones leucémicos posibilitaría dilucidar los patrones inmunofenotípicos asociados a la resistencia leucémica, así como desentrañar la jerarquía y la evolución clonal en este subtipo de leucemia. Esto podría ser clave para entender los mecanismos de resistencia e identificar nuevas dianas terapéuticas.

La monitorización en paralelo por citometría de flujo multiparamétrica facilitaría la identificación de los pacientes en los que la RT-qPCR no detectara células residuales leucémicas debido a un cambio del perfil mutacional. Esta aproximación permitiría identificar a los pacientes que podrían beneficiarse de la citometría de flujo multiparamétrica frente a la RT-qPCR como técnica de seguimiento de la enfermedad residual medible.

3.OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio fue la caracterización inmunofenotípica y molecular al diagnóstico y durante el seguimiento de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1* para determinar los patrones inmunofenotípicos de las células leucémicas, así como establecer la jerarquía y la evolución clonal en este subtipo de leucemia, que nos permitan profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia e identificar potenciales dianas terapéuticas.

La consecución de este objetivo implica los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar fenotípica y genotípicamente la jerarquía clonal de las poblaciones leucémicas en la médula ósea de pacientes con LMA *NPM1* en el momento del diagnóstico inicial.

1.1. Implementar un panel de marcadores que mediante una estrategia de CFM permita analizar el patrón madurativo y la heterogeneidad inmunofenotípica del compartimento leucémico.

1.2. Aislar mediante separación celular por CFM los diferentes compartimentos leucémicos con el fin de determinar las mutaciones fundadoras de la enfermedad y las responsables de la transformación leucémica, mediante estudios de secuenciación masiva, empleando un panel de mutaciones recurrentes en LMA.

2. Estudiar la ERM mediante CFM de los diferentes compartimentos leucémicos de la médula ósea de pacientes con LMA *NPM1* que alcancen remisión completa morfológica, y seleccionar mediante separación celular las diferentes poblaciones leucémicas (ERM+) para su posterior caracterización molecular mediante NGS.

3. Caracterizar fenotípicamente mediante CFM las poblaciones leucémicas en la médula ósea de pacientes con LMA *NPM1* en recaída o en progresión.

3.1. Determinar el patrón madurativo inmunofenotípico y la heterogeneidad clonal del compartimento leucémico en la recaída hematológica franca, comparándolo con el estudio del diagnóstico inicial.

3.2. Aplicar la separación celular por CFM de las células leucémicas presentes en la recaída para su posterior caracterización molecular mediante estudios de secuenciación masiva, comparándolo con el estudio del diagnóstico inicial.

4. Realizar el estudio en paralelo de la ERM de pacientes con LMA *NPM1* mediante CFM y RT-qPCR en distintos momentos y comparar los resultados con ambos métodos.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

Se estudiaron 91 pacientes adultos que fueron diagnosticados de leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1* entre mayo de 2016 y julio de 2023 en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (HUP La Fe).

Los criterios de elegibilidad de los pacientes para el estudio fueron los siguientes:

- Edad igual o superior a 18 años.
- Diagnóstico de LMA con mutación de *NPM1* siguiendo los criterios de la OMS según los diferentes periodos del estudio:
 - OMS 2008, durante el periodo comprendido entre mayo y septiembre de 2016.
 - OMS 2017, durante el periodo comprendido entre octubre de 2016 y julio de 2022.
 - OMS 2022, durante el periodo comprendido entre agosto de 2022 y julio de 2023.
- Disponibilidad de muestra (sangre periférica o médula ósea) para el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo.

Todos los pacientes fueron informados acerca del estudio y firmaron el consentimiento redactado en cumplimiento de las normas éticas requeridas en la Declaración de Helsinki, Declaración de los Derechos Humanos y los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y las normas de bioética. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia (IIS La Fe).

4.2. Información analítica y estudio morfológico

El hemograma y el mielograma fueron realizados en el Laboratorio de Citomorfología de la Unidad de Diagnóstico Hematológico (UDHEM) del Servicio de Hematología del HUP La Fe. El hemograma se procesó según la etapa del estudio utilizando dos contadores celulares diferentes: Coulter DXH800 (de 2010 hasta noviembre 2019) y Coulter DXH900 (de noviembre de 2019 hasta la actualidad) (Beckman Coulter, San Diego, CA, EEUU). Los resultados del hemograma, bioquímica sérica y hemostasia se obtuvieron a partir de los datos incluidos en los Sistemas de Información de Laboratorio (GestLab, Indra).

4.3. Citometría de flujo multiparamétrica

Los estudios de CFM se realizaron siguiendo los protocolos recomendados por el Grupo EuroFlow en muestras de médula ósea y/o sangre periférica anticoaguladas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al diagnóstico y en diferentes momentos evolutivos de la enfermedad.

El procesamiento de las muestras al diagnóstico y en la recaída se efectuó utilizando inicialmente el tubo de orientación de leucemia aguda (ALOT, del inglés *acute leukemia orientation tube*) según se muestra en la **Tabla 1** y el panel de LMA/SMD del Grupo EuroFlow (Van Dongen *et al.*, 2012) tras confirmar la línea mieloide. A lo largo del estudio, se ha utilizado el tubo ALOT en dos formatos diferentes; la combinación de los AcMo fue la misma en ambos. En el primer formato de tubo, los anticuerpos monoclonales (AcMo) se dispensaron de forma manual tal y como se indica en la **Tabla 1**; mientras que, en el segundo, todos los AcMo estaban liofilizados e incluidos en un mismo vial (Cytognos, Salamanca, ES) (**Tabla 2**). Ambas opciones fueron recomendadas y validadas por el Grupo EuroFlow.

El tubo ALOT permitió establecer el linaje de las células leucémicas (mieloide, linfóide B, T, NK o fenotipo mixto) presentes en cada muestra. En función del resultado de este tubo, se amplió el estudio con el panel de EuroFlow adecuado según el linaje. El panel de LMA/SMD consta de 7 combinaciones de 8 AcMo conjugados con fluorocromos según se muestra en la **Tabla 3**. El clon, el fabricante y el volumen empleado de dichos AcMo se indican en la **Tabla 4**. Puesto que en este estudio se incluyeron sólo pacientes con diagnóstico de LMA o SMD, en todos ellos se aplicó únicamente el panel de LMA/SMD para la caracterización de las células leucémicas de linaje mieloide. Dicho panel permite además el estudio de las diferentes subpoblaciones residuales de la línea mieloide que incluye las series granulocítica, monocítica y eritroide, así como otras poblaciones minoritarias como los basófilos, los mastocitos, las células dendríticas plasmocitoides (CDp) y las células mesenquimales.

Las variaciones en cuanto a clon, casa comercial y/o volumen de los AcMo en el tubo ALOT y en el resto de las combinaciones incluidas en el panel de LMA/SMD se han realizado de acuerdo con las sucesivas actualizaciones publicadas por el grupo EuroFlow (www.EuroFlow.org).

Tabla 1. Tubo de orientación a leucemia aguda (del inglés, *acute leukemia orientation tube*, ALOT) propuesto por el Grupo EuroFlow.

FLC	PacB	HV500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
AcMo	CD3c*	CD45 [†]	MPOc [§]	CD79ac [§]	CD34*	CD19 [‡]	CD7*	CD3s*
Vol (μL)	7	5	3	5	10	5	2	3
Clon	UCHT-1	2D1	MPO-7	HM57	8G12	J3-119	124-1D1	SK7

FLC: fluorocromo; AcMo: anticuerpo monoclonal; Vol: volumen; PacB: pacific blue; HV500: *horizon violet* 500; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCPCy5.5: proteína peridín clorofila con cianina 5.5 en tándem; PECy7: ficoeritrina con cianina 7 en tándem; APC: alofococianina; APCH7: alofococianina con cianina H7 en tándem; c: citoplasmático; s: superficie. Fabricantes: *BD Biosciences, [†]Invitrogen, [§]Dako, [‡]Beckman Coulter y ^{*}eBioscience.

Tabla 2. Tubo de orientación a leucemia aguda (del inglés, *acute leukemia orientation tube*, ALOT) basado en EuroFlow (Cytognos, Salamanca, España).

FLC	PacB	OC515	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APC-C750
AcMo	CD3c	CD45	MPOc	CD79ac	CD34	CD19	CD7	CD3s
Clon	UCHT-1	GA90	2C7	HM57	581	SA287	HULY-M2	UCHT-1

FLC: fluorocromo; AcMo: anticuerpo monoclonal; PacB pacific blue; OC515: orange cytognos 515; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCPCy5.5: proteína peridín clorofila con cianina 5.5 en tándem; PECy7: ficoeritrina con cianina 7 en tándem; APC: alofococianina; APC-C750: alofococianina con cianina 7 en tándem; c: citoplasmático; s: superficie. El reactivo contiene dos viales liofilizados: uno con los AcMo de superficie, del cual se añaden 30 μL a la muestra, y otro con los AcMo citoplasmáticos, del cual se añaden 15 μL.

Tabla 3. Panel de 7 tubos para el estudio de LMA/SMD propuesto por el Grupo EuroFlow.

Tubo/FLC	HV450	HV500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	HLA-DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
2	HLA-DR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14
3	HLA-DR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
4	HLA-DR	CD45	nuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
5	HLA-DR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD42a+ CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
7	HLA-DR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9

FLC: fluorocromo; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCPCy5.5: proteína peridín clorofila con cianina 5.5 en tándem; PECy7: ficoeritrina con cianina 7 en tándem; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina con cianina 7 en tándem; HV500: *horizon violet* 500 nu: nuclear.

Tabla 4. Listado de los anticuerpos monoclonales, fluorocromos, clones y volumen de marcaje utilizados en el panel de LMA/SMD propuesto por el Grupo EuroFlow.

AcMo	FLC	Clon	Volumen (μL)	AcMo	FLC	Clon	Volumen (μL)
CD4	APCH7	SK3	5	CD41a	FITC	HIP8	20
CD7	APC	M-T701	5	CD42a	FITC	BeB1	20
CD9	APCH7	M-L13	10	CD42b	APC	HIP1	1
CD10	APCH7	HI10A	5	CD45	HV500	2D1	5
CD11b	APC	D12	5	CD56*	PE	C5.9	5
CD13	PE	L138	7	CD61	FITC	RUU-PL7F12	4
CD14	APCH7	MφP9	5	CD64	PE	10.1	20
CD15	FITC	MMA	10	CD71	APCH7	M-A712	2
CD16	FICT	CLB-Fc-gran/1	20	CD105	PE	266	5
CD19	APCH7	SJ25C1	5	CD117 [†]	PECy7	104D2D1	5
CD22	APC	S-HCL-1	5	CD123 [‡]	APC	AC145	1
CD25	PE	2A3	10	CD203c [†]	PE	97A6	10
CD33	APC	P67.6	10	CD300e	APC	UPH2	5
CD34	PerCPCy5.5	8G12	10	HLA-DR	HV450	L243	5
CD35	FITC	E11	5	NG2 [†]	PE	7.1	10
CD36	FITC	CLB-IVC7	5	nuTDT [§]	FITC	HT-6	10
CD38	APCH7	HB7	3				

AcMo: anticuerpo monoclonal; FLC: fluorocromo; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCPCy5.5: proteína peridinín clorofila con cianina 5.5 en tándem; PECy7: ficoeritrina con cianina 7 en tándem; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina con cianina 7 en tándem; nu: nuclear. Todos los AcMo son de BD Biosciences, excepto *Cytognos, [†]Beckman Coulter, [‡]Milteny Biotec y [§]Dako.

A continuación, se detalla la utilidad del tubo ALOT y de cada una de las combinaciones incluidas en el panel de LMA/SMD de EuroFlow (Van Dongen *et al.*, 2012).

Tubo ALOT

Esta combinación de AcMo se utilizó en la evaluación inicial y permitió establecer el linaje de las células leucémicas presentes en cada muestra. La mieloperoxidasa citoplasmática (MPOc) se expresa en las células de estirpe mieloide. CD3 en superficie y citoplasma (CD3c) es un marcador específico de linaje T, junto con CD7, que además también es positivo en las células NK y que se ha descrito en algunos casos de LMA.

CD19 y CD79a citoplasmático (CD79ac) son marcadores de linaje B expresados desde las etapas más tempranas en dicha línea.

Puesto que uno de los criterios de inclusión en el estudio fue el diagnóstico de LMA *NPM1*, se seleccionaron los casos en los que el tubo ALOT orientó a linaje mieloide para posteriormente completar el estudio inmunofenotípico con el panel de LMA/SMD.

Panel LMA/SMD

El panel de LMA/SMD presenta cuatro AcMo comunes en todos los tubos (HLA-DR-HV450, CD45-HV500, CD34-PerCPCy5.5 y CD117-PECy7) que permitieron la identificación de la mayoría de las células leucémicas y ayudaron a determinar la presencia de las poblaciones residuales. Además, cada tubo se completa con cuatro AcMo adicionales destinados a la caracterización de las células leucémicas, la valoración del estadio de maduración de los principales linajes mieloides y la discriminación de otras subpoblaciones menos frecuentes.

Tubo 1

Esta combinación está dirigida a la caracterización inmunofenotípica del patrón de maduración del linaje granulocítico desde los precursores más iniciales hasta los neutrófilos. Los marcadores CD10, CD11b, CD13 y CD16 presentan un perfil de expresión diferente según la etapa en la que se encuentren las células (**Figura 5**) permitiendo la identificación de los siguientes estadios madurativos (Matarraz *et al.*, 2010; Orfao *et al.*, 2019):

- promielocitos CD117⁺/CD13^{+a}/CD11b⁻/CD16⁻/CD10⁻
- mielocitos CD117⁻/CD13⁻/CD11b^{-/+d}/CD16⁻/CD10⁻
- metamielocitos CD117⁻/CD13^{-/+d}/CD11b⁺/CD16⁺/CD10⁻
- cayados CD117⁻/CD13⁺/CD11b⁺/CD16^{+a}/CD10⁻
- neutrófilos CD117⁻/CD13⁺/CD11b⁺/CD16^{+a}/CD10⁺

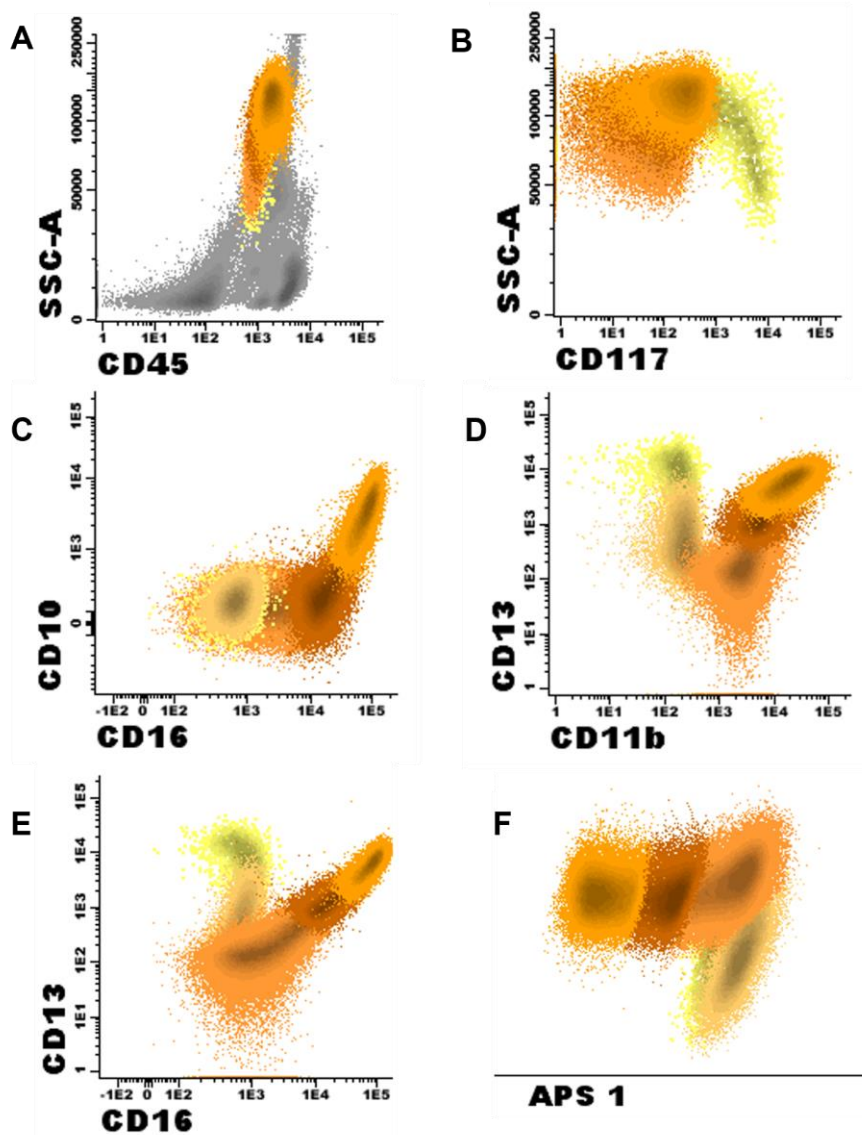


Figura 5. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo en los que se muestran la serie granulocítica con diferenciación a neutrófilo según la expresión de CD45 (A), CD117 (B), y según los patrones de maduración de CD10/CD16 (C), CD13/CD11b (D) y CD13/CD16 (E) y el diagrama adimensional de separación automática de poblaciones (del inglés, *Automatic Population Separation*) (F). Estos diagramas permiten discriminar los diferentes estadios madurativos de la serie granulocítica analizando de forma conjunta todos los parámetros incluidos en el tubo 1 del panel de LMA/SMD.

Tubo 2

La segunda combinación del panel posibilitó la valoración del patrón de maduración inmunofenotípico del linaje monocítico que se caracteriza por la expresión intensa de HLA-DR y de CD64 desde las células más inmaduras con expresión débil hasta fuerte en los monocitos maduros. Los marcadores CD14, CD35 y CD300 se expresan de manera diferente según la etapa madurativa (**Figura 6**), identificándose los siguientes elementos celulares (Matarraz *et al.*, 2017):

- monoblastos CD34^{+/}/CD117⁺/CD14⁻/CD35⁻/CD300⁻
- promonocitos CD34⁻/CD117⁻/CD14^{+/}/CD35^{+/}/CD300⁻
- monocitos CD34⁻/CD117⁻/CD14⁺/CD35⁺/CD300⁺

Tubo 3

Permitió el estudio de la diferenciación del linaje eritroide mediante los marcadores CD36, CD71 y CD105 expresados en función de la etapa madurativa en la que se encuentre la célula (**Figura 7**). Se identifican los siguientes estadios (Westers *et al.*, 2017):

- proeritroblastos CD45^d/CD117⁺/CD105⁺/CD36⁺/CD71⁺
- eritroblastos basófilos CD45^d/CD117⁻/CD105⁺/CD36⁺⁺/CD71⁺
- eritroblastos policromatófilos CD45⁻/CD117⁻/CD105⁻/CD36⁺/CD71⁺
- eritroblastos ortocromáticos CD45⁻/CD117⁻/CD105⁻/CD36^{+/}/CD71⁺

La expresión de CD33 está ausente durante la diferenciación eritroide y se utilizó como marcador de exclusión, además de proporcionar información sobre las líneas granulocítica y monocítica. En este proyecto sólo se evaluó la proporción de proeritroblastos y de forma global el resto de las células eritroides nucleadas más maduras.

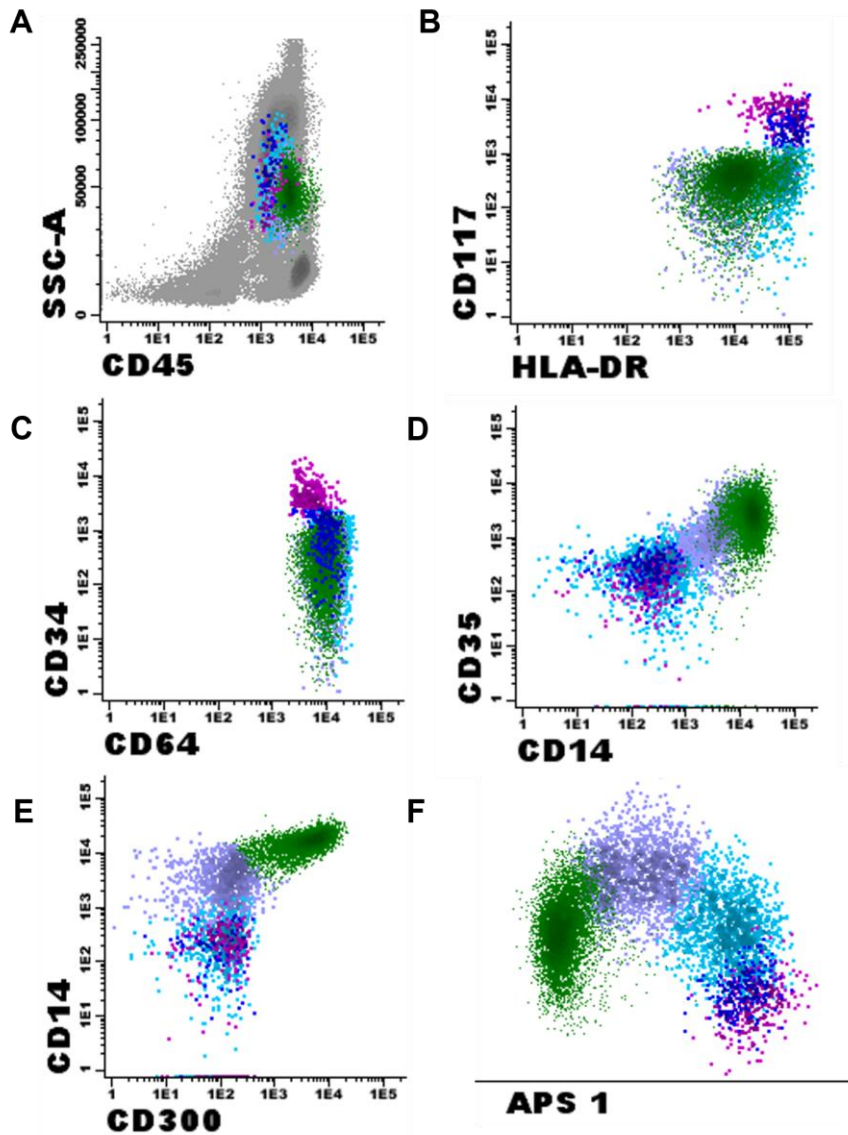


Figura 6. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo en los que se muestran la serie monocítica según la expresión de CD45 (A), CD117/HLA-DR (B), CD34/CD64 (C) y los patrones de maduración CD35/CD14 (D) y CD14/CD300e (E) y el diagrama adimensional de separación automática de poblaciones (del inglés, *Automatic Population Separation*) (F). Estos diagramas permiten discriminar los diferentes estadios madurativos de la serie monocítica analizando de forma conjunta todos los parámetros incluidos en el tubo 2 del panel de LMA/SMD.

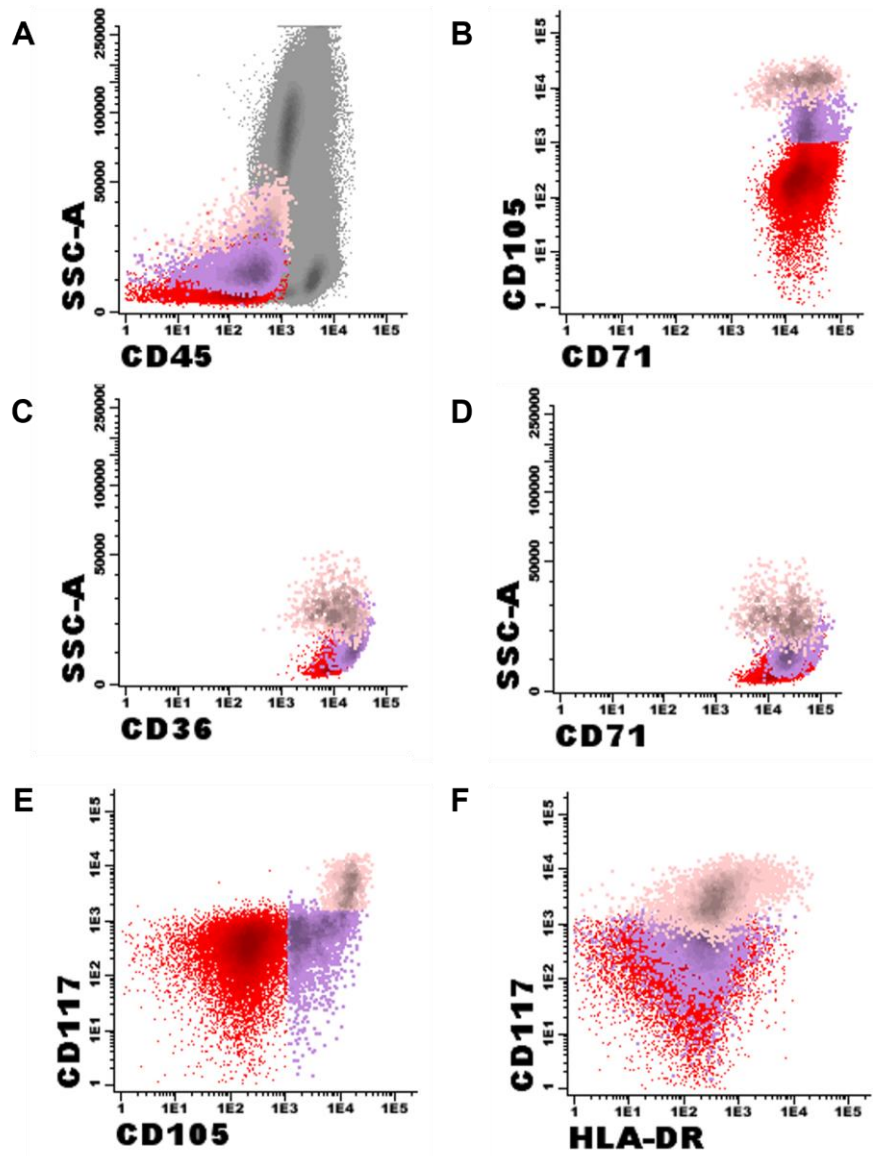


Figura 7. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo en los que se muestran los patrones de maduración de la serie eritroide según la expresión de CD45 (A), CD105/CD71 (B), CD36 (C), CD71 (D) CD117/CD105 (E) y CD117/HLA-DR (F) utilizando el tubo 3 del panel de LMA/SMD.

Tubo 4

Esta combinación, sin especial enfoque en ningún linaje celular, se utilizó para la identificación de las diferentes poblaciones linfocitarias: células B (CD19⁺); células T (CD7⁺) y células NK (CD7⁺ y CD56⁺), así como para la detección de infidelidad de línea de la serie mieloide. El análisis de esta combinación facilitó la detección de patrones de expresión atípicos de marcadores linfoides en las células leucémicas mieloides y posibilitó la identificación de alteraciones en la maduración linfoide B con la evaluación de TdT y de CD34.

Tubo 5

Este tubo contiene varios marcadores que proporcionaron información útil sin especial enfoque en ningún linaje celular. NG2 está ausente en las células hematopoyéticas normales, pero su expresión se ha asociado a leucemias con alteraciones moleculares del gen *KMT2A*, anteriormente *MLL* (Mauvieux *et al.*, 1999). El antígeno CD22 se expresa en las células B, así como en basófilos y CDp; su expresión en la LMA es muy poco frecuente y puede estar reflejando compromiso madurativo hacia basófilo, mastocito o célula dendrítica (Bueno *et al.*, 2004). CD15 se expresa con intensidad desde los primeros estadios madurativos de la serie granulocítica y de manera más débil en el linaje monocítico (Van Dongen *et al.*, 2012). La mayoría de las células mieloides expresan CD38, antígeno ausente en las células progenitoras hematopoyéticas no comprometidas (CD34⁺/CD38⁻) o células madre hematopoyéticas (Bonnet & Dick, 1997).

Tubo 6

La combinación de anticuerpos presente en este tubo permitió la identificación de poblaciones menos frecuentes como mastocitos, basófilos y CDp así como la compromiso hacia línea megacariocítica. Los marcadores CD42 y CD61 (unidos a un mismo fluorocromo) son útiles para la identificación de las células megacariocíticas y por lo tanto en los casos de leucemia megacariocítica. Ambos marcadores se expresan desde etapas tempranas de la diferenciación de esta línea celular. El anticuerpo CD123 se evalúa en combinación con el marcador HLA-DR para la identificación de CDp y basófilos (Martín-Martín *et al.*, 2009; Orfao *et al.*, 2019):

- CDp: CD123⁺/HLA-DR⁺/CD4⁺
- basófilos: CD203c⁺/CD123⁺/HLA-DR⁻

CD203c se utilizó junto con CD117⁺ para la identificación de mastocitos y junto con CD4 para las células monocíticas (**Figura 8**).

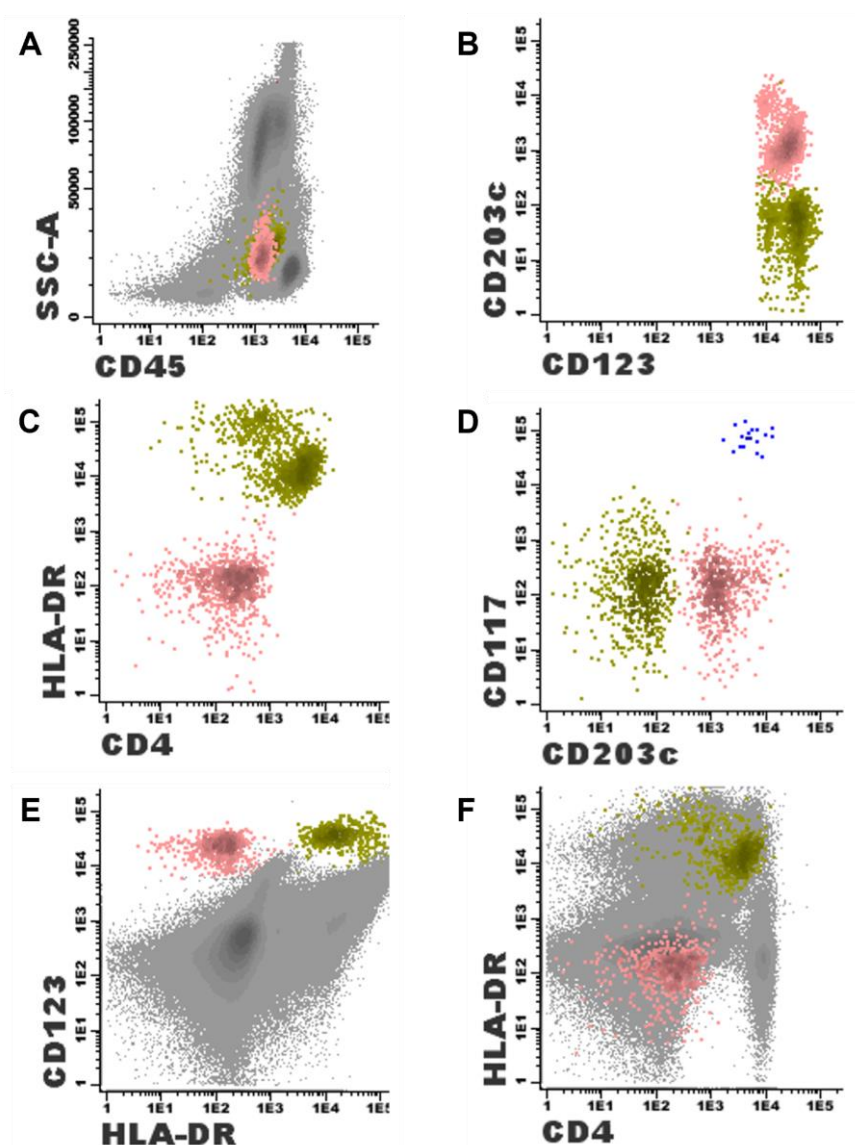


Figura 8. Diagramas biparamétricos obtenidos por citometría de flujo que permiten la identificación de las células dendríticas plasmocitoides (ocre), los basófilos (rosa) y los mastocitos (azul) según la expresión de CD45 (A), CD203c/CD123 (B) HLA-DR/CD4 (C), CD117/CD203c (D), CD123/HLADR (E) y HLA-DR/CD4 (F) utilizando el tubo 6 del panel de LMA/SMD.

Tubo 7

Incluye marcadores de línea megacariocítica CD9, CD41 y CD42b que posibilitaron el estudio de la diferenciación de esta estirpe celular y su implicación en la

leucemia. Este tubo está también orientado a la detección de mastocitos con inmunofenotipo atípico CD25⁺. Por otra parte, se ha descrito la asociación de la positividad para CD25 en las células leucémicas con la detección de mutaciones en el gen *FLT3* (Angelini *et al.*, 2015; Travaglini *et al.*, 2020).

Tras la identificación y caracterización de las células leucémicas al diagnóstico, y la valoración del patrón madurativo de las diferentes células mieloides residuales presentes en las muestras, se definieron las alteraciones inmunofenotípicas y los patrones anómalos de expresión antigénica observados en cada paciente necesarios para la detección posterior de la ERM en los distintos momentos evolutivos. En función de esta información, se seleccionaron al diagnóstico los tubos del panel de LMA/SMD más útiles para realizar la monitorización de ERM. Las combinaciones elegidas se orientaron en función del inmunofenotipo inicial teniendo en cuenta las alteraciones y los patrones de expresión anómala de las células neoplásicas en el momento del diagnóstico, lo que permitió la detección posterior de la ERM de forma individualizada en cada paciente. En algunos pacientes, fue necesario incorporar tubos adicionales modificados del panel de LMA/SMD de EuroFlow, adaptándolos a alteraciones específicas identificadas al diagnóstico que facilitaron el seguimiento de la ERM de estos casos.

Aunque la mayoría de los patrones de expresión y maduración normales se encuentran descritos en la literatura, las recomendaciones de los expertos (Heuser *et al.*, 2021; Tettero *et al.*, 2022) aconsejan el análisis de archivos de médula ósea normal para la evaluación y comparación de muestras patológicas. Con este objetivo, se procesaron 43 muestras de médula ósea de pacientes control sin infiltración neoplásica ni alteraciones morfológicas. Dada la dificultad de obtención de este tipo de muestras de individuos sanos se utilizaron muestras sin alteraciones morfológicas procedentes de pacientes sin patología neoplásica mieloide cuya sospecha diagnóstica inicial fue descartada. Previo al análisis de las muestras se establecieron una serie de criterios de selección que debían cumplir los archivos *fcs: estabilidad fluidica durante la adquisición, correcta compensación, muestra representativa de médula ósea no contaminada con sangre periférica (Flores-Montero *et al.*, 2017). Tras este cribado inicial, finalmente se incluyeron un total de 20 muestras control de médula ósea de pacientes adultos sin infiltración neoplásica mieloide.

4.3.1. Controles de calidad, estandarización y calibración

Para asegurar la comparabilidad de los resultados intra-laboratorio obtenidos a lo largo del tiempo, así como la obtención de resultados objetivos y reproducibles mediante citometría de flujo se realizó el control de calidad diario de los citómetros FACSCanto-II utilizando las microesferas BD FACSDiva™ CS&T IVD (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) previamente a la adquisición de las muestras. Por otra parte, la estandarización, calibración y compensación de los citómetros se llevó a cabo siguiendo los procedimientos operativos estándar de EuroFlow (Kalina *et al.*, 2012).

Respecto al control externo de calidad, el Laboratorio de Citometría de Flujo de la Unidad de Diagnóstico Hematológico del HUP La Fe participa anualmente desde 2015 en el programa de evaluación de la calidad de los protocolos de EuroFlow (QA LST EuroFlow) para el diagnóstico y monitorización de neoplasias hematológicas (Kalina *et al.*, 2015).

4.3.2. Procesamiento de las muestras para citometría

Se incluyeron un total de 271 muestras: 91 al diagnóstico, 144 en el seguimiento de la enfermedad (para ERM), y 36 en recaída/resistencia.

En lo que respecta al diagnóstico y la recidiva, siempre que fue posible se realizó el estudio inmunofenotípico en médula ósea. Sólo en aquellos casos en los que el material medular fue insuficiente, se procesó sangre periférica. En cuanto a la detección de ERM, siempre se efectuó el análisis en médula ósea.

Al diagnóstico se realizaron 47 estudios en MO, 19 en SP y en los 25 restantes se evaluaron ambos tipos de muestra.

Brevemente, la técnica consistió en una primera incubación de 50 uL de la muestra durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con los AcMo de superficie previamente pipeteados en los tubos según los volúmenes indicados en la **Tabla 4**. A continuación, se lisaron los hematíes durante 10 minutos con la solución FACS Lysing (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) y se realizaron dos lavados consecutivos por centrifugación (540 g, 5 minutos), el primero para eliminar la solución FACS Lysing tras la hemólisis y el segundo con tampón de lavado BD Pharmingen Stain Buffer (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU). A continuación, se resuspendió el botón celular con la solución BD FACS Flow (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) y posteriormente se adquirieron las células en el citómetro de flujo. En el caso de combinaciones de AcMo de superficie con citoplasmáticos y/o nucleares se incluyeron dos pasos adicionales:

inicialmente se efectuó una fijación con la solución A del kit Fix&Perm™, seguida de una incubación (15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente) y de un lavado por centrifugación con tampón de lavado BD Pharmingen Stain Buffer (540 g, 5 minutos); y un segundo paso de permeabilización con la solución B del kit Fix&Perm™, añadiendo los AcMo de marcaje citoplasmático y/o nuclear, seguido de una incubación (15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente) y de un lavado por centrifugación con tampón de lavado (540 g, 5 minutos). Finalmente, se resuspendió el botón celular con la solución BD FACS Flow para la adquisición de las células en el citómetro de flujo.

En el caso de las muestras para estudio de ERM, se personalizó la selección de los tubos específicos del panel de LMA según las alteraciones de cada paciente tal y como se ha detallado anteriormente. Las células se marcaron siguiendo el mismo procedimiento utilizado con las muestras al diagnóstico.

4.3.3. Adquisición de células en el citómetro de flujo

Las muestras se adquirieron en un citómetro FACSCanto-II™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) y los archivos se exportaron a un recurso compartido del laboratorio para su posterior análisis. En aquellas muestras en las que fue posible, se adquirió un máximo de 1×10^6 células al diagnóstico. En los estudios de seguimiento de la enfermedad se adquirió todo el volumen de la muestra disponible en cada tubo.

4.3.4. Análisis manual de las muestras

El análisis de los datos de citometría se realizó de forma manual utilizando el programa Infinicyt 2.0 (Cytognos, Salamanca, ES). Se diseñó un perfil de análisis que incluía diagramas de puntos biparamétricos de tamaño o dispersión frontal de la luz (FSC, del inglés *Forward Scatter Component*) vs. granularidad/complejidad o dispersión ortogonal de la luz (SSC, del inglés *Side Scatter Component*), así como de cada una de las fluorescencias empleadas vs. SSC, y también diagramas con dos fluorescencias enfrentadas. Los diagramas de separación automática de poblaciones (APS, del inglés *Automated Population Separator*) se utilizaron de apoyo para la identificación de las poblaciones celulares durante el análisis.

4.3.4.1 Discriminación de dobletes y eliminación de células no viables

En cada una de las muestras, el análisis se inició con la exclusión de los dobletes (células adheridas que el citómetro no es capaz de discernir como células individuales) y de los agregados celulares. Para ello, se utilizó un diagrama biparamétrico en el que se representaron los parámetros de área de FSC (FSC-A) vs. altura de FSC (FSC-H) y

se seleccionaron los singletes (células individuales). A continuación, se eliminaron las células no viables identificadas por una pérdida de tamaño y/o complejidad en el diagrama de FSC vs. SSC (**Figura 9**). Se comprobó la estabilidad fluidica durante la adquisición de la muestra mediante la revisión de la evolución del parámetro tiempo. En caso de detectarse inestabilidad se excluyeron estos eventos del análisis final.

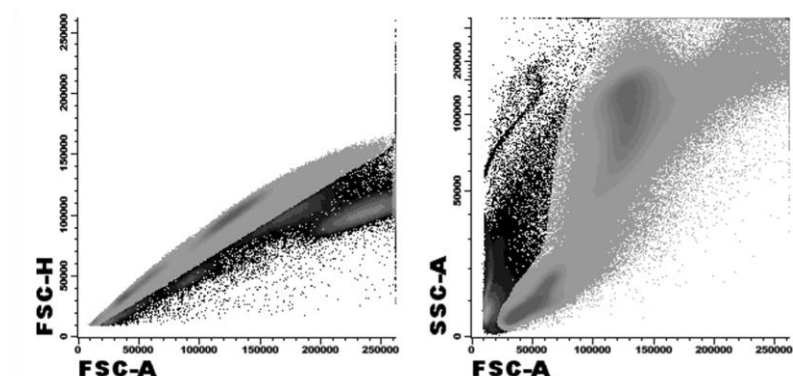


Figura 9. Diagramas biparamétricos de citometría utilizados para la eliminación de células no viables basándose en el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) relativos. El diagrama FSC-A vs. FSC-H permite la discriminación de dobletes, mientras que el diagrama FSC-A vs. SSC-A permite excluir las células no viables por su pérdida de tamaño y/o granularidad.

4.3.4.2 Identificación de poblaciones celulares

Las células hematopoyéticas en la médula ósea se caracterizan por un patrón específico de expresión de CD45, que permite la discriminación inicial de cada tipo celular en un diagrama biparamétrico junto con SSC (**Figura 10**). La selección de la población linfóide se realizó por la expresión intensa de CD45 y bajo SSC, excluyendo eventos celulares positivos para los marcadores no expresados en esta población (región azul). Los precursores hematopoyéticos CD34⁺ y las células más inmaduras se identificaron por la expresión débil de CD45 y SSC bajo (región rosa). En esta zona también se sitúan los basófilos y algunas células dendríticas que requirieron de marcadores adicionales necesarios para la caracterización precisa de estas poblaciones minoritarias. La serie granulocítica con diferenciación a neutrófilo se seleccionó a partir del estadio de los promielocitos con SSC elevado hasta los siguientes estadios madurativos con aumento en la expresión de CD45 (región amarilla) y junto a los neutrófilos con un mayor SSC se localizaron los eosinófilos (región naranja). La selección de la celularidad monocítica se realizó por SSC intermedio con una mayor intensidad de CD45 con respecto a las células precursoras hematopoyéticas (región

verde). En esta región también se identificaron algunas células dendríticas. Por último, la serie eritroide nucleada, que incluyó a los proeritroblastos y al resto de eritroblastos, se caracterizó por la ausencia de expresión de CD45 y SSC bajo (región roja).

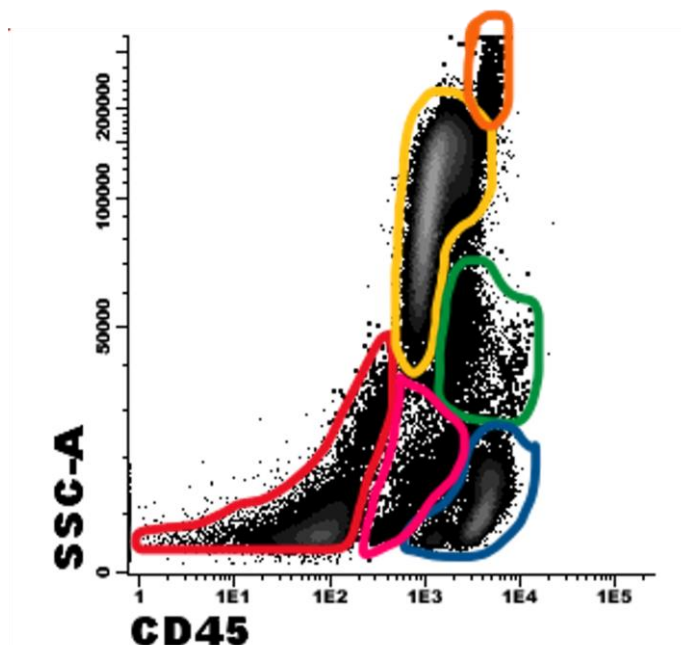


Figura 10. Diagrama biparamétrico de citometría de CD45 (antígeno leucocitario común) vs. SSC que permite analizar la distribución de las diferentes poblaciones de la médula ósea normal.

Como ya se ha comentado, el panel de LMA/SMD incluye AcMo en posiciones fijas y conjugados siempre con el mismo fluorocromo en todos los tubos del panel. Estos AcMo (CD34, CD45, CD117 y HLA-DR) son muy importantes para la correcta identificación de las subpoblaciones de precursores hematopoyéticos CD34⁺, ya que en la zona del diagrama de CD45 vs SSC en la que se sitúan (región rosa) también se localizan otras poblaciones celulares minoritarias. La estrategia de selección y análisis de estos marcadores junto con el resto de los anticuerpos de cada combinación del panel de LMA/SMD de EuroFlow utilizando los diagramas biparamétricos permitió la discriminación de todos los compartimientos celulares presentes en las muestras. En especial, el diagrama biparamétrico CD117 vs. HLA-DR fue especialmente útil, valorándose en el análisis de cada población (**Figura 11**).

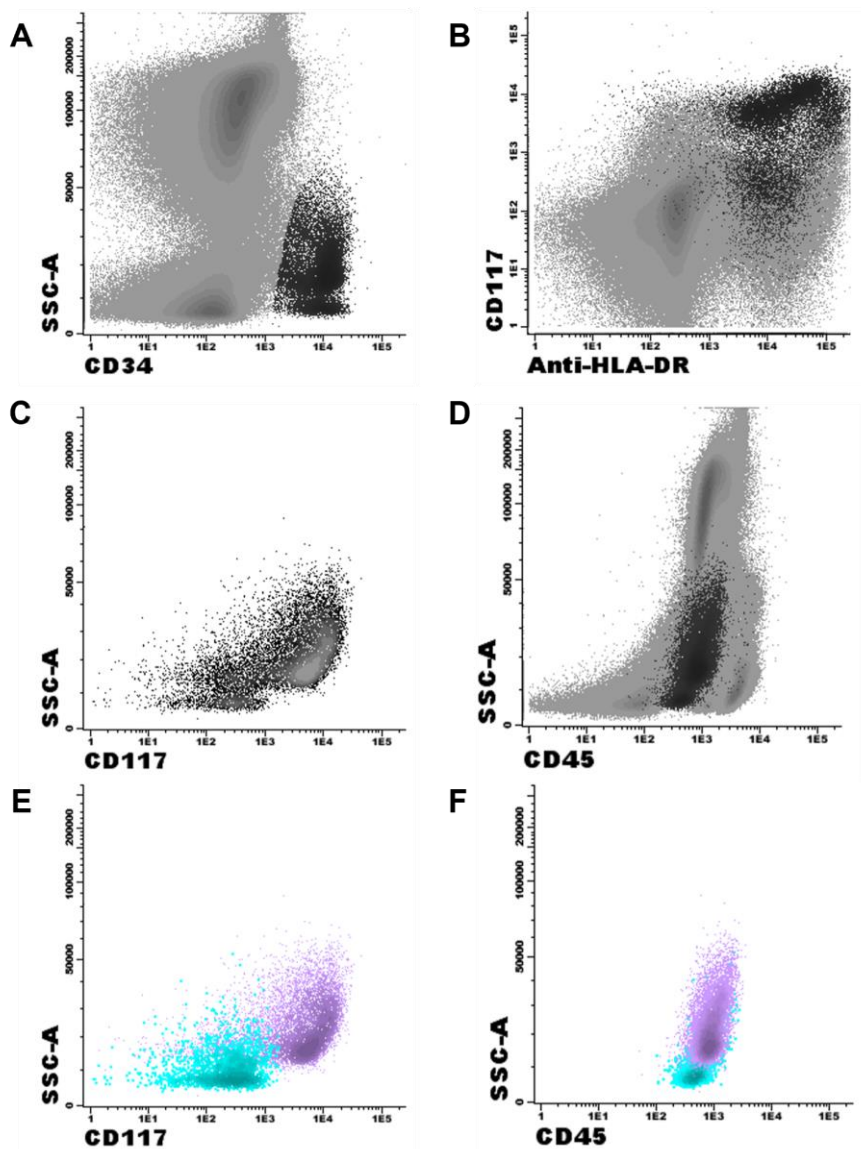


Figura 11. Diagramas biparamétricos de citometría de flujo en los que se muestra la expresión de los antígenos comunes a todos los tubos del panel de LMA/SMD del Grupo Euroflow (CD34, HLA-DR, CD117 y CD45) que permiten la identificación de las poblaciones de precursores hematopoyéticos según la expresión de CD34 (A), CD117/HLA-DR (B), CD117 (C) y CD45 (D). En los diagramas E y F se destaca la identificación de los progenitores hematopoyéticos, diferenciando entre mieloides (violeta) y los linfoides (azul).

4.3.4.3 Análisis por citometría al diagnóstico y en la recaída de la LMA *NPM1*

Tras los pasos iniciales para la eliminación de células no viables y dobletes y la selección de la población linfoide explicados anteriormente, se identificaron las células leucémicas en cada muestra. Inicialmente, la población o poblaciones leucémicas se

individualizaron en el diagrama biparamétrico de CD117 y HLA-DR dependiendo de qué población o poblaciones eran las patológicas en cada caso. Tal y como se ha indicado en la introducción y a modo de recordatorio, en la LMA *NPM1* generalmente se han descrito tres subgrupos de poblaciones de células leucémicas (Matarraz *et al.*, 2023).

El primer subgrupo de células con un perfil inmunofenotípico mieloide inmaduro se identificó como positiva para ambos marcadores CD117 y HLA-DR (**Figura 12**, azul); el segundo subgrupo de células comprometidas a linaje neutrófilo se seleccionó por CD117^{+/heterogéneo} HLA-DR⁻ (**Figura 12**, naranja) y, por último, un tercer subgrupo de células monocíticas con inmunofenotipo CD117^{variable} HLA-DR⁺ (**Figura 12**, verde). En este último subgrupo de células además se utilizó el diagrama biparamétrico CD64 vs. SSC para su identificación. La evaluación del resto de los marcadores del panel de LMA/SMD de EuroFlow expresados en las células monocíticas permitió confirmar y caracterizar esta línea celular.

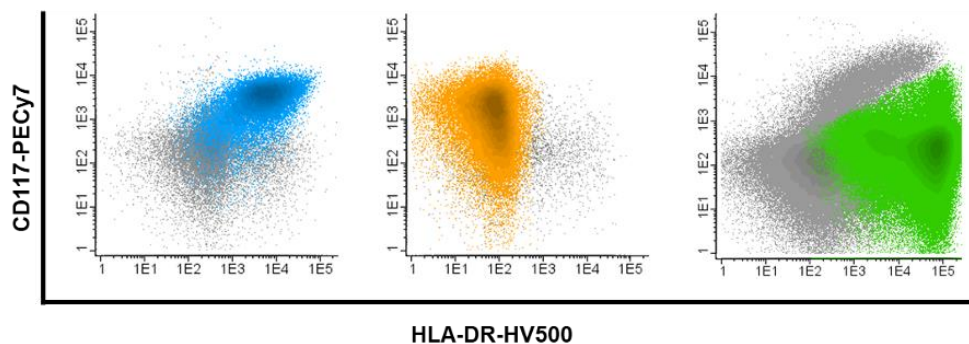


Figura 12. Diagramas biparamétricos de citometría que muestran la distribución de las tres poblaciones de células leucémicas según la expresión de los antígenos CD117 y HLA-DR. Población de células leucémicas inmaduras (azul), comprometidas a linaje neutrófilo (naranja) y monocíticas (verde).

Las combinaciones descritas anteriormente junto con el diagrama CD45 vs. SSC permitió la selección inicial, teniendo en cuenta que la localización de las poblaciones en una de las siguientes regiones del diagrama de CD45 vs. SSC: 1) expresión débil de CD45 vs. SSC bajo; 2) CD45 positivo vs. SSC bajo; 3) expresión fuerte de CD45 vs. SSC bajo o intermedio. Posteriormente, se utilizó el diagrama FSC vs. SSC para asegurar la exclusión del resto de las poblaciones presentes en la muestra de la fracción de células patológicas. En la mayoría de los casos de LMA *NPM1*, a diferencia de lo que ocurre en otras leucemias, la débil expresión o ausencia del antígeno CD34 no facilitó la selección de los blastos.

Una vez identificada/s la/s poblaciones leucémicas se evaluó la expresión de cada uno de los marcadores presentes en el panel de LMA/SMD con el fin de caracterizar cada población e identificar los LAIP de seguimiento de la ERM.

En el análisis de la población leucémica se evaluaron los diferentes AcMo del panel incluyendo el porcentaje de positividad, la intensidad de fluorescencia y el patrón de expresión (homogéneo, heterogéneo, bimodal). El resto de celularidad residual de las muestras, especialmente la población linfóide se utilizó como control interno negativo y/o positivo.

La expresión de cada AcMo se definió como:

- Positiva (+ o +a): la señal de fluorescencia de la población a estudio estaba por encima de la señal de fluorescencia del control negativo.
- Negativa (-): la señal de fluorescencia de la población a estudio era similar a la del control negativo.
- Positiva débil (-/+ o +d): la señal procedente de la mayoría de la población a estudio se solapaba con el control negativo; en este caso, el pico de los blastos estaba ligeramente desplazado hacia la derecha con respecto al control negativo y la mayoría de las células leucémicas carecían de expresión, pero algunos se proyectan hacia el área positiva.
- Heterogénea: la positividad (un solo pico) de la población a estudio en el histograma del marcador analizado abarcaba más de 1,5 décadas logarítmicas.

Se reportó la expresión de cada marcador como el porcentaje de positividad sobre el total de la población leucémica. Se incluyó la intensidad de fluorescencia para resaltar si la expresión era diferente de lo normal y potencialmente útil como LAIP.

- Sobreexpresión: la expresión más brillante de la población leucémica comparada con su contrapartida normal.
- Infraexpresión: la expresión más débil de la población a estudio comparada con su contrapartida normal.

Tras la caracterización de las células leucémicas, se establecieron los LAIP útiles en cada caso para el seguimiento de la enfermedad. El LAIP se caracteriza por infidelidad de línea, asincronismo madurativo y sobre o infra expresión de los antígenos con respecto a su expresión o contrapartida normales.

Dependiendo de la distribución relativa de las tres principales poblaciones leucémicas comentadas anteriormente se evaluaron los 7 patrones inmunofenotípicos

descritos por Matarraz *et al.*, (Matarraz *et al.*, 2023). Se consideró uno de los tres patrones A, B o C cuando se observó una expansión leucémica mayoritaria de una de las tres poblaciones principales de células leucémicas. En este caso, la población debía constituir $\geq 80\%$ de todas las células de la leucemia en la MO o SP, pudiendo estar presente otra de las poblaciones por debajo del 20%. En lo que respecta a la línea monocítica, se consideró una expansión leucémica cuando la proporción de células superaba en ≥ 2 veces la desviación estándar de la frecuencia de esta población en médula ósea de individuos sanos (Matarraz *et al.*, 2023). El patrón A estaría formado por una población de células leucémicas inmaduras CD117⁺ HLA-DR⁺; el patrón B por una población de células leucémicas CD117^{+/het} HLA-DR⁻; y el patrón C por una población de células monocíticas HLA-DR⁺ y CD117 de expresión variable.

Por otra parte, los tres subgrupos de células patológicas de la LMA *NPM1* pueden coexistir simultáneamente en el mismo paciente dando como resultado 4 patrones inmunofenotípicos mixtos. En este caso, encontramos una expansión de más de una de las tres poblaciones descritas, cada una de las cuales representa $\geq 20\%$ de todas las células leucémicas de la muestra. El patrón D estaría formado por células inmaduras y monocíticas; el patrón E por células inmaduras y células leucémicas CD117^{+/het} HLA-DR⁻; el patrón F por células leucémicas CD117^{+/het} HLA-DR⁻ y monocíticas; y en el patrón G coexistirían las tres poblaciones (**Figura 13**).

Tomando como base la clasificación establecida por Matarraz *et al.*, pero eliminando la restricción del 20% para el punto de corte de la población, se realizó una reevaluación de los pacientes en distintos patrones inmunofenotípicos en los que se consideró la presencia de todas las poblaciones de células leucémicas que estaban en la muestra, incluso las que suponían menos del 20% del total de las células leucémicas. De este modo, los pacientes en los que sólo se identificó una sola población con infiltración mayoritaria, sin otras poblaciones celulares acompañantes, se mantuvieron en los grupos con expansión predominante. Los casos en los que se detectaba más de un tipo de población, sin importar el porcentaje relativo de cada una, se reclasificaron en los patrones correspondientes a expansiones mixtas.

Este nuevo esquema de estratificación se designó como clasificación-R por la reclasificación de los pacientes. En este modelo, se ha cambiado la denominación de los perfiles inmunofenotípicos por números (**Figura 13**), así, el patrón 1 corresponde a una población de células leucémicas inmaduras CD117⁺ HLA-DR⁺, en adelante, “células leucémicas inmaduras”; el patrón 2 a una población de células leucémicas CD117^{+/heterogéneo} HLA-DR⁻, en adelante, “células leucémicas comprometidas a linaje

mieloide no monocítico (LMNM)”; y el patrón 3 a una población de células monocíticas HLA-DR⁺ y CD117 de expresión variable, en adelante, “células leucémicas monocíticas”. El patrón 4 estaría formado por células leucémicas inmaduras y monocíticas; el patrón 5 por células leucémicas inmaduras y comprometidas a LMNM; el patrón 6 por células leucémicas comprometidas a LMNM y monocíticas; y en el patrón 7 coexistirían las tres poblaciones de células leucémicas.

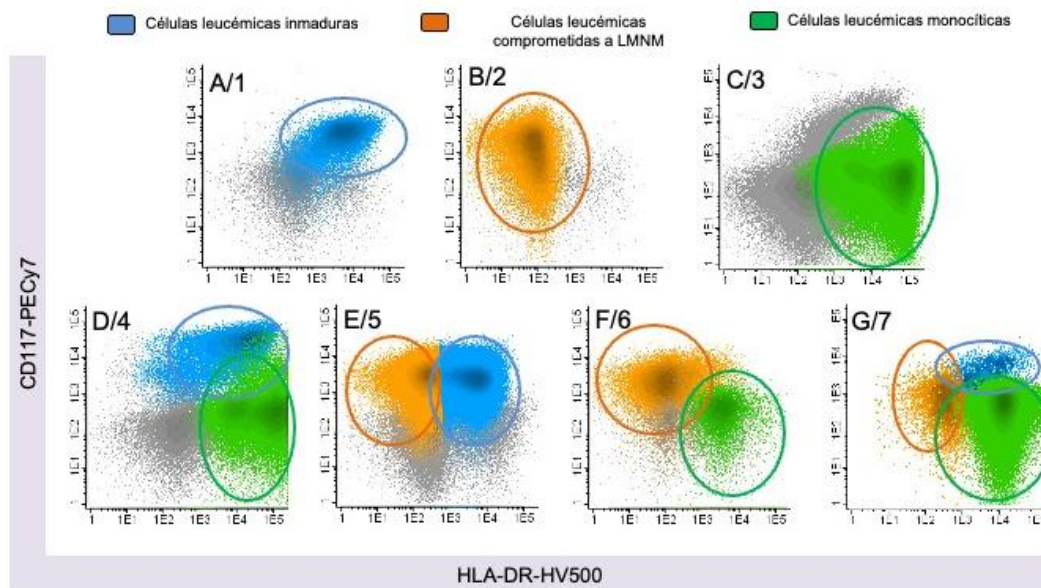


Figura 13. Diagramas biparamétricos de citometría que muestran la distribución de las tres poblaciones de células leucémicas según la expresión de los antígenos CD117 y HLA-DR que dan como resultado los diferentes patrones inmunofenotípicos de la clasificación de Matarraz *et al.*, (1-7) (Matarraz *et al.*, 2023). Se ha establecido una correspondencia entre la denominación con las letras (A-G) de la clasificación de Matarraz *et al.*, con la nomenclatura numérica (1-7) que hace referencia a la clasificación-R propuesta en este estudio. Aunque el criterio para considerar la presencia de las poblaciones leucémicas es ligeramente diferente entre ambas clasificaciones, los patrones hallados son similares.

4.3.4.4 Análisis por citometría de la enfermedad residual medible

El análisis de ERM se realizó siguiendo la doble aproximación recomendada por la *European Leukemia Net* (Heuser *et al.*, 2021), que consiste en identificar:

- 1) la presencia o ausencia del conjunto de células con el mismo inmunofenotipo atípico descrito al diagnóstico en cada paciente (LAIP).

- 2) y/o el conjunto de células cuyo fenotipo o patrón de diferenciación difiere de los patrones madurativos e inmunofenotípicos de la hematopoyesis normal (DfN).

Tras la exclusión de los dobletes y las células no viables siguiendo el mismo procedimiento realizado al diagnóstico, el análisis se centró en la detección de los LAIP seleccionados en el estudio inicial de cada paciente teniendo siempre en cuenta las alteraciones inmunofenotípicas reactivas que pueden encontrarse en la MO en regeneración. Por otra parte, se analizaron los precursores hematopoyéticos y el resto de las poblaciones residuales presentes en la muestra de MO en busca de alteraciones inmunofenotípicas que difiriesen de la expresión y de los patrones de maduración de la hematopoyesis normal. Por último, se analizó la distribución de las diferentes poblaciones medulares seleccionando los diferentes compartimentos hematopoyéticos y células minoritarias. En la **Figura 14** se muestra la estrategia de análisis de ERM.

Para la valoración de la calidad de la muestra, se estudió la presencia y proporción de determinadas poblaciones celulares que son observadas habitualmente en muestras de médula ósea normal como los mastocitos, las células plasmáticas, los precursores de serie eritroide y linfoide B. Las alteraciones de estas poblaciones medulares son valiosos indicadores de calidad y ayudan a evaluar la posible hemodilución del material procesado. La población patológica se cuantificó como porcentaje del total de células viables nucleadas. La presencia de ERM se confirmó en todos los tubos y se establecieron los límites inferiores de detección (del inglés *limit of detection*, LOD) y cuantificación (del inglés *lower limit of quantification*, LLOQ) de la técnica en cada caso. El LOD es el número mínimo de células con LAIP que pueden distinguirse con precisión por encima del ruido de fondo. Aplicado a la evaluación de ERM en LMA, un grupo de 20 células con un fenotipo aberrante puede ser suficiente para el reconocimiento de ERM y representa el LOD; mientras que el LLOQ es el número más bajo de células con LAIP que puede cuantificarse de forma fiable en relación con un criterio de aceptación definido, siendo igual o superior al LOD. Un grupo superior a 50 células puede considerarse el umbral para la cuantificación de ERM en LMA y constituye el LLOQ (Sommer *et al.*, 2021; Tettero *et al.*, 2022).

El análisis de los datos obtenidos mediante CFM requiere experiencia y estar familiarizado con los patrones inmunofenotípicos normales de maduración hematopoyética. En aquellos casos más complejos de ERM, el análisis se evaluó por más de un citometrista experimentado.

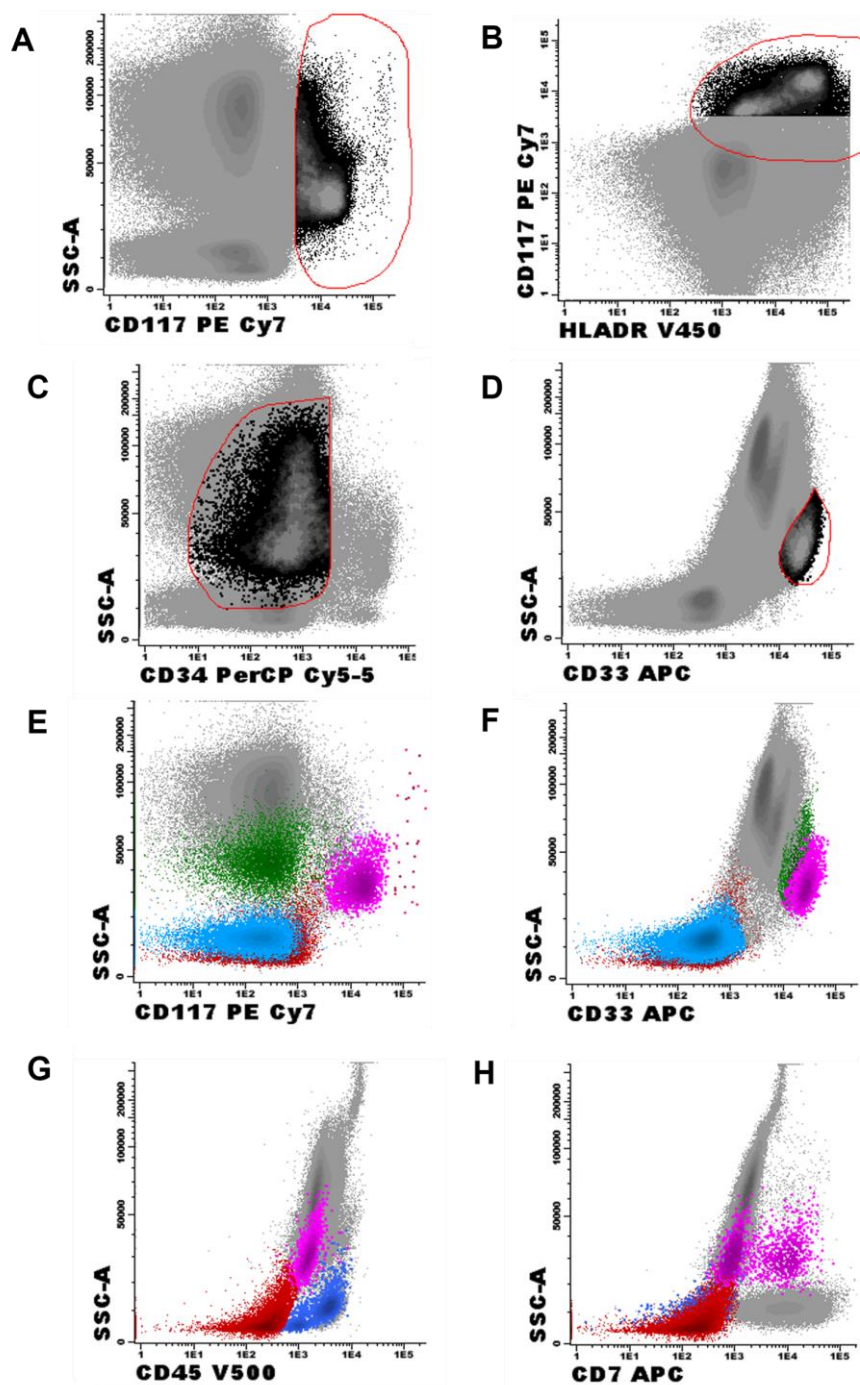


Figura 14. Diagramas biparamétricos de un análisis representativo de enfermedad residual medible de una muestra de médula ósea mediante citometría de flujo. La población de células leucémicas se identificó según el LAIP al diagnóstico. El análisis se realizó en los diagramas biparamétricos de forma secuencial (de izquierda a derecha y de arriba abajo). En primer lugar, se analizaron los marcadores comunes CD117 (A), CD117/HLA-DR (B) y CD34 (C), y en segundo lugar se seleccionó la población leucémica por la sobreexpresión de CD33 (D). En los diagramas E, F G y H se destaca la identificación de la población correspondiente a ERM según la expresión de CD117, CD33, CD45 y CD7, respectivamente. Población correspondiente a la ERM (fucsia); monocitos (verde); serie eritroide (rojo) y población linfóide (azul).

4.4. Separación celular

En función de los resultados inmunofenotípicos obtenidos mediante CFM en el análisis de las muestras al diagnóstico de cada paciente, se estableció la combinación de AcMo óptima para la separación celular mediante *cell sorting* de las poblaciones leucémicas en los diferentes momentos de estudio. El citómetro separador utilizado en el estudio fue un FACSAria-III (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). En todo momento se siguieron las recomendaciones del Grupo EuroFlow, aunque fue necesario introducir algunas modificaciones tanto en el procesamiento de las muestras como en la adquisición.

4.4.1. Procesamiento de las muestras

Para el procesamiento de las muestras para *cell sorting*, se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 4.3.2 Procesamiento de las muestras, con algunas modificaciones. Estos cambios fueron debidos a varios motivos: por una parte, la configuración óptica del FACSAria-III utilizado es ligeramente distinta a la del FACSCanto-II, lo cual hizo que se tuvieran que adaptar los fluorocromos y AcMo empleados; y por otro lado, fue necesario el empleo de una solución hemolizante distinta (solución BD Pharmlyse™, Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) que no interfiriese con la extracción de ácidos nucleicos, ya que el destino de las células fue la secuenciación mediante NGS.

4.4.2. Adquisición de las muestras en el separador celular

Las muestras se adquirieron en un separador celular FACSAria-III. La estrategia que se llevó a cabo para la separación fue específica para cada muestra según las poblaciones que se querían individualizar. En todos los casos se inició con la exclusión de los dobletes (diagrama FSC-A vs. FSC-H) y de las células no viables (diagrama FSC vs. SSC). Además, se empleó una estrategia de separación utilizando diagramas biparamétricos que enfrentaban diferentes fluorescencias y se realizaron *backgates* para minimizar en la medida de lo posible la contaminación cruzada entre poblaciones y la dispersión celular.

La recolección de las células separadas se realizó en tubos *ependorf* con tampón de lavado. Tras la separación, las células se introdujeron inmediatamente en hielo seco y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ADN. Para la separación de las células se empleó una boquilla (*nozzle*) de 100 µm de diámetro a una presión de 20 libras por pulgada cuadrada (psi, del inglés *pound per square inch*), una velocidad de separación baja (*flow rate* de 1-3) y se seleccionó la opción de pureza con

el objetivo de obtener las células sin contaminación por otros tipos celulares presentes en la muestra inicial. Para maximizar el número de células separadas de cada población celular no se llevó a cabo la comprobación de la pureza obtenida tras el aislamiento de las células.

4.5. Citogenética

4.5.1. Citogenética convencional

El estudio de citogenética convencional se realizó al diagnóstico y consistió en el análisis de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células leucémicas obtenidas tras ser cultivadas *in vitro* durante 24 horas mediante métodos convencionales. Los cromosomas se identificaron mediante el método de bandas G con tripsina-Giemsa. Las metafases fueron analizadas usando el programa Ikaros (Metasystems Inc., Alemania). Las anomalías cromosómicas se describieron de acuerdo con el Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica vigente en cada momento (McGowan-Jordan *et al.*, 2016, 2020; Shaffer *et al.*, 2013).

Los casos con menos de 20 metafases analizadas en ausencia de un clon anómalo se clasificaron como “no valorables”. Para hablar de cambio estructural o ganancia cromosómica se precisó su hallazgo en dos o más metafases, y en tres de ellas si se trataba de una pérdida cromosómica.

4.5.2. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

El estudio de los reordenamientos más frecuentes en la LMA se llevó a cabo mediante hibridación con sondas específicas en las extensiones preparadas tras los cultivos celulares según las recomendaciones del fabricante del reactivo. Las sondas utilizadas fueron -5/del(5q), -7/del(7q), TP53, del(20q), PML/RARa, AML1(RUNX1)/ETO, MLL y CBFb/MYH11 (Cytocell).

4.6. Biología molecular

4.6.1. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN y/o ARN se realizó mediante métodos automatizados y/o manuales en las muestras de sangre periférica y/o médula ósea de los diferentes pacientes.

La extracción de ADN de las poblaciones leucémicas aisladas mediante separación celular se llevó a cabo con métodos manuales. Debido al bajo número de células obtenido en algunos pacientes, se probaron diferentes kits de extracción con

números seriados de células para decidir cuál era el óptimo (QIAamp DNA Mini kit, QIAamp DNA Investigator, QIAamp DNA Micro Kit y REPLI-g Single Cell kit). Tras las pruebas, se concluyó que el mejor rendimiento se obtenía al realizar la extracción con QIAamp DNA Micro Kit y la posterior amplificación con REPLI-g Single Cell kit.

Para la técnica de NGS empleada en este estudio se cuantificó el ADN empleando el kit Qubit DNA BR (Thermo Fisher, San Diego, CA). Se evaluó la pureza de las muestras de ADN mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop 2000® (Thermo Fisher).

4.6.2. Detección de la mutación en *NPM1*

La detección de mutación en el codón R228 del gen *NPM1* se realizó mediante electroforesis capilar del ADN extraído de SP y/o MO en el momento del diagnóstico y en la recaída. Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Gale *et al.*, (Gale *et al.*, 2008) el cual se basa en la amplificación mediante PCR de un fragmento de 197 pares de bases del exón 12, donde se insertan los 4 nucleótidos característicos de las mutaciones en *NPM1*.

El método consta de dos pasos, en primer lugar, se realizó una amplificación inicial mediante PCR del fragmento del gen *NPM1* en el que se ubicaban las mutaciones a estudio con el termociclador Eppendorff MasterCycler (Eppendorff™) o el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). En segundo lugar, con el producto de la PCR se identificaron las mutaciones (inserciones o duplicaciones internas en tándem) mediante electroforesis capilar con el secuenciador capilar 3130 GA (Applied Biosystems). La separación electroforética permitió separar por tamaños el amplicón o los amplicones generados en la PCR, por lo que, si había mutaciones en las muestras, además del producto correspondiente al alelo no mutado, se observaba un producto de PCR de mayor tamaño, correspondiente al alelo mutado. Para poder diferenciar los dos fragmentos que se generaron, se emplearon cebadores marcados con el fluoróforo 6-FAM. Mediante el uso de un patrón de pesos moleculares GeneScan™ 500 ROX™ dye Size Standard (Applied Biosystems) y el programa GeneMapper versión 3.7 se obtuvo el tamaño del amplicón o de los amplicones generados.

El alelo normal produce un pico de tamaño de $199 \pm 0,3$ pares de bases, mientras que el alelo con mutación genera un pico de $203 \pm 0,3$ pares de bases. Por lo tanto, las muestras de ADN sin mutación en *NPM1* sólo mostraron el pico de 199 pares de bases, mientras que las muestras con mutación en *NPM1* presentaron dos picos, uno de 199 y otro de 203 pares de bases.

En los casos en los que se detectó la mutación, se procedió a secuenciar la muestra utilizando la tecnología de Sanger para determinar el tipo de mutación.

La **Tabla 5** muestra la secuencia de los cebadores utilizados para amplificar el fragmento del gen *NPM1* objeto de estudio.

Tabla 5. Secuencia de cebadores para la detección de mutación en *NPM1* descritos por Gale *et al.*, 2008.

Cebadores	Secuencia
NPM1 F Gale 6-FAM	5'-6FAM-CTTAACCACATTTCTTTTTTTTTTTTCCA-3'
NPM1 R Gale	5'-GGACAACATTTATCAAACACGGTAG-3'

4.6.3. Expresión de *NPM1* mutado y estudio de enfermedad residual medible mediante RT-qPCR *NPM1*

La determinación cuantitativa de los tipos A, B y D de *NPM1* se llevó a cabo mediante RT-qPCR en el equipo LightCycler 480 (Roche diagnostics). El estudio se llevó sobre cDNA retrotranscrito a partir de 2 µg de RNA extraído de MO o SP. Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen total de 10 µl que incluyó: 1 µM de cada primer, 0,5 µM de sonda MGB, 1X LightCycler® 480 Probes Master y 2 µl de cDNA. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 segundos y una etapa de *annealing* y extensión a 60°C por 45 segundos. Los resultados se analizaron en el LightCycler 480 software y se expresaron como el número de copias de *NPM1* normalizado al gen de referencia *ABL1* y multiplicado por 10.000.

4.6.4. Caracterización molecular mediante secuenciación masiva (NGS)

El estudio de mutaciones se realizó mediante secuenciación masiva (NGS) en diferentes plataformas y con diferentes paneles de genes dependiendo del periodo de estudio de las muestras:

- Plataforma Ion Torrent PGM, panel AML Community Panel (Ampliseq de Thermo Fisher) en el periodo de diciembre 2017 a enero 2018.
- Plataforma Ion S5, con el panel Oncomine Myeloid Research Assay – Chef Ready (Ref: A36941) en el periodo febrero 2018 a enero 2022.
- Plataforma GENEXUS, panel Oncomine Myeloid Assay GX v2 (Ref: A50694) en el periodo febrero 2022 hasta el final del estudio.

Los pacientes incluidos con anterioridad a noviembre de 2017 no disponen de NGS porque la técnica aún no estaba implementada en el Laboratorio de Biología Molecular.

Los genes y las regiones incluidas en cada panel se encuentran en las **Tablas 6-9**.

La secuenciación masiva de las poblaciones leucémicas aisladas mediante separación celular se llevó a cabo con la plataforma GENEXUS con el panel *Oncomine Myeloid Assay GX v2* (Ref: A50694) (**Tablas 7-9**). La frecuencia alélica (VAF) se definió como el porcentaje de las lecturas de la variante respecto al total de lecturas.

Tabla 6. Región codificante y *hotspot* de los 19 genes incluidos en el panel *AML Community Panel (Ampliseq)*. Este panel no permitió detectar las mutaciones *FLT3*-ITD.

Gen	Región diana	Gen	Región diana
<i>ASXL1</i>	Exón 12	<i>KIT</i>	Exones 8, 10, 11, 17
<i>BRAF</i>	COSMIC mutation COSM476 Codón 600	<i>KRAS</i>	Exones 2, 3, 4
<i>CBL</i>	Exones 8-9	<i>NPM1</i>	Exón 12
<i>CEBPA</i>	Toda la región codificante	<i>NRAS</i>	Exones 2, 3, 4
<i>DNMT3A</i>	Toda la región codificante	<i>PTPN11</i>	Exones 3, 7, 8, 13
<i>FLT3</i>	Codones 676, 830-850 D835	<i>RUNX1</i>	Exones 3-8
<i>GATA2</i>	Toda la región codificante	<i>TET2</i>	Toda la región codificante
<i>IDH1</i>	Exón 4	<i>TP53</i>	Toda la región codificante
<i>IDH2</i>	Exón 4	<i>WT1</i>	Exones 7, 9
<i>JAK2</i>	Exón 14		

Tabla 7. Genes incluidos en el panel *Oncomine Myeloid Research Assay – Chef Ready* indicado con el círculo rojo y con el panel *Oncomine Myeloid Assay GX v2* indicado con el círculo azul. En dichos genes sólo se estudia la región hotspot.

Gen		Gen	
ANKRD26	●	KRAS	● ●
ABL1	● ●	MPL	● ●
BRAF	● ●	MYD88	● ●
CBL	● ●	NPM1	● ●
CSF3R	● ●	NRAS	● ●
DDX41	●	PPM1D	● ●
DNMT3A	● ●	PTPN11	● ●
FLT3	● ●	SMC1A	●
GATA2	● ●	SMC3	●
HRAS	● ●	SF3B1	● ●
IDH1	● ●	SRSF1	● ●
IDH2	● ●	U2AF1	● ●
JAK2	● ●	WT1	● ●
KIT	● ●		

Tabla 8. Genes incluidos en el panel *Oncomine Myeloid Research Assay – Chef Ready* indicado con el círculo rojo y con el panel *Oncomine Myeloid Assay GX v2* indicado con el círculo azul. En dichos genes se estudia toda la región codificante.

Gen		Gen	
ASXL1	● ●	PRPF8	● ●
BCOR	● ●	RB1	● ●
CALR	● ●	RUNX1	● ●
CEBPA	● ●	SH2B3	● ●
ETV6	● ●	STAG2	● ●
EZH2	● ●	TET2	● ●
IKZF1	● ●	TP53	● ●
NF1	● ●	ZRSR2	● ●
PHF6	● ●		

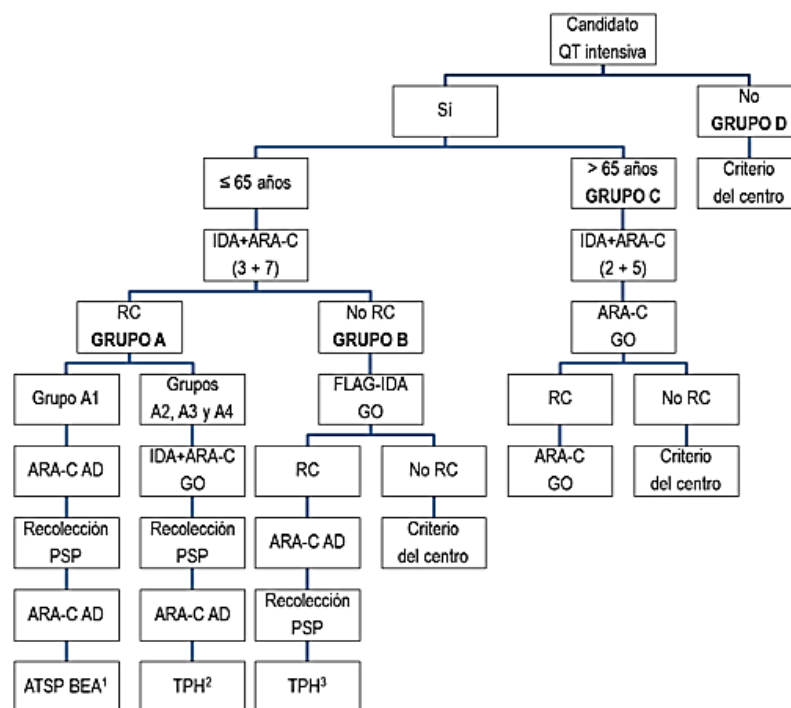
Tabla 9. Genes incluidos en el panel *Oncomine Myeloid Research Assay – Chef Ready* indicado con el círculo rojo y con el panel *Oncomine Myeloid Assay GX v2* indicado con el círculo azul. En dichos genes se estudia su expresión y reordenamientos.

Gen		Gen	
ABL1	● ●	MET	● ●
ALK	● ●	MLLT10	● ●
BCL2	● ●	MLLT3	● ●
BRAF	● ●	MYBL1	● ●
CCND1	● ●	MYH11	● ●
CREBBP	● ●	NTRK3	● ●
EGFR	● ●	NUP98	●
ETV6	● ●	NUP214	● ●
FGFR1	● ●	PDGFRA	● ●
FGFR2	● ●	PDGFRB	● ●
FUS	● ●	RARA	● ●
HMGA2	● ●	RBM15	● ●
JAK2	● ●	RUNX1	● ●
KMT2 (MLL PTDs)	● ●	TCF3	● ●
MECOM	● ●	TFE3	● ●

4.7. Tratamiento

4.7.1. Esquemas terapéuticos

En aquellos pacientes candidatos a quimioterapia intensiva se siguieron los protocolos de PETHEMA vigentes en cada momento: LMA PETHEMA 2007 desde inicio del periodo de estudio hasta 2011 (**Figura 15**), LMA PETHEMA 2010 activo a partir de abril 2011 hasta diciembre 2016, **Figura 16**, y protocolo LMA *NPM1* 2017 que se utilizó desde enero de 2017 hasta la finalización del estudio (**Figura 17**). En julio de 2019, se modificó este último protocolo para incluir midostaurina en los pacientes que también presentasen la mutación *FLT3*.



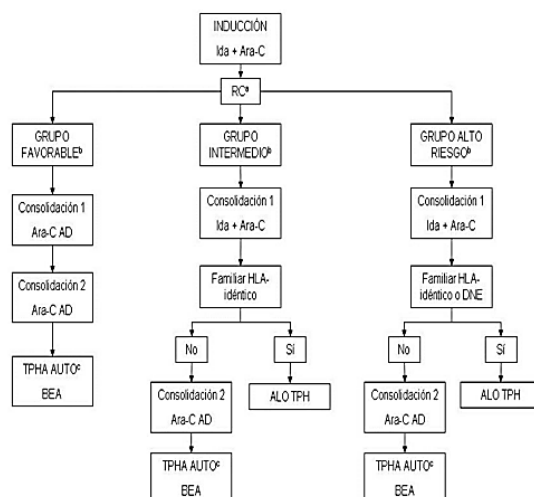
Grupo A1: LMA CBF con EMR negativa

Grupo A2: LMA con cariotipo de riesgo intermedio *NPM1* positivo y *FLT3* negativo

Grupo A3: LMA con cariotipo de riesgo intermedio *NPM1* negativo y *FLT3* negativo o *FLT3* positivo con ratio < 0,8

Grupo A4: LMA con EMR positiva (>0,1%), citogenética de alto riesgo, *FLT3* con ratio ≥ 0,8, LMA CBF y mutación de c-kit

Figura 15. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA 2007 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LMA desde el inicio del periodo de estudio a marzo de 2011.



a Los pacientes que no alcancen RC con el primer ciclo pero que muestren algún tipo de respuesta y no presentan refractariedad absoluta podrán recibir un segundo ciclo de inducción idéntico al primero.

b Grupos de riesgo según el protocolo.

c En los pacientes en los que no se haya podido recolectar progenitores hematopoyéticos se administrará un ciclo de quimioterapia adicional con Ara-C AD si el estado clínico lo permite.

Figura 16. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA 2010 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LMA durante el desde abril de 2011 hasta el final del estudio.

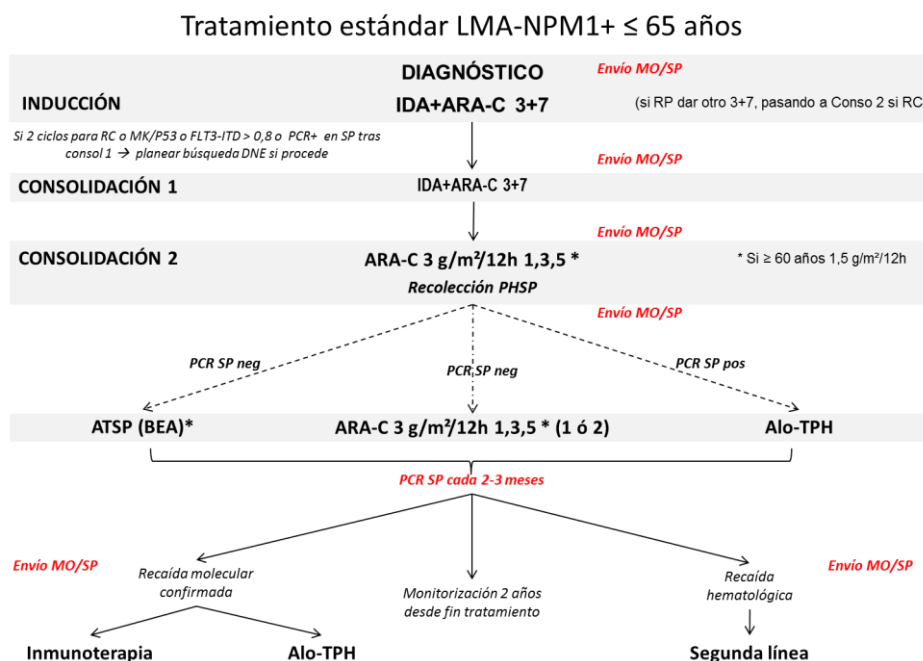


Figura 17. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA-NPM1-2017 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LMA y mutación *NPM1* desde enero de 2017 hasta el fin del estudio (enmienda de julio 2019).

En aquellos pacientes no candidatos a quimioterapia intensiva los esquemas terapéuticos que se utilizaron fueron los protocolos recomendados por los protocolos PETHEMA vigentes en cada momento: soporte o hipometilante o LMA PETHEMA 2011 mayores de 65 en vigor a partir de 2011 hasta fin de estudio (**Figura 18**). A lo largo del período de este estudio, especialmente a partir de 2014, cualquier paciente potencial para participar en un ensayo clínico fue evaluado para el mismo e incluido siempre que cumpliera con los criterios de inclusión y no presentara ninguno de exclusión. En el caso de los pacientes en recaída o resistencia, el tratamiento predominante en aquellos aptos para quimioterapia intensiva consistió principalmente en la aplicación del esquema FLAG-IDA (FLU 30 mg/m²/IV/d (días 1 a 4); Ara-C 2000 mg/m²/IV/d (días 1 a 4; IDA 10 mg/m²/IV/d (días 1 a 3); G-CSF 300 µg/SC/d (días -1 a 3). Para aquellos pacientes que no eran candidatos a quimioterapia intensiva no se estableció un esquema estándar, optándose por un tratamiento personalizado en función del estado de la enfermedad y la situación clínica del paciente. Los pacientes que cumplían con los criterios de elegibilidad para los ensayos clínicos fueron asignados al ensayo seleccionado, recibiendo quimioterapia intensiva o no intensiva, según correspondiera.

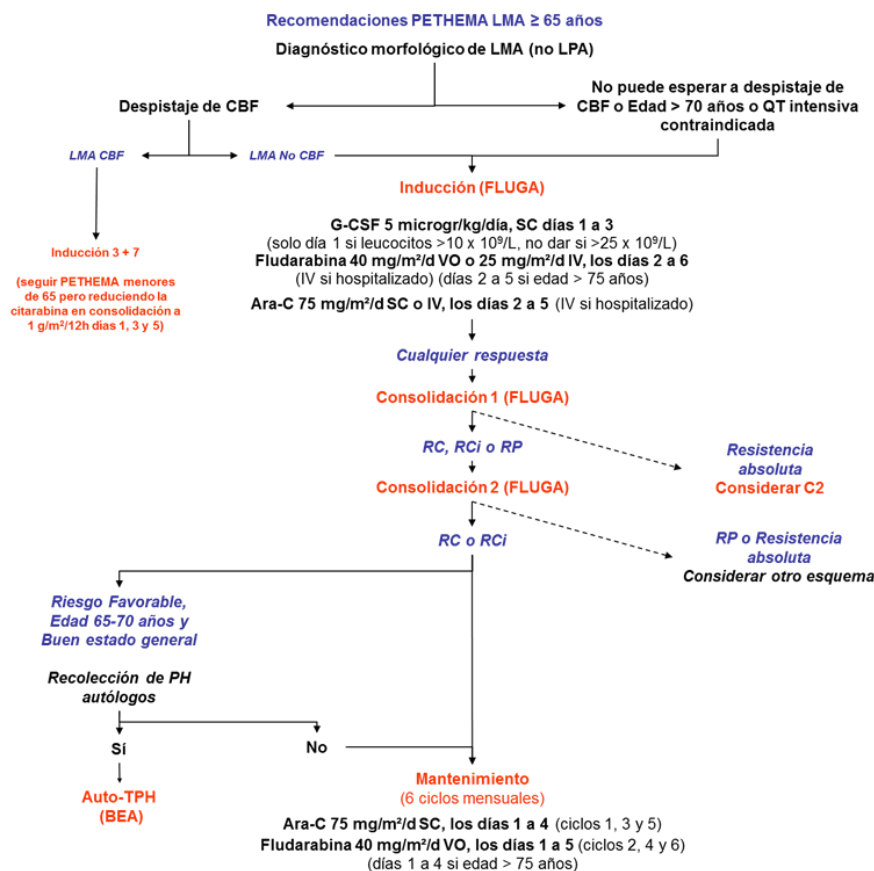


Figura 18. Imagen obtenida del protocolo PETHEMA LMA 2014 mayores de 65 años.

4.7.2. Definiciones de respuesta al tratamiento

Remisión completa (RC)

Se definió como menos de un 5% de blastos en médula ósea, ausencia de blastos circulantes y recuento absoluto de neutrófilos (RAN) mayor o igual $1 \times 10^9/L$ y recuento absoluto de plaquetas mayor o igual $100 \times 10^9/L$.

Remisión completa con recuperación hematológica incompleta (CRi)

Se definió como todos los criterios de RC excepto neutropenia residual ($<1 \times 10^9/L$) y/o trombocitopenia ($<100 \times 10^9/L$).

Remisión parcial (RP)

Se definió como todos los criterios hematológicos de RC; disminución del porcentaje de blastos en la médula ósea entre 5% y 25%; con disminución del porcentaje de blastos en la médula ósea previa al tratamiento en al menos un 50%.

Resistencia absoluta

Se definió como médula ósea realizada tras el inicio de recuperación de la aplasia con más de 25% de blastos, o con una disminución inferior al 50% respecto al porcentaje basal en médula ósea.

Recaída de la enfermedad

Se definió como la reaparición de blastos en médula ósea mayor o igual a 5%; o en sangre periférica en al menos dos muestras separadas por una semana, o desarrollo de nueva enfermedad leucémica extramedular.

Enfermedad residual medible positiva por molecular

Se definió el punto de corte para positividad de ERM mediante RT-qPCR como copias *NPM1* mutado/copias gen control *ABL1* ($\times 10^4$). Establecido en MO en post-inducción como ratio ≥ 1000 y en momentos posteriores ratio ≥ 150 ; y establecido en SP ≥ 1 en todos los momentos estudiados. Los estudios de post-inducción mediante RT-qPCR en SP no se tuvieron en cuenta ya que no hay punto de corte establecido para SP en ese momento.

Enfermedad residual medible positiva por citometría de flujo

Se definió el punto de corte para considerar la ERM positiva como la detección de células sospechosas con un inmunofenotipo asociado a leucemia compatible con el diagnóstico o diferente de lo normal $\geq 0,1\%$ sobre la celularidad nucleada total (CNT).

Supervivencia global

Se definió como el tiempo comprendido entre la fecha de diagnóstico de la enfermedad hasta la fecha de última visita o de la muerte del paciente por cualquier causa. Los pacientes que no se supo su estado, se censuraron en la última fecha que se conocía su situación.

Incidencia acumulada de recaída

Se definió para todos los pacientes que alcanzaron RC, RCi, RCh y se calculó desde la fecha que se obtuvo remisión hasta la fecha de la recaída hematológica. Los pacientes que sobrevivieron sin enfermedad se censuraron en la fecha de última visita, los pacientes que murieron en remisión se consideraron como evento competitivo a la recaída.

4.8. Almacenamiento y gestión de los datos

Los archivos en formato *fcs debidamente anonimizados generados en los citómetros de flujo estuvieron disponibles tanto en los ordenadores asociados a los citómetros, como en las copias de seguridad de datos y en el recurso compartido del Laboratorio de Citometría de Flujo del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Todos los resultados de los análisis de los datos de los pacientes se informaron y recogieron en los sistemas de información de laboratorio del Hospital (Gestlab, Indra) disponibles para el manejo clínico del paciente.

La información relativa a parámetros biológicos, clínicos u otros datos de laboratorio empleados en la presente tesis doctoral se recogieron realizando consultas dirigidas en los sistemas de información del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. La información se exportó a las correspondientes hojas de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft Office®) diseñadas para la recogida de los datos del estudio, para el posterior análisis estadístico de los mismos.

4.9. Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de la serie, expresando los resultados como porcentajes en las variables categóricas y como medianas (rango) para las variables continuas. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando los programas R y *GraphPad* (versión 9), seleccionando las pruebas estadísticas según la naturaleza y la distribución de las variables. Para comparar variables con distribuciones no paramétricas entre dos grupos, se utilizó la prueba de Mann-Whitney, mientras que para comparaciones entre tres grupos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la



corrección *posthoc* de Dunn. En los análisis de contingencia se emplearon las pruebas de Fisher y Chi-cuadrado según correspondiera. Para las comparaciones de más de tres grupos de datos paramétricos, se realizó un ANOVA de una vía seguido de la corrección *posthoc* de Tukey. En el análisis de variables pareadas, se aplicaron tanto la prueba de Wilcoxon para datos no paramétricos como la prueba T pareado para datos paramétricos. Para los gráficos de evolución clonal y de tipo *Sankey*, se emplearon los paquetes *fishplot*, *ggplot* y *ggalluvial* de R. El análisis actuarial de supervivencia se realizó por el método *Kaplan-Meier* y las comparaciones mediante las pruebas del *log-rank*. La supervivencia global (SG) se calculó desde la fecha del diagnóstico y la incidencia acumulada de recaída (IAR) desde la fecha de remisión completa.

5.RESULTADOS

5.1. Características de los pacientes

5.1.1. Descripción de la serie global

La serie global incluyó 91 pacientes adultos con LMA con mutación *NPM1* diagnosticados en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe entre enero de 2016 y julio de 2023. En la Tabla 10 se muestran las características generales de los pacientes.

La mediana de edad de los pacientes al diagnóstico fue de 64 años (rango, 34-88 años), con un ligero predominio de mujeres (ratio mujer/hombre:1,17). La enfermedad se presentó *de novo* en el 86% de los casos, en un 12% fue relacionada con la terapia y sólo en un 2% fue secundaria a SMD.

Los recuentos en sangre periférica mostraron una mediana de leucocitos de $27 \times 10^9/L$, de hemoglobina de 9 g/dL y de plaquetas de $55 \times 10^9/L$. La mediana de blastos en sangre periférica fue de 46%, (rango, 1-100%), mientras que, en médula ósea, fue de 65% (rango, 11-99%). En el 97% de los pacientes el porcentaje de blastos fue $\geq 20\%$ y un 3% mostraron una proporción entre 10-20%.

Se detectó enfermedad extramedular al diagnóstico en un 6% de los casos, siendo las afectaciones pleurales, cutáneas y ganglionares las más frecuentes.

El estudio citogenético fue evaluable en 80 pacientes, de los que 69 (86%) mostraron un cariotipo normal, mientras que los 11 restantes (14%) presentaron diversas anomalías citogenéticas. En 51 pacientes se aplicó la clasificación de la FAB siendo la distribución del subtipo de LMA: 17 M1 (33%), 8 M2 (16%), 12 M4 (24%), 11 M5 (22%) y 3 anemias refractarias con exceso de blastos en transformación (AREB-T) (6%).

Los parámetros de laboratorio evaluados, así como las características basales de la enfermedad al diagnóstico en los pacientes con LMA y mutación *NPM1* se detallan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Características de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación de *NPM1*.

Característica	Media	Mediana (rango)	N (%)
Serie global			91 (100)
Sexo			
Hombre			42 (46)
Mujer			49 (54)
Edad, años	63	64 (34-88)	
<60			34 (37)
≥60			57 (63)
ECOG	1	1 (0-4)	
0			38 (42)
1			35 (38)
2			12 (13)
3			5 (5)
4			1 (1)
Tipo de LMA			
De novo			78 (86)
Secundaria			13 (14)
Terapia			11 (12)
SMD			2 (2)
Leucocitos, x10⁹/L	60	27 (0-209)	
≤5			14 (15)
5-10			10 (11)
10-50			29 (32)
>50			38 (42)
Hemoglobina, g/dL	9	9 (4-15)	
≤10			67 (74)
>10			24 (26)
Plaquetas, x10⁹/L	72	55 (16-296)	
≤20			5 (5)
20-50			35 (38)
≥50			51 (56)
Enfermedad extramedular			
Sí			5 (6)
No			85 (94)
No disponible			1
Blastos en SP, %	48	46 (1-100)	
<10			18 (20)
10-20			8 (9)
≥20			63 (71)
No disponible			2
Blastos en MO, %	61	65 (11-99)	
10-20			3 (3)
≥20			85 (97)
No disponible			3
Subtipo FAB			
M1			17 (19)
M2			8 (9)
M4			12 (13)
M5			11 (12)
AREB-T			3 (3)
No disponible			40 (44)
Cariotipo			
Normal			69 (86)
Alterado			11 (14)
No valorable			9
No disponible			2

Tabla 10 (continuación). Características de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación de *NPM1*.

Característica	Media	Mediana (rango)	N (%)
AST, U/L	32	24 (10-133)	
≤50			73 (85)
>50			13 (15)
No disponible			5
ALT, U/L	29	18 (3-169)	
≤50			76 (86)
>50			12 (14)
No disponible			3
LDH, U/L	689	468 (1-3959)	
≤600			53 (60)
>600			35 (40)
No disponible			3
Creatinina, mg/dL	1	1 (1-4)	
≤1,3			78 (86)
>1,3			13 (14)
Ácido úrico, mg/dL	5	5 (0-17)	
≤7			64 (76)
>7			20 (24)
No disponible			7
Bilirrubina, mg/dL	1	1 (0-5)	
≤1,2			80 (89)
>1,2			10 (11)
No disponible			1
Albumina, g/dL	3	3 (2-5)	
≤3,5			51 (58)
>3,5			36 (42)
No disponible			4
Fibrinógeno, mg/dL	475	488 (122-700)	
≤170			3 (3)
>170			88 (97)
Dímero D, ng/mL	14153	4033 (264-109482)	
≤500			4 (5)
>500			77 (95)
No disponible			10
TP, s	15	15 (12-30)	
Prolongado			50 (55)
Normal			41 (45)
TTPa, s	28	28 (17-40)	
Prolongado			1 (1)
Normal			90 (99)
Esquema de tratamiento			
Intensivo			43 (48)
No intensivo			8 (9)
Ensayo clínico			35 (39)
Intensivo			18 (20)
No intensivo			17 (19)
Soporte			4 (4)
No disponible			1

5.2. Caracterización biológica al diagnóstico

5.2.1. Análisis inmunofenotípico

El análisis inicial de cada una de las muestras de los pacientes de la serie global permitió identificar dentro del compartimento mieloide tres poblaciones celulares leucémicas definidas según la expresión de los antígenos CD117 y HLA-DR y el estadio de maduración (**Tabla 11**):

- Población de células leucémicas inmaduras CD117⁺ HLA-DR⁺ en 59 pacientes, que representaron el 65% de los casos, con una mediana de infiltración del 18%.
- Población de células leucémicas CD117^{+/het} HLA-DR⁻ comprometidas a línea mieloide no monocítica (LMNM) en 40 pacientes, que representaron el 44% de los casos, con una mediana de infiltración de 61%.
- Población de células leucémicas monocíticas CD64⁺ HLA-DR⁺ y expresión de CD117 variable en 53 pacientes, que representaron el 58% de los casos, con una mediana de infiltración de 37%.

Tabla 11. Poblaciones de células leucémicas en pacientes con LMA y mutación *NPM1*: grado de infiltración y distribución de los casos.

Población de células leucémicas	% Blastos Mediana (rango)	Casos (%)
Inmaduras CD117 ⁺ HLA-DR ⁺	18 (0,2-96)	59 (65)
Comprometidas LMNM CD117 ^{+/het} HLA-DR ⁻	61 (0,7-97)	40 (44)
Monocíticas CD64 ⁺ HLA-DR ⁺ CD117 variable	37 (8-91)	53 (58)

Los resultados muestran la mediana (rango) del porcentaje de infiltración de las células leucémicas en MO o SP y el número de casos (%) en los que se observó. Los porcentajes de infiltración de los blastos y el número de casos pueden no sumar el 100% debido a que un mismo paciente puede estar clasificado en varias categorías si presentó más de una población de células leucémicas. LMNM: línea mieloide no monocítica.

La caracterización inmunofenotípica de las tres poblaciones leucémicas principales, incluyó en primer lugar, el estudio comparativo de la distribución y la expresión de cada antígeno analizado en cada una de estas poblaciones. Este primer análisis se realizó calculando mediana (rango) de los niveles de expresión antigénica de todos los casos sin realizar ningún corte de positividad (**Tabla 12**).

Por un lado, se comparó la población de células leucémicas inmaduras con la población de células leucémicas comprometidas a LMNM observándose en la primera una mayor mediana de expresión de los antígenos CD7 (32% vs. 0%, $p < 0,001$); CD13 (95% vs. 63%, $p < 0,001$); CD15 (14% vs. 7%, ns); CD34 (4% vs. 0%, $p = 0,002$); CD36 (2% vs. 0%, ns), CD38 (89% vs. 69%, $p = 0,005$); CD71 (67% vs. 52%, ns); CD117 (98% vs. 86%, $p = 0,02$); CD123 (100% vs. 95%, $p < 0,001$) y HLA-DR (95% vs. 0%, $p < 0,001$). Aunque la mediana de expresión de los antígenos fue mayor, en algunos casos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, las células leucémicas comprometidas a LMNM mostraron una mediana de expresión antigénica más alta que las células leucémicas inmaduras para los antígenos CD4 (27% vs. 8%, ns); CD9 (18% vs. 0%, ns); CD64 (32% vs. 22%, ns) y MPOc (92% vs. 91%, ns). La mediana de expresión fue la misma para ambos grupos celulares para los antígenos CD11b, CD14, CD22, CD25, CD33, CD35, CD56, CD300e, NG2 y TdT. Sólo CD56 reveló diferencias significativas ($p < 0,001$) al comparar la población de células leucémicas inmaduras frente a las otras dos poblaciones (comprometidas a LMNM y monocítica) (**Tabla 12 y Figura 19**).

Por otra parte, al comparar la población de células leucémicas monocíticas frente a los otros dos grupos de forma conjunta (población de células leucémicas inmaduras y células leucémicas comprometidas a LMNM), se observaron mayores niveles de expresión de los antígenos CD4 (84%), CD9 (27%), CD11b (90%), CD14 (50%), CD15 (94%), CD35 (64%), CD36 (100%), CD38 (99%), CD56 (19%), CD64 (100%), CD105 (58%), CD300e (54%) y HLA-DR (100%) en la población de células monocíticas, así como una expresión más baja de CD7 (0%), CD13 (26%), CD34 (0%), CD71 (0%), CD117 (0,1%) y MPOc (31%) (**Tabla 12 y Figura 19**). En el caso del nivel de expresión de CD123, la población de células leucémicas comprometidas a LMNM y las monocíticas mostraron una mediana de expresión similar (95%) frente a la población de células leucémicas inmaduras que mostró una expresión ligeramente superior (100%). Las diferencias significativas observadas entre los tres grupos se encuentran detalladas en la **Figura 19**.

No se observó expresión de CD3c, CD3, CD10, CD16, CD19, CD41, CD42a, CD42b, CD61, cCD79a y CD203c en ninguna de las poblaciones leucémicas y, por ello, estos antígenos no fueron considerados en el análisis.

En la **Tabla 12** y la **Figura 19** se muestran los resultados del estudio comparativo de la expresión de los diferentes antígenos estudiados en las tres poblaciones celulares leucémicas.

En segundo lugar, para comparar el inmunofenotipo de las tres principales poblaciones leucémicas y teniendo en cuenta el umbral de $\geq 20\%$ establecido en la literatura como criterio de positividad, se llevó a cabo un segundo análisis del nivel de expresión antigénica en relación con este valor para poder realizar comparaciones con lo descrito en otros estudios. Se evaluaron los casos que superaron dicho umbral con el fin de determinar la proporción de muestras positivas. El máximo de pacientes que pudieron analizarse en cada categoría la población leucémica fue de 59 en la población de células inmaduras, 40 en la población de células comprometidas a LMNM y 53 en la población de células monocíticas. No obstante, para cada antígeno se realizó un cociente entre el número de casos con expresión $\geq 20\%$ (n) y el número de casos en los que la expresión fue valorable (N). Los resultados se muestran en la **Tabla 12**.

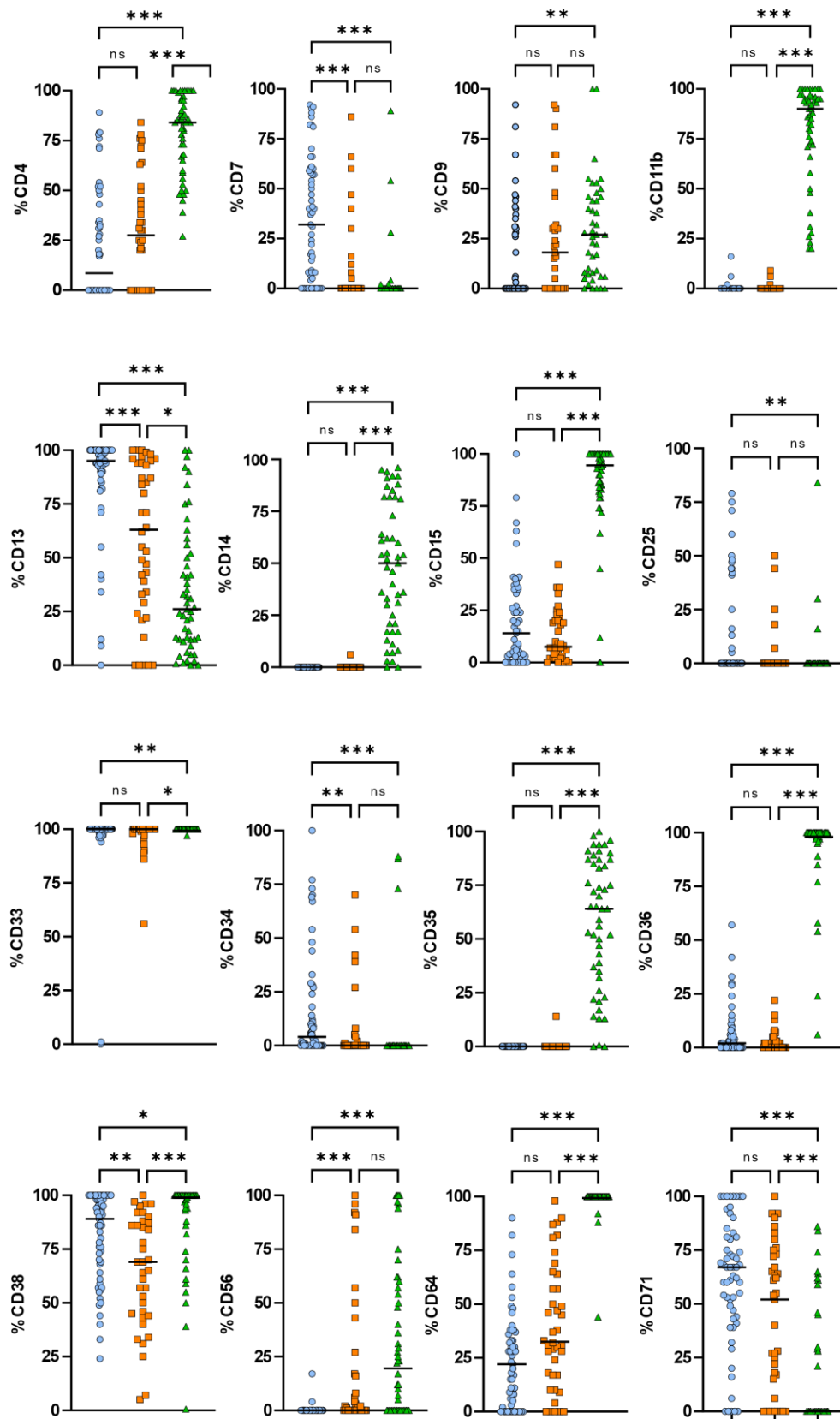
Tabla 12. Nivel de expresión de los diferentes antígenos estudiados en las tres principales poblaciones de células leucémicas de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1*. Los resultados se muestran como mediana (rango) de expresión antigénica calculada con todos los casos analizados sin realizar corte de expresión del 20%. n, número de casos con expresión $\geq 20\%$. N, número de casos en los que la expresión fue valorable. Porcentaje (%) de casos con expresión $\geq 20\%$.

AcMo	Población de células leucémicas								
	Inmaduras			Comprometidas LMNM			Monocíticas		
	Mediana (rango) (%)	n/N	%	Mediana (rango) (%)	n/N	%	Mediana (rango) (%)	n/N	%
CD4	8 (0-89)	26/58	45	27 (0-84)	23/38	61	84 (0-100)	49/49	100
CD7	32 (0-92)	34/59	58	0 (0-86)	6/40	15	0 (0-89)	1/50	2
CD9	0 (0-92)	18/52	35	18 (0-92)	16/33	48	27 (0-100)	25/43	58
CD11b	0 (0-16)	0/59	0	0 (0-9)	0/40	0	90 (20-100)	50/50	100
CD13	95 (0-100)	56/59	95	63 (0-100)	34/40	85	26 (0-100)	31/51	61
CD14	0 (0-0)	0/59	0	0 (0-6)	0/40	0	50 (0-96)	37/49	76
CD15	14 (0-100)	23/57	40	7 (0-47)	9/38	24	94 (0-100)	47/50	94
CD22	0 (0-72)	7/57	12	0 (0-45)	4/38	11	ND	ND	ND
CD25	0 (0-79)	12/53	23	0 (0-50)	3/34	9	0 (0-84)	1/44	2
CD33	100 (0-100)	56/58	97	100 (56-100)	40/40	100	100 (97-100)	51/51	100
CD34	4 (0-100)	16/59	27	0 (0-70)	5/40	13	0 (0-88)	3/51	6
CD35	0 (0-0)	0/58	0	0 (0-14)	0/40	0	64 (0-100)	42/49	86
CD36	2 (0-57)	6/58	10	0 (0-22)	1/40	3	100 (6-100)	49/50	98
CD38	89 (24-100)	57/57	100	69 (5-100)	35/37	95	99 (0-100)	49/49	100
CD56	0 (0-17)	0/58	0	0 (0-100)	9/40	23	19 (0-100)	25/50	50
CD64	22 (0-90)	30/57	53	32 (0-98)	28/40	70	100 (44-100)	51/51	100
CD71	67 (0-100)	51/58	88	52 (0-100)	26/39	67	0 (0-86)	14/50	28
CD105	0 (0-90)	8/58	14	1 (0-96)	16/40	40	58 (0-100)	34/50	68
CD117	98 (75-100)	58/58	100	86 (13-100)	38/40	95	0,14 (0-84)	5/51	10
CD123	100 (62-100)	58/58	100	95 (0-100)	38/40	97	95 (23-100)	49/49	100
CD300e	0 (0-0)	0/59	0	0 (0-0)	0/40	0	54 (0-92)	41/50	82
HLA-DR	95 (45-100)	59/59	100	0 (0-22)	1/40	3	100 (0-100)	52/53	98
MPOc	91 (0-100)	51/57	89	92 (6-100)	37/38	97	31 (0-98)	26/42	62
NG2	0 (0-5)	0/57	0	0 (0-5)	0/39	0	0 (0-90)	4/50	8
TDTn	0 (0-44)	2/59	3	0 (0-69)	2/40	5	0 (0-62)	0/50	0

AcMo: anticuerpo monoclonal. c: citoplasmática. n: nuclear

Población de células leucémicas

● Inmaduras ■ Comprometidas a LMNM ▲ Monocíticas



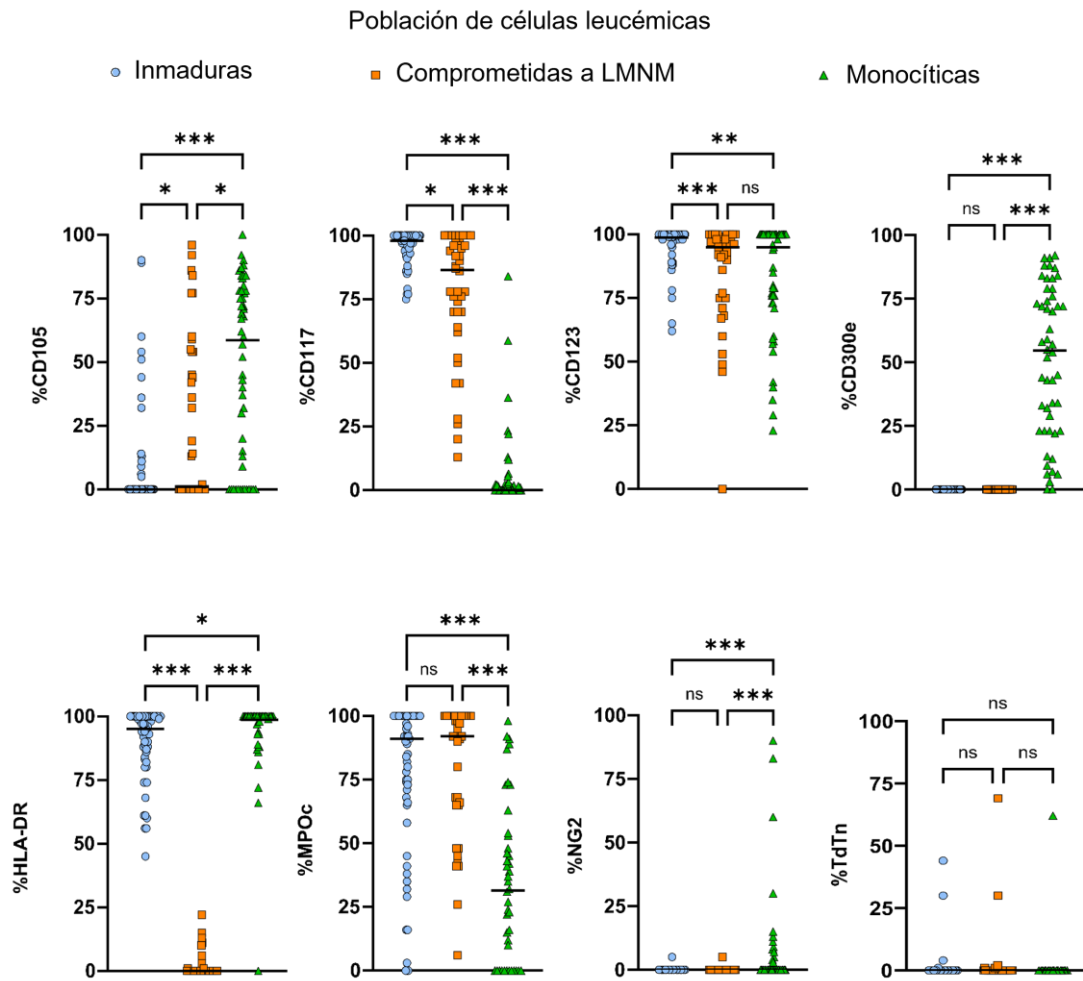


Figura 19. Gráficos comparativos de la distribución de la expresión de los diferentes antígenos estudiados en las tres poblaciones leucémicas principales: población de células leucémicas inmaduras CD117⁺ HLA-DR⁺ (círculos azules), población de células leucémicas comprometidas a LMNM CD117^{+/het} HLA-DR⁻ (cuadrados naranjas) y población de células leucémicas monocíticas (triángulos verdes). Los resultados muestran el porcentaje de expresión para cada antígeno. La barra negra indica la mediana de expresión. Las diferencias estadísticas significativas se indican en los gráficos como: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; y ***: $p < 0,001$. Los casos en los que no se encontraron diferencias significativas aparecen como ns. c: citoplasmático; n: nuclear.

En lo que respecta a los resultados del análisis inmunofenotípico de las tres principales poblaciones leucémicas mostrados anteriormente cabe destacar:

- La expresión de CD34 fue superior en la población de células leucémicas inmaduras frente a los otros dos grupos (4% vs. 0%). Sin embargo, sólo un 27% de los casos con esta población celular mostraron una positividad $\geq 20\%$.
- CD33, CD38 y CD123 mostraron altas tasas de positividad que fueron similares en los tres grupos celulares.
- Los mayores niveles de expresión en los antígenos de línea monocítica como CD4, CD9, CD11b, CD14, CD15, CD35, CD36, CD64 y CD300e se observaron en la población de células leucémicas monocíticas.
- Se objetivó una baja mediana de expresión de CD13 (26%) y de MPOc (31%) en la población de células leucémicas monocíticas.
- Con respecto a los antígenos de línea linfoide, se encontró una mayor expresión y porcentaje de casos positivos para CD7 en la población de células leucémicas inmaduras y para CD56 en las células leucémicas monocíticas. La expresión de CD56 y TdT mostró una tasa de positividad del 23% y del 5%, respectivamente, en las células leucémicas comprometidas a LMNM.
- El porcentaje mayor de casos positivos para CD25 se observó en la población de células leucémicas inmaduras (23%).

Por otra parte, 20 (34%) y 6 (15%) pacientes con población de células leucémicas inmaduras y comprometidas a LMNM respectivamente, mostraron una sobreexpresión del antígeno CD33.

En los 53 casos de la serie global que presentaron la población de células leucémicas monocíticas, se analizaron los patrones de maduración de este compartimento y se observó: asincronismo madurativo con adquisición previa de CD300e antes de CD14 (CD300e⁺CD14⁻) en el 58% de los pacientes, y/o un asincronismo madurativo en el patrón de maduración teniendo en cuenta la expresión de CD14 y CD35. Este último se subdividió en dos tipos: I) CD14⁺CD35⁻ en un 5% de los casos, o II) CD14⁻CD35⁺ en un 68% de los pacientes (**Tabla 13** y **Figura 20**). Además, en 18 pacientes se confirmó el asincronismo madurativo de ambos patrones. Con respecto al resto de los casos, en 17 pacientes se evidenció un solo asincronismo madurativo; en 7 casos no se detectó ninguno; y en los 11 pacientes restantes la valoración de la maduración fue incompleta. De estos últimos 11 pacientes, en 6 de ellos no fue posible evaluar el asincronismo entre los antígenos CD14 y CD35 por problemas

técnicos, y en 5 de ellos no se pudo analizar la maduración de las células monocíticas por tratarse de bloqueos madurativos o infiltraciones de formas más diferenciadas.

Tabla 13. Frecuencia de los patrones de maduración asincrónicos de la línea monocítica de la población de células leucémicas monocíticas evaluados en médula ósea de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutación de *NPM1*.

Pacientes N=53	LMA <i>NPM1</i> : maduración monocítica en médula ósea		
	CD300e ⁺ CD14 ⁻	I) CD14 ⁺ CD35 ⁻	II) CD14 ⁺ CD35 ⁺
Alterado	28 (58%)	2 (5%)	28 (68%)
No alterado	20 (42%)	39 (95%)	13 (32%)
No valorable	5	12	12

Los porcentajes de los diferentes asincronismos pueden no sumar el 100 debido a que un mismo paciente, si presentó más de un asincronismo, se clasificó en más de una categoría.

En este mismo grupo de pacientes que presentaron una población de células leucémicas monocíticas se evidenció un mayor número de casos con infiltración por células monocíticas más diferenciadas (promonocitos y monocitos atípicos) en comparación con aquellos que mostraron predominio de elementos más inmaduros, como los monoblastos. En este contexto, se observaron 6 pacientes con una infiltración >20% de la población de monoblastos, frente a 46 casos que presentaron infiltración por formas más diferenciadas (**Tabla 14**).

**Maduración monocítica
MO normal**

**Maduración monocítica
LMA *NPM1***

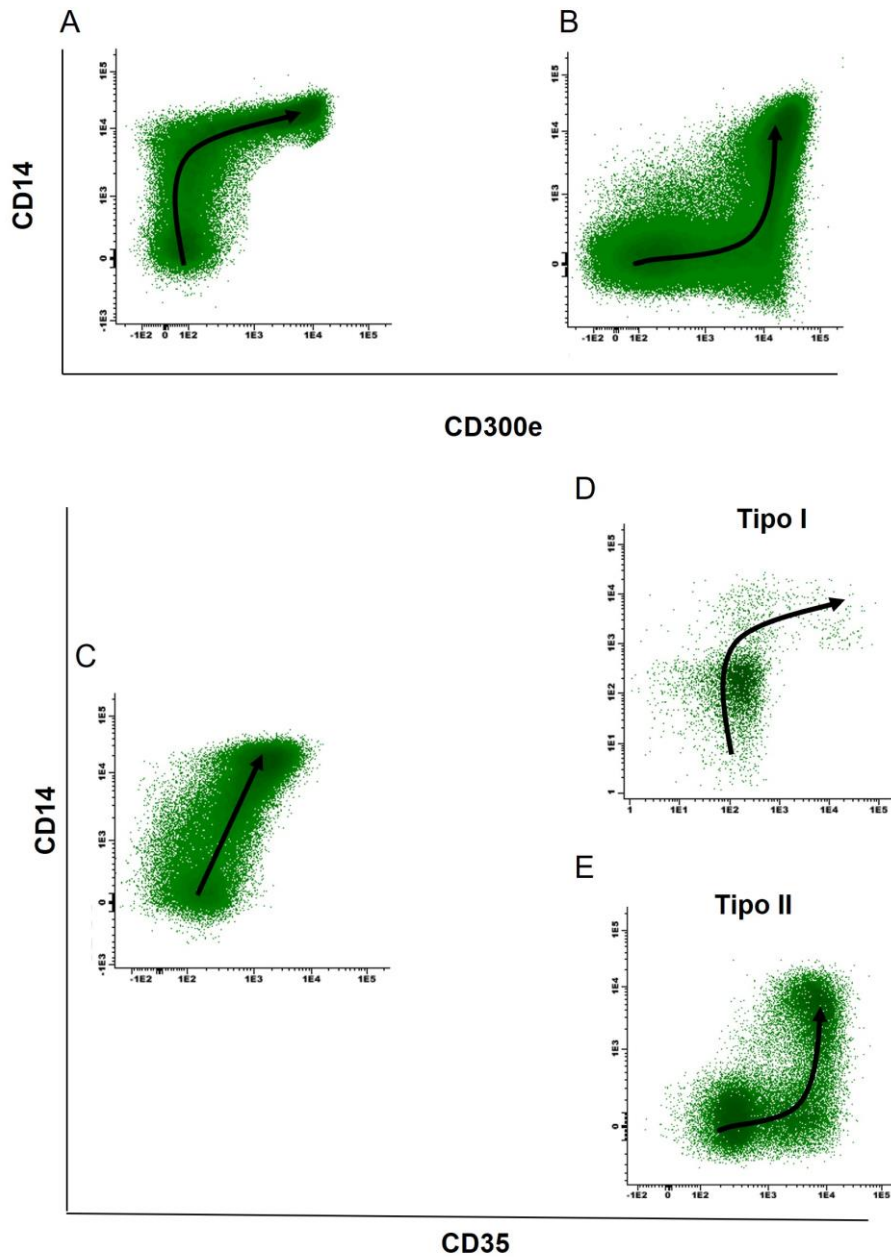


Figura 20. Gráficos comparativos de la maduración monocítica de una médula ósea (MO) normal y de un paciente con leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1*. Patrones de maduración según la expresión de CD14/CD300e (A) y CD14/CD35 (C) en una MO normal. Asincronismos madurativos observados en los pacientes con LMA con mutación *NPM1*: adquisición previa de CD300e antes de CD14 (B); patrón madurativo alterado tipo I con CD14⁺CD35⁻ (D); y patrón madurativo alterado tipo II con CD14⁺CD35⁺ (E). Las flechas indican la ruta madurativa.

Tabla 14. Distribución de los diferentes estadios de maduración de la serie monocítica en los 53 casos con población de células leucémicas monocíticas.

ID Paciente	Monoblastos CD34-CD117+ CD14-CD35-CD300- (%)	Monoblastos CD34-CD117+ CD14-CD35-CD300- (%)	Promonocitos CD34-CD117- CD14-CD35-CD300- (%)	Promonocitos CD34-CD117- CD14+CD35+CD300- (%)	Monocitos CD34-CD117- CD14+CD35+CD300+ (%)	Población no clasificable (%)
2	0	0	73	9	3	15\$
5	0	2	47	14	23	14\$
7	0	0	12	2	36	50*\$
8	0	1	10	7	76	5\$
9	0	0	47	10	19	25\$
11	0	0	25	5	46	24*\$
13	0	0	73	9	15	3*\$
14	0	36	37	1	14	12*
15	0	49	14	8	27	2\$
16	0	2	54	1	35	7*
20	0	0	18	4	67	11*\$
21	0	0	77	1	10	12*
22	NV	NV	NV	NV	NV	NV
25	0	0	30	0	36	34*
26	0	0	16	0	84	0
27	0	0	4	19	77	0
28	0	6	17	3	53	21*\$
31	0	0	0	13	87	0
33	0	23	69	8	0	NV
34	0	0	67	7	18	8*\$
38	0	0	37	13	35	15*
39	0	5	36	17	22	19\$
40	0	1	26	0	35	38*\$
42	73	25	2	0	0	NV
44	0	0	40	4	45	11*\$
46	0	0	38	10	50	2*\$
47	0	0	12	4	79	4*\$
49	0	3	27	0	49	22*+
50	0	0	18	17	65	0
52	0	0	79	0	2	19*+
54	0	1	50	16	25	7\$
58	0	6	86	0	5	2*
61	0	7	49	3	11	30*\$
62	0	2	25	1	49	23*
64	0	0	6	5	89	0
65	0	0	80	8	10	1\$
67	0	1	8	3	77	11*\$
68	0	23	33	0	12	31*
69	88	12	0	0	0	NV
70	0	0	88	1	5	5\$
71	0	0	41	15	20	24\$
75	0	0	38	19	42	0
77	0	8	23	7	54	7\$
79	0	1	8	0	82	9*\$
80	0	0	8	40	43	8*
82	0	2	8	3	75	12
84	0	2	26	1	53	17*
85	0	0	3	5	91	NV
86	0	1	70	7	7	15\$
87	0	9	29	2	24	36*\$
88	0	0	8	30	62	0
90	0	5	73	1	9	12*\$
91	0	0	5	3	88	4*\$

Los resultados se representan como porcentaje sobre el total de la celularidad leucémica monocítica. En la columna “población no clasificable” se consideró el porcentaje de celularidad que no se pudo asignar a ningún estadio madurativo por asincronismo en los patrones de maduración: *: alteración en el patrón de maduración CD14/CD300; +: adquisición de CD14 previa a CD35; y \$: adquisición de CD35 previa a CD14. En gris se resaltan los casos con el patrón de maduración CD14/CD35 que no pudieron ser valorados. ID: número de identificación

En los 38 casos de la serie global en los que la celularidad monocítica no se consideró como población leucémica y cuya mediana fue de 0,8% (rango, 0-6%) sobre la CNT, también se observaron asincronismos en el patrón de maduración de las células monocíticas residuales (**Tabla 15**).

Tabla 15. Frecuencia de los patrones de maduración asincrónicos de la línea monocítica evaluados en los 38 pacientes en los que esta población no se consideró leucémica.

Pacientes N=38	LMA <i>NPM1</i> : maduración monocítica residual en médula ósea		
	CD300e ⁺ CD14 ⁻	I) CD14 ⁺ CD35 ⁻	II) CD14 ⁻ CD35 ⁺
Alterado	10 (71%)	2 (17%)	5 (42%)
No alterado	4 (29%)	10 (83%)	7 (58%)
No valorable	24	26	26

Según la clasificación propuesta por Matarraz *et al.*, (Matarraz *et al.*, 2023) se evaluó la proporción y la distribución relativa de las tres principales poblaciones de células leucémicas: inmaduras, comprometidas a LMNM y monocíticas en los 91 pacientes de nuestra serie y se distribuyeron los casos en los 7 patrones inmunofenotípicos descritos por estos autores (**Figura 21**):

Los criterios definidos por estos autores incluían dos tipos de infiltración:

- Predominante: patrones A, B y C:
 - Patrón A: población de células leucémicas inmaduras CD117⁺ HLA-DR⁺ (16 casos, 18% de los pacientes).
 - Patrón B: población de células leucémicas CD117^{+/het} HLA-DR⁻ comprometidas a LMNM (23 casos, 25% de los pacientes).
 - Patrón C: población de células leucémicas monocíticas HLA-DR⁺ y CD117 variable (20 casos, 22% de los pacientes).
- Mixta: patrones D, E, F y G.
 - Patrón D: población de células inmaduras y monocíticas, (19 casos, 21% de los pacientes).
 - Patrón E: población de células inmaduras y células comprometidas a LMNM (6 casos, 7% de los pacientes).
 - Patrón F: población de células leucémicas comprometidas a LMNM y monocíticas, (6 casos, 7% de los pacientes).
 - Patrón G: coexistencia de las tres poblaciones, (1 caso, 1% de los pacientes).

Tras distribuir a los pacientes según los criterios definidos previamente por Matarraz *et al.*, (Matarraz *et al.*, 2023) se realizó una segunda reclasificación de los 7 patrones inmunofenotípicos (de A a G) en los que se evaluó la presencia de todas las poblaciones de células leucémicas que estaban presentes en las muestras, incluso las que representaban <20% del total de las células leucémicas. De este modo, los pacientes que presentaban una única expansión predominante se mantuvieron en los patrones 1-3. En cambio, los casos en los que se combinaba más de un tipo de población se reclasificaron en los patrones 4-7. Esta nueva clasificación que hemos denominado como “clasificación-R” es la propuesta en nuestro estudio y es la utilizada para el resto de los análisis. La distribución de nuestros casos en los 7 patrones inmunofenotípicos fue (**Figura 21 B**):

- Patrón 1: 15 casos, 16% de los pacientes.
- Patrón 2: 17 casos, 19% de los pacientes.
- Patrón 3: 5 casos, 5% de los pacientes.
- Patrón 4: 31 casos, 34% de los pacientes.
- Patrón 5: 6 casos, 7% de los pacientes
- Patrón 6: 11 casos, 12% de los pacientes.
- Patrón 7: 6 casos, 7% de los pacientes.

Atendiendo a esta segunda clasificación-R, 24 de los 91 pacientes fueron reasignados a uno de los nuevos patrones de infiltración (del 1 al 7). A continuación, se detallan los cambios de patrón efectuados, en la que los pacientes fueron asignados al patrón correspondiente sin tener en cuenta el umbral del 20% propuesto en la clasificación inicial de Matarraz *et al.*, (Matarraz *et al.*, 2023).

Los casos en los que se identificó una población de células leucémicas inmaduras en una proporción <20% fueron reclasificados de la siguiente forma: 11 pacientes fueron transferidos del patrón C al patrón 4; 1 paciente fue reasignado del patrón B al patrón 5; y 1 paciente pasó del patrón F al patrón 7. En cuanto a los pacientes con una población de células leucémicas monocíticas <20%, los cambios fueron: 1 paciente fue reasignado del patrón A al patrón 4; 5 pacientes del patrón B al patrón 6; y 1 paciente del patrón E al patrón 7. Finalmente, la eliminación del umbral del $\leq 20\%$ aplicado a la población de células comprometidas a LMNM, también afectó a algunos casos que se redistribuyeron como: 1 paciente fue reclasificado del patrón C al patrón 6; y 3 pacientes pasaron del patrón C al patrón 7 (**Figura 21C**).

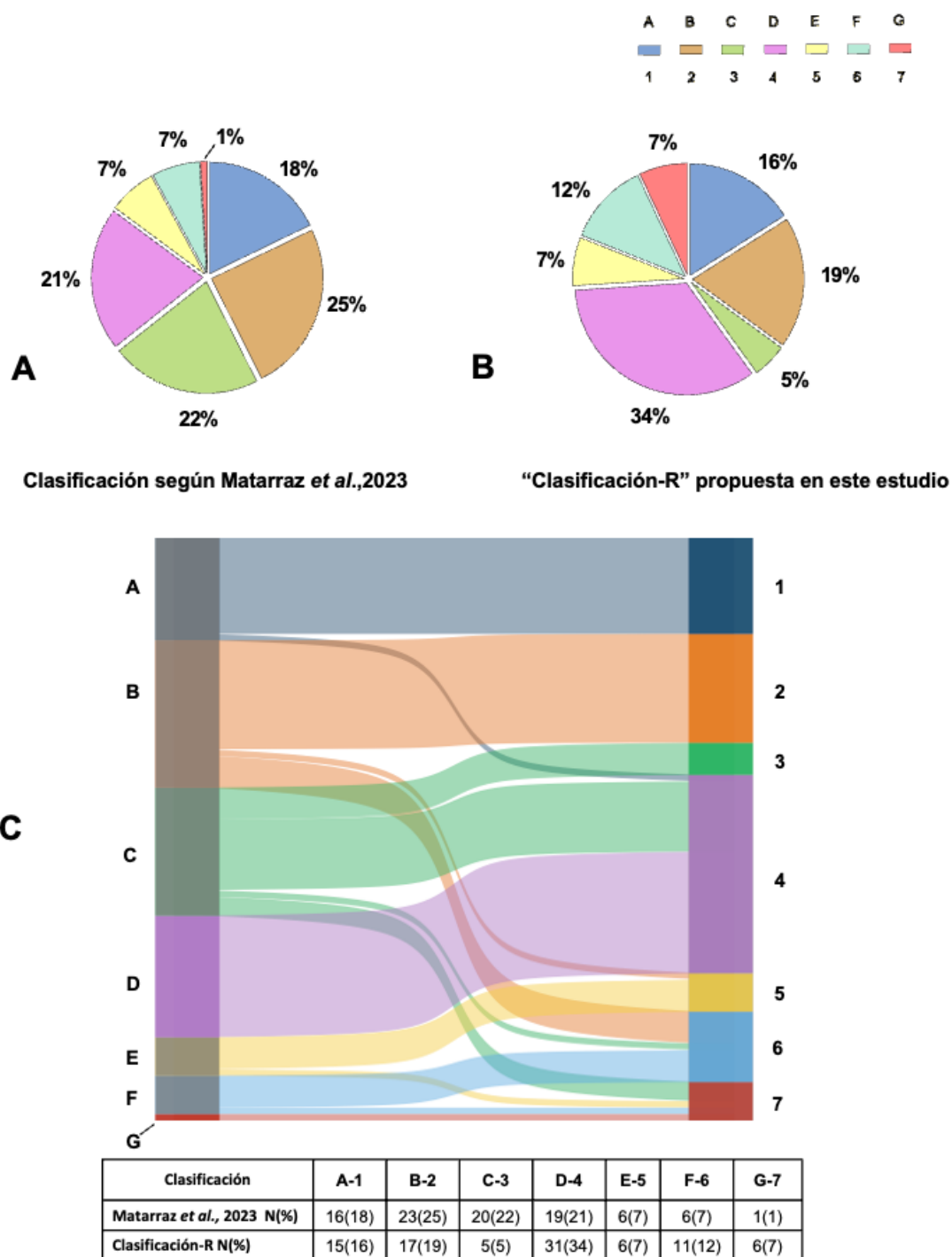


Figura 21. Diagramas circulares que muestran la distribución de los diferentes patrones inmunofenotípicos según la clasificación establecida por Matarraz *et al.*, 2023 y según la clasificación-R establecida en este estudio (B). Diagrama de Sankey que ilustra la reasignación de todos los casos entre ambas clasificaciones (C).

5.2.2. Alteraciones moleculares

Según el tipo de inserción mayoritaria de la mutación *NPM1*, la distribución de los pacientes fue: tipo A identificada en 73 de los casos (80%), tipo D en 6 pacientes (7%) y tipo B en 5 pacientes (5%). En 7 casos (8%) se detectaron otros tipos de mutaciones minoritarias (**Figura 22**). En la **Figura 22B** se muestra la secuencia de codificación y proteína de los tipos de mutaciones de *NPM1* de la serie, además del número de casos y el porcentaje que las presentaron.

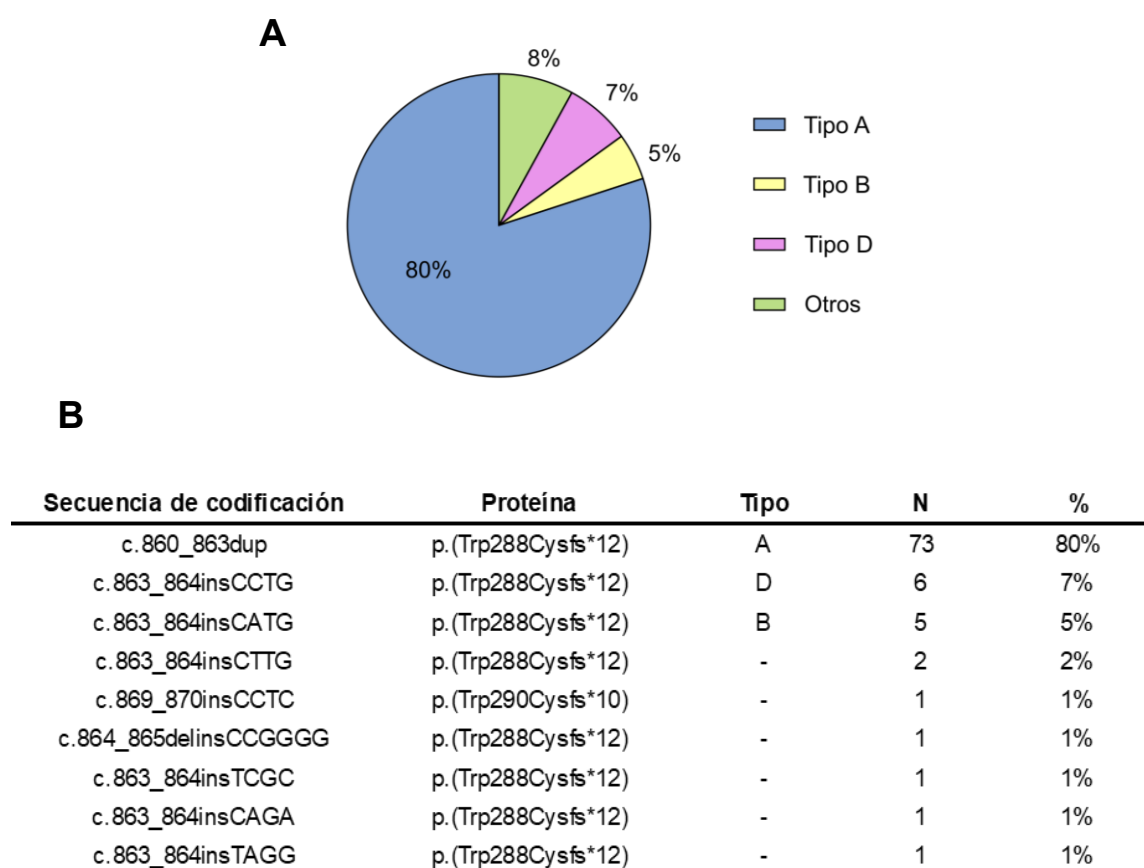


Figura 22. Distribución de los pacientes según los tipos de mutación en *NPM1* (A). Secuencia de codificación y proteína de los tipos de *NPM1* de la serie, además del número y el porcentaje de casos en los que se identificó (B).

El estudio del panel de mutaciones mediante *NGS* estuvo disponible en 78 casos. El total de variantes detectadas fue de 333, sin considerar las mutaciones en *NPM1* se detectaron 255 variantes. Todos los casos presentaron, además de *NPM1*, una o más mutaciones adicionales. El promedio de mutaciones por paciente excluyendo

NPM1, fue de 3,3 (**Figura 23**). Todas las variantes observadas en un mismo gen se consideraron individualmente y no se agruparon como una sola alteración o mutación.

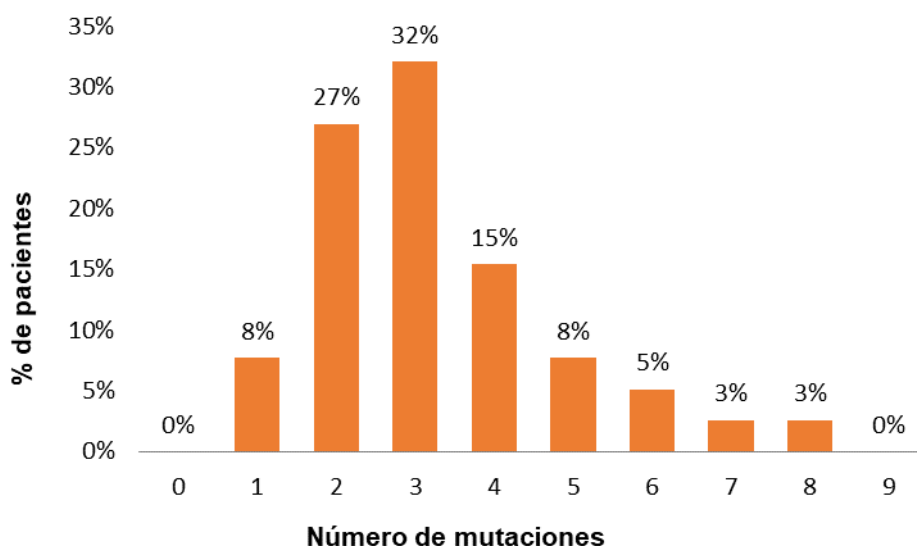


Figura 23. Distribución de los pacientes según el número de alteraciones detectadas sin tener en cuenta la mutación de *NPM1*.

Los genes más comúnmente mutados fueron *FLT3* que se identificó en el 60% de los pacientes, incluyendo ITD (45%) y mutaciones TKD (21%); los genes que regulan la metilación del ADN, como *DNMT3A* (46%), *TET2* (22%), *IDH2* (22%) e *IDH1* (18%); y los genes implicados en la vía de señalización RAS, incluyendo *NRAS* (24%), *PTPN11* (14%), *KRAS* (10%) y *NF1* (9%). También se observaron mutaciones en factores de *splicing*, siendo predominantes en *SRSF2* (11%), y en factores de transcripción, con una frecuencia relativamente alta de *WT1* (12%) (**Figura 24A**).

No se observaron mutaciones en los genes *ANKRD26*, *ABL1*, *CSF3R*, *DDX41*, *HRAS*, *KIT*, *MPL*, *MYD88*, *PPM1D*, *SMC1AD*, *SMC3*, *SETBP1*, *BCOR*, *ETV6*, *RB1* y *ZRS2*.

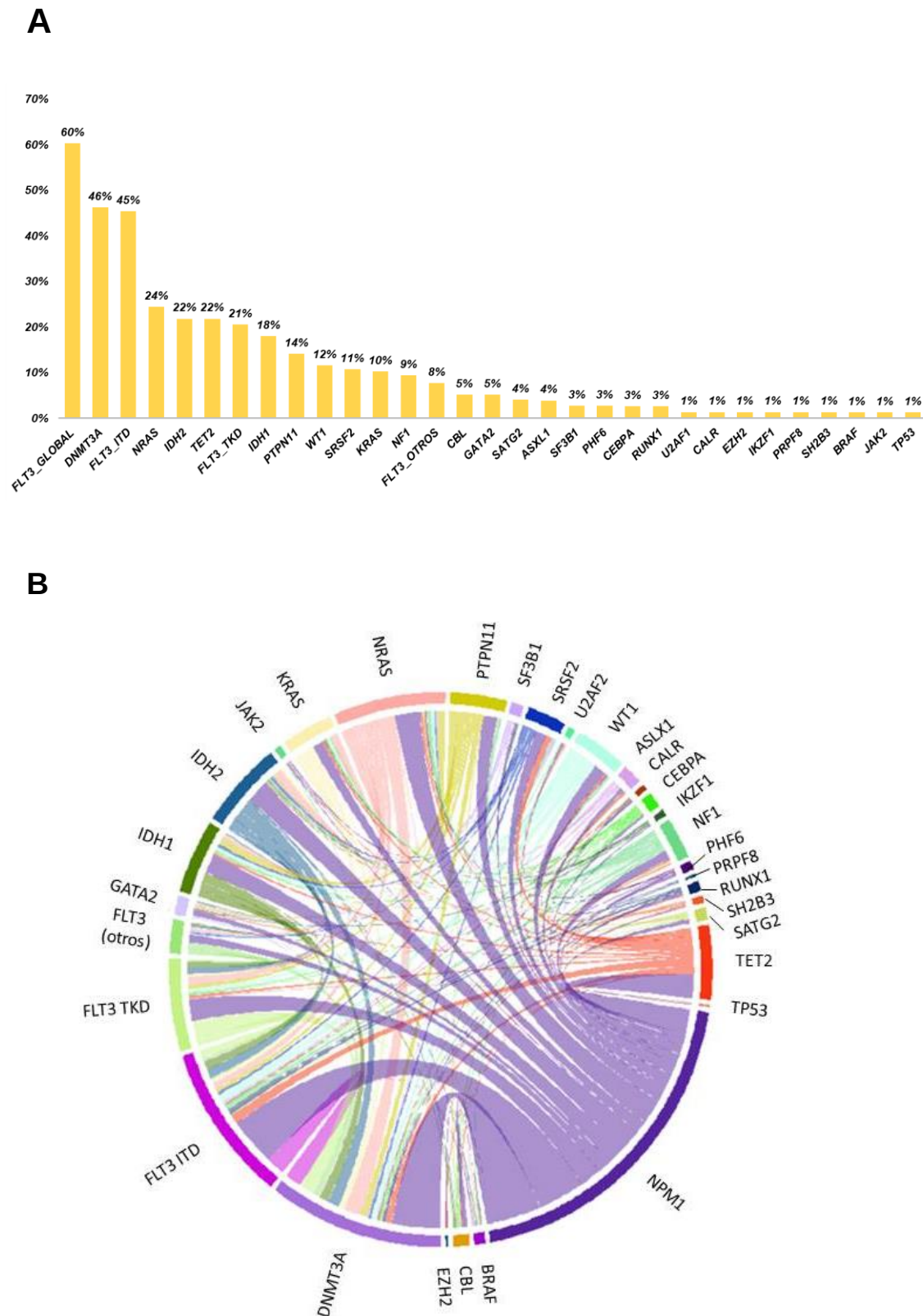


Figura 24. Prevalencia mutacional (A) y diagrama de circos (B) que muestran las principales comutaciones de *NPM1*. ITD: *internal tandem duplication*. *FLT3* global: todas las variantes detectadas en *FLT3*. TKD: *tyrosine kinase domain*.

La distribución de las frecuencias alélicas en el momento del diagnóstico para *NPM1* y las comutaciones más comunes se muestran en la **Figura 25**. La mediana de VAF de los genes asociados a la regulación de la metilación del ADN fueron todas relativamente más altas que las de *NPM1* (34%) y las del resto de los genes, variando entre 47% (*DNMT3A* y *TET2*), 46% (*IDH2*) y 45% (*IDH1*). La mediana de VAF para los genes implicados en la vía RAS y las mutaciones en *FLT3* fueron generalmente más bajas, a excepción de *NF1*. En los casos en los que se detectaron múltiples variantes en un mismo gen se utilizó para los análisis la frecuencia alélica mayor.

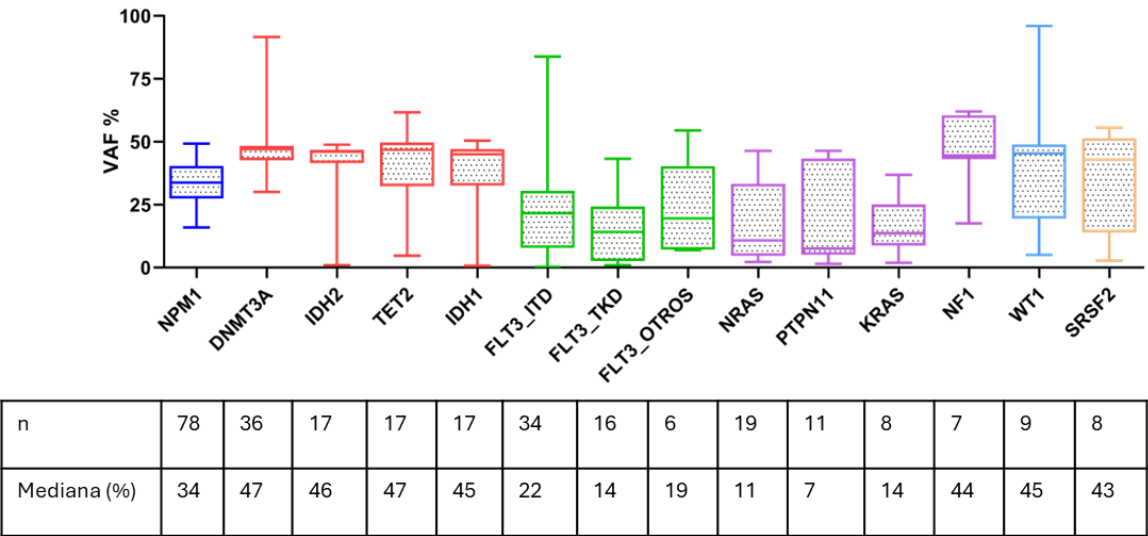


Figura 25. Diagrama de cajas y bigotes que muestran la mediana y rango de la frecuencia alélica de *NPM1* (azul oscuro) y las comutaciones más comunes al diagnóstico: mutaciones en genes asociados a la metilación del ADN (rojo), mutaciones en *FLT3* (verde), mutaciones en genes de la vía RAS (morado), *WT1* (azul claro) y *SRSF2* (amarillo). En los casos en los que se detectaron múltiples variantes en un mismo gen se utilizó para los análisis la frecuencia alélica mayor.

5.2.3. Correlación fenotipo-molecular

Se estudió la correlación entre los diferentes patrones inmunofenotípicos y la prevalencia mutacional de los 78 casos en los que los resultados de la NGS estuvieron disponibles (**Tabla 16**). La clasificación-R fue la utilizada para evaluar la correlación inmunofenotipo-genotipo en la que se consideraron todas las poblaciones de células leucémicas (inmaduras, comprometidas a LMNM y monocíticas) presentes en los pacientes independientemente de su porcentaje.

En el patrón 1, constituido por la población de células leucémicas inmaduras, los genes *DNMT3A* y *FLT3*-ITD fueron los más frecuentes detectados, con un 62% y 38% respectivamente, seguidos de *NRAS* e *IDH2* (31% en cada uno) y *PTPN11* (23%). La prevalencia del resto de los genes (*FLT3*-TKD, *IDH1*, *WT1*, *SRSF2*, *KRAS*, *NF1*) fue menor al 20%. No se observaron alteraciones en *TET2* y en *FLT3*-otros (regiones no ITD ni TKD) (**Figura 26**).

En el patrón 2, referido a la población de células leucémicas comprometidas a LMNM, la prevalencia mutacional de los genes *FLT3*-ITD (64%) e *IDH1* (43%) fueron las más altas respecto al resto de los patrones inmunofenotípicos, seguidos de *DNMT3A*, *TET2* y *NF1* (21% en cada uno). Otros genes (*IDH2*, *FLT3*-TKD, *PTPN11*, *WT1*, *SRSF2* y *FLT3*-otros) mostraron una frecuencia menor al 20%. No se observaron alteraciones en *KRAS* y en *NRAS* (**Figura 26**).

En el patrón 3, correspondiente a la población de células leucémicas monocíticas, los genes *TET2* y *SRSF2* fueron los más frecuentes con un 75% y un 50%, respectivamente, seguidos de *NRAS*, *PTPN11* y *NF1* (25% en cada uno). No se observaron alteraciones en *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH2*, *IDH1*, *WT1* y *KRAS*. Además, las frecuencias observadas para *TET2* y *SRSF2* en este grupo fueron las más altas en comparación con el resto de los patrones inmunofenotípicos.

En el patrón 4, que combinó las poblaciones de células leucémicas inmaduras y monocíticas, las alteraciones en *DNMT3A* (65%), *FLT3*-ITD y TKD (46% y 42%, respectivamente) y *NRAS* (35%) fueron las más prevalentes. En el resto de los genes (*IDH2*, *TET2*, *IDH1*, *PTPN11*, *WT1*, *KRAS*, *NF1* y *FLT3*-otros) la frecuencia fue menor al 20%, a excepción de *SRSF2* que no presentó alteraciones en este patrón inmunofenotípico.

En el patrón 5, constituido por la población de células leucémicas inmaduras y comprometidas a LMNM, el gen *DNMT3A* (60%) fue el más prevalente, seguido de *FLT3*-ITD, *IDH2*, *TET2*, *IDH1*, *SRSF2* (40% en cada uno). La prevalencia mutacional en

el resto de los genes (*NRAS*, *FLT3*-TKD, *WT1* y *FLT3*-otros) fue igual a 20% y no se observaron alteraciones en *PTPN11*, *KRAS* y *NF1*.

En el patrón 6, correspondiente a las poblaciones de células leucémicas comprometidas a LMNM y monocíticas, las alteraciones en *FLT3*-ITD, *TET2* e *IDH2* fueron las más frecuentes (67%, 50% y 40, respectivamente), seguidos de *DNMT3A* (20%). Los genes *NRAS*, *WT1* y *SRSF2* presentaron frecuencias menores al 20%, y no se observaron alteraciones en los genes *FLT3* TKD, *FLT3*- otros, *IDH1*, *PTPN11*, *KRAS* y *NF1*.

En el patrón 7, que combinó las tres poblaciones leucémicas, los genes *DNMT3A*, *NRAS* y *KRAS* mostraron las mayores frecuencias con un 50%, seguidos de *TET2*, *IDH1* y *PTPN11* (33% en cada uno). Los genes *FLT3*-ITD y *WT1* presentaron frecuencias menores al 20%. No se observaron alteraciones en *IDH2*, *SRSF2*, *NF1* y en la región no ITD de *FLT3* (**Figura 26**).

Tabla 16. Prevalencia de las comutaciones de *NPM1* según el patrón inmunofenotípico de la Clasificación-R.

Gen	Patrón inmunofenotípico de la clasificación-R						
	1 (n=13), n (%)	2 (n=14), n (%)	3 (n=4), n (%)	4 (n=26), n (%)	5 (n=5), n (%)	6 (n=10), n (%)	7 (n=6), n (%)
<i>DNMT3A</i>	8 (62)	3 (21)	0 (0)	17 (65)	3 (60)	2 (20)	3 (50)
<i>FLT3_ITD*</i>	5 (38)	9 (64)	0 (0)	11 (46)	2 (40)	6 (67)	1 (17)
<i>NRAS</i>	4 (31)	0 (0)	1 (25)	9 (35)	1 (20)	1 (10)	3 (50)
<i>IDH2</i>	4 (31)	2 (14)	0 (0)	5 (19)	2 (40)	4 (40)	0 (0)
<i>TET2</i>	0 (0)	3 (21)	3 (75)	2 (8)	2 (40)	5 (50)	2 (33)
<i>FLT3_TKD</i>	2 (15)	2 (14)	0 (0)	11 (42)	1 (20)	0 (0)	0 (0)
<i>IDH1</i>	1 (8)	6 (43)	0 (0)	3 (12)	2 (40)	0 (0)	2 (33)
<i>PTPN11</i>	3 (23)	2 (14)	1 (25)	3 (12)	0 (0)	0 (0)	2 (33)
<i>WT1</i>	1 (8)	1 (7)	0 (0)	4 (15)	1 (20)	1 (10)	1 (17)
<i>SRSF2*</i>	1 (8)	2 (14)	2 (50)	0 (0)	2 (40)	1 (11)	0 (0)
<i>KRAS</i>	1 (8)	0 (0)	0 (0)	4 (15)	0 (0)	0 (0)	3 (50)
<i>NF1*</i>	2 (15)	3 (21)	1 (25)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>FLT3_OTROS</i>	0 (0)	2 (14)	0 (0)	3 (12)	1 (20)	0 (0)	0 (0)
<i>CBL</i>	0 (0)	1 (7)	1 (25)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (17)
<i>GATA2</i>	1 (8)	2 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (17)
<i>SATG2*</i>	1 (8)	2 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ASXL1</i>	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	0 (0)
<i>SF3B1*</i>	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>PHF6*</i>	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>CEBPA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (17)
<i>RUNX1</i>	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
<i>U2AF1*</i>	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>CALR*</i>	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>EZH2*</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11)	0 (0)
<i>IKZF1*</i>	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>PRPF8*</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>SH2B3*</i>	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>BRAF</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>JAK2</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
<i>TP53</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Los resultados se muestran como número de casos (%). * Genes no evaluados en 2 pacientes en el patrón 4 y 1 en el patrón 6.

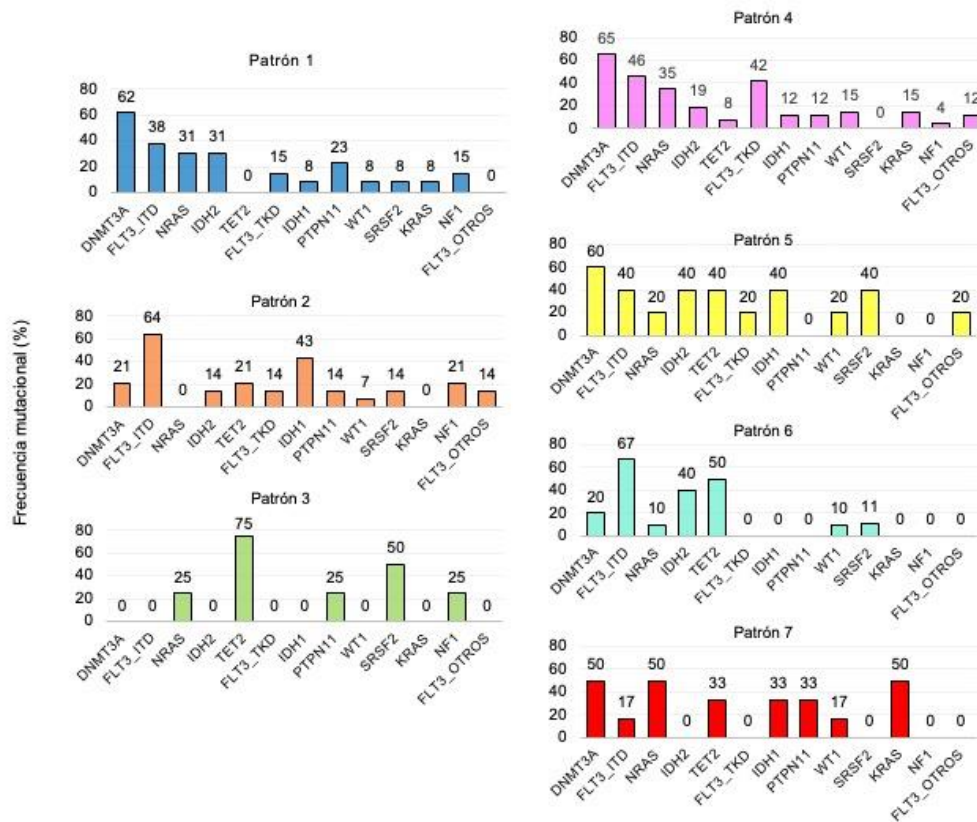


Figura 26. Prevalencia mutacional de las principales comutaciones de *NPM1* según el patrón inmunofenotípico de la clasificación-R.

El análisis realizado para evaluar posibles diferencias significativas entre los distintos patrones inmunofenotípicos y algunas características moleculares de la enfermedad, como la frecuencia alélica de *NPM1*, el número de mutaciones y la presencia de alteraciones en el cariotipo, no mostró diferencias significativas (**Figura 27**).

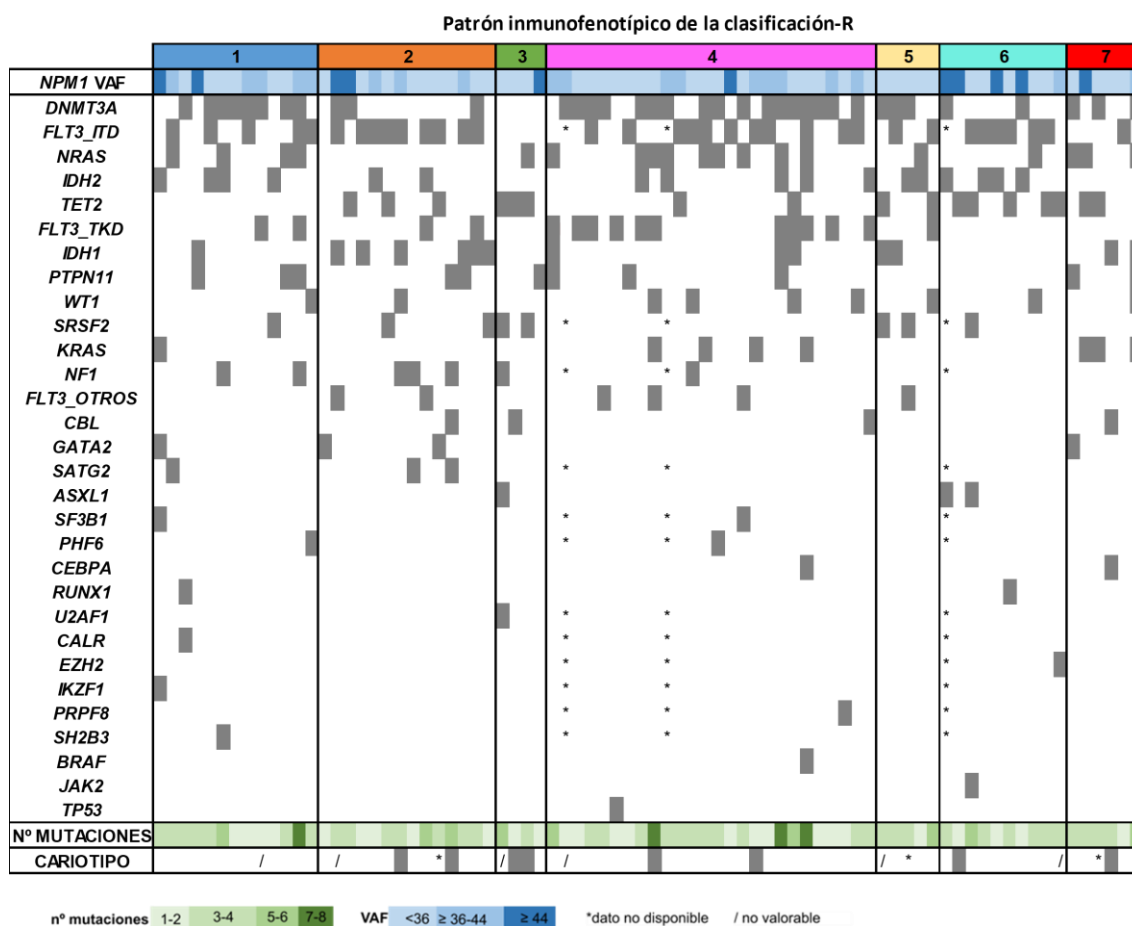


Figura 27. Mutaciones concomitantes de *NPM1* en los pacientes de la serie distribuidos según el patrón inmunofenotípico de la clasificación-R. Cada columna es un paciente. Se muestran todas las mutaciones concomitantes identificadas.

5.2.4. Impacto pronóstico de la clasificación inmunofenotípica

Se estudió el impacto pronóstico del inmunofenotipo al diagnóstico en aquellos pacientes tratados con quimioterapia intensiva. En un primer análisis, los pacientes se estratificaron según la población mayoritaria observada al diagnóstico: población de célula leucémicas inmaduras, comprometidas a LMNM o monocíticas, sin observarse diferencias significativas entre estos grupos (**Figura 28 A y B**). Sin embargo, se evidenció una tendencia de los pacientes con población mayoritaria de células

leucémicas monocíticas hacia una menor IAR. Tras estos resultados, se realizó otro análisis en el que se agruparon los pacientes según fuese la población mayoritaria “mieloide” (incluyendo pacientes con población de células leucémicas inmaduras más los pacientes con población de células leucémicas comprometidas a LMNM) o “monocítica” (**Figura 28 C y D**). En un segundo análisis, los pacientes se estratificaron según los patrones inmunofenotípicos observados en la clasificación-R. En primer lugar, agrupando los patrones que contenían población de células leucémicas inmaduras: 1, 4, 5 y 7; frente al resto: 2, 3 y 6 (**Figura 28 E y F**) y en segundo lugar se compararon aquellos pacientes cuyos patrones inmunofenotípicos contenían población de células leucémicas monocíticas (3, 4, 6 y 7) frente al resto (1, 2 y 5). En este último análisis se evidenció de nuevo una tendencia a una menor IAR en los pacientes con patrones que incluyeron células leucémicas monocíticas (**Figura 28 G y H**).

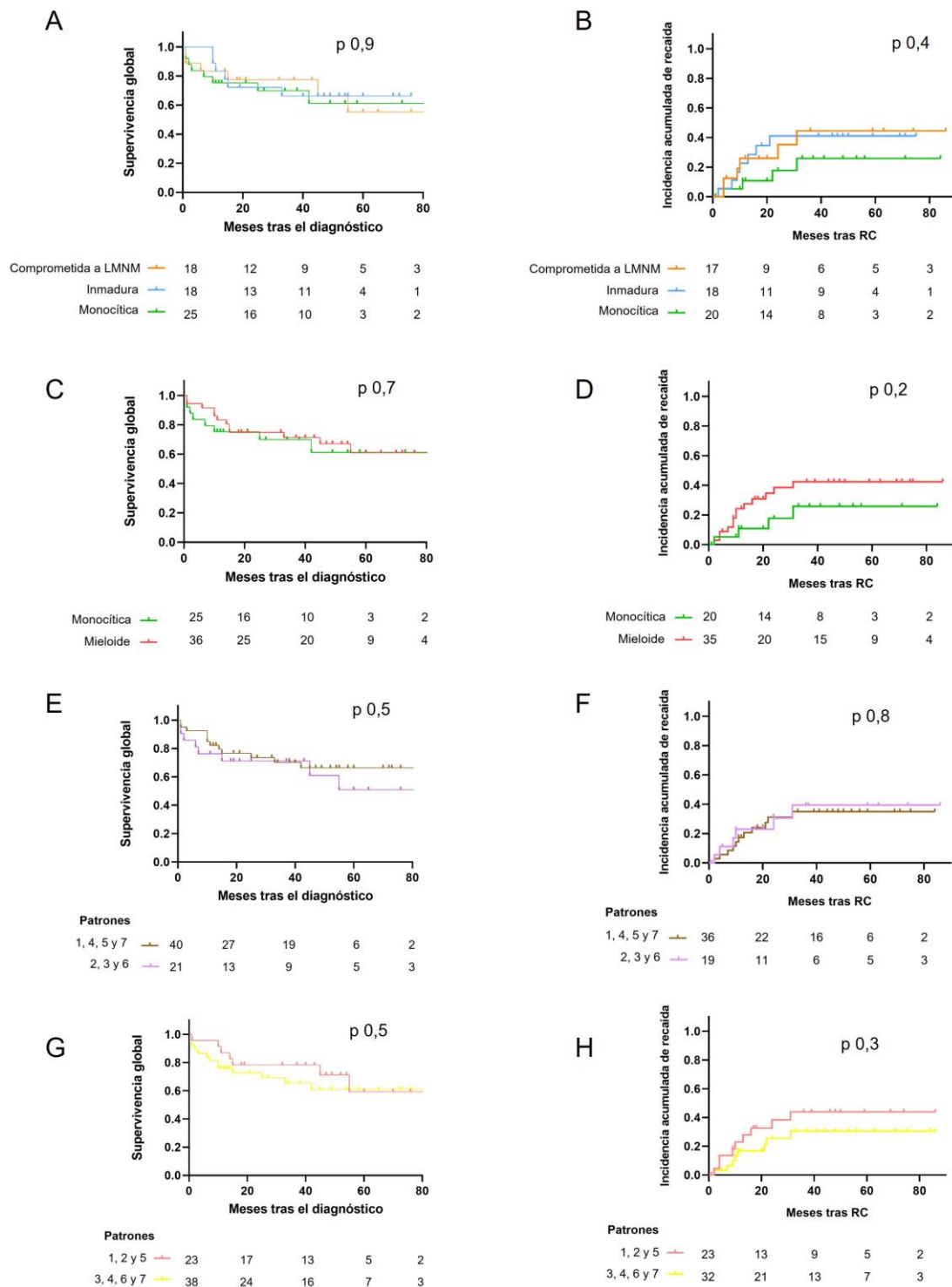


Figura 28. Curvas de supervivencia global e incidencia acumulada de recaída en los pacientes con leucemia mieloblástica aguda *NPM1* tratados con quimioterapia intensiva y estratificados según las poblaciones leucémicas mayoritarias (A, B, C y D) o los diferentes patrones inmunofenotípicos observados al diagnóstico (E, F, G y H). En las gráficas A y B, se estratificaron los pacientes según fuese la población mayoritaria al diagnóstico. En las gráficas C y D se comparó los pacientes según fuese la población mayoritaria al diagnóstico realizándose dos

grupos: mieloide en el que se consideran aquellos pacientes con población de células leucémicas inmaduras más los pacientes con población de células leucémicas comprometidas a LMNM frente a los pacientes con población de células leucémicas monocíticas. En los gráficos E y F se compararon aquellos pacientes cuyos patrones inmunofenotípicos contenían población de células leucémicas inmaduras (1, 4, 5 y 7) frente al resto. Por último, en los gráficos G y H se compararon aquellos pacientes cuyos patrones inmunofenotípicos contenían población de células leucémicas monocíticas (3, 4, 6 y 7) frente al resto.

5.3. Caracterización biológica en la recaída

De los 91 pacientes incluidos en el estudio en los que se realizó el seguimiento, se objetivó la recaída en 26 (29%) de ellos, mientras que 6 pacientes (7%) presentaron resistencia primaria. La mediana de tiempo hasta la recaída fue de 12 meses (rango, 2-64 meses). De los pacientes con recaída, 17 (65%) fueron tratados con quimioterapia intensiva, mientras que esta opción se desestimó en los 9 restantes. La recaída fue hematológica en 25 pacientes, documentándose además infiltración ovárica en uno de ellos. En el paciente restante la recaída fue extramedular aislada con infiltración pleural. De los 6 pacientes con resistencia primaria, a 2 de ellos (33%) se les administró quimioterapia intensiva mientras que en los 4 restantes fue desestimada.

5.3.1. Inmunofenotipo

El estudio mediante citometría de flujo fue efectuado en 21 de los 26 pacientes en recaída. En dos de ellos (9%) no se detectó la mutación *NPM1* y fueron excluidos de los análisis de este apartado de inmunofenotipo que se evaluó en los 19 restantes. Estos dos casos se describen de forma pormenorizada y por separado en el apartado 5.3.4 Pérdida de *NPM1* a la recaída.

Se analizó nuevamente la presencia de las tres principales poblaciones de células leucémicas (inmaduras, comprometidas a LMNM y monocíticas) y se comparó el perfil inmunofenotípico con el que presentaron al diagnóstico (**Tabla 17**). Dada la escasa muestra disponible de algunos pacientes en la recaída no se pudo realizar el estudio de ALOT y el tubo 7 del panel de LMA/SMD en la mayoría de ellos.

Tabla 17. Comparativa de los resultados de la expresión de los diferentes antígenos analizados en las tres principales poblaciones de células leucémicas entre el diagnóstico y la recaída.

AcMo	Población de células leucémicas					
	Inmaduras		Comprometidas a LMNM		Monocíticas	
	Mediana (rango) %		Mediana (rango) %		Mediana (rango) %	
	Diagnóstico (n=59)	Recaída (n=12)	Diagnóstico (n=40)	Recaída (n=12)	Diagnóstico (n=53)	Recaída (n=5)
CD4	8 (0-89)	0 (0-75)	27 (0-84)	0 (0-75)	84 (0-100)	89 (76-100)
CD7	32 (0-92)	24 (0-84)	0 (0-86)	0 (0-60)	0 (0-89)	0 (0-5)
CD11b	0 (0-16)	0 (0-70)	0 (0-9)	0 (0-7)	90 (20-100)	44 (30-66)
CD13	95 (0-100)	99 (51-100)	63 (0-100)	97 (0-100)	26 (0-100)	63 (0-100)
CD14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-6)	0 (0-0)	50 (0-96)	24 (0,5-89)
CD15	14 (0-100)	40 (5-76)	7 (0-47)	24 (0-76)	94 (0-100)	100 (53-100)
CD22	0 (0-72)	2 (0-43)	0 (0-45)	0 (0-5)	ND	ND
CD33	100 (0-100)	100 (100-100)	100 (56-100)	100 (93-100)	100 (97-100)	100 (100-100)
CD34	4 (0-100)	18 (0-100)	0 (0-70)	4 (0-100)	0 (0-88)	0 (0-72)
CD35	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-14)	0 (0-0)	64 (0-100)	23 (0,7-84)
CD36	2 (0-57)	3 (0-84)	0 (0-22)	1 (0-25)	100 (6-100)	83 (65-96)
CD38	89 (24-100)	88 (32-100)	69 (5-100)	80 (0-100)	99 (0-100)	97 (73-100)
CD56	0 (0-17)	0 (0-14)	0 (0-100)	0 (0-96)	19 (0-100)	12 (0-60)
CD64	22 (0-90)	7 (0-81)	32 (0-98)	24 (0-78)	100 (44-100)	100 (50-100)
CD71	67 (0-100)	71 (0-90)	52 (0-100)	71 (0-100)	0 (0-86)	58 (43-91)
CD105	0 (0-90)	0 (0-89)	1 (0-96)	63 (0-99)	58 (0-100)	64 (0-74)
CD117	98 (75-100)	100 (50-100)	86 (13-100)	76 (3-100)	0,14 (0-84)	21 (0-61)
CD123	100 (62-100)	100 (60-100)	95 (0-100)	100 (17-100)	95 (23-100)	100 (74-100)
CD300e	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	54 (0-92)	8 (1-71)
HLADR	95 (45-100)	97 (82-100)	0 (0-22)	0 (0-5)	100 (0-100)	100 (89-100)
NG2	0 (0-5)	0 (0-0)	0 (0-5)	0 (0-5)	0 (0-90)	0 (0-0)
TDTn	0 (0-44)	0 (0-43)	0 (0-69)	0 (0-21)	0 (0-62)	0 (0-0)

AcMo: anticuerpo monoclonal. Los resultados se muestran como mediana (rango) del % de expresión. La mediana de expresión se realizó con todos los casos estudiados sin considerar el corte de expresión del 20%. ND: no disponible.

En la recaída, la población de células leucémicas inmaduras fue detectada en 12 casos, todos ellos presentaron esta población al diagnóstico. Los cambios inmunofenotípicos más frecuentes y relevantes en esta población fueron el aumento en la expresión de CD15 (8 casos) y de CD34 (7 casos), así como la disminución en la expresión de CD7 (6 casos) (**Tabla 17 y Figura 29**). A excepción de CD15, no se observaron diferencias significativas en la distribución de la expresión de los antígenos analizados.

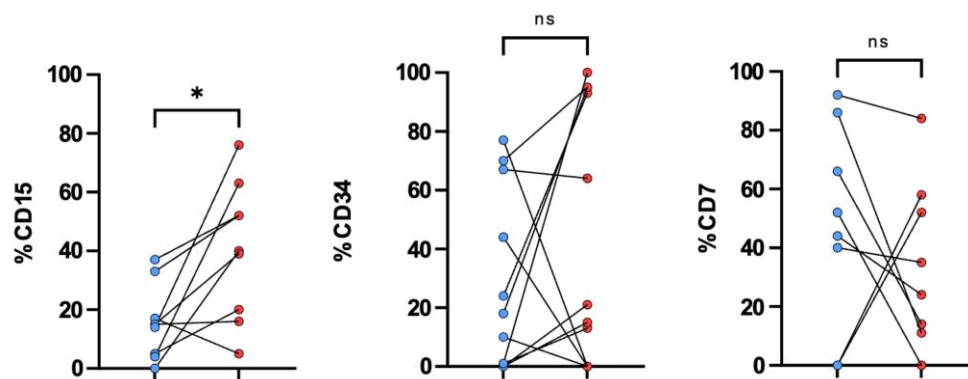


Figura 29. Gráficos comparativos de la expresión de CD15, CD34 y CD7 en la población de células leucémicas inmaduras al diagnóstico (círculo azul) y en la recaída (círculo rojo). Los resultados muestran el porcentaje de expresión para cada antígeno. Las diferencias estadísticas se indican en los gráficos: *: $p < 0,05$. Los casos en los que no se encontraron diferencias significativas aparecen como ns.

La población de células leucémicas comprometidas a LMNM fue identificada en la recaída en 12 pacientes, de los cuales 5 no la presentaron al diagnóstico. Al comparar el inmunofenotipo de los casos en los que esta población ya estaba presente desde el inicio, se observó un aumento en el porcentaje de la expresión de CD34 en los 7 casos revisados ($p<0,05$) (**Figura 30**).

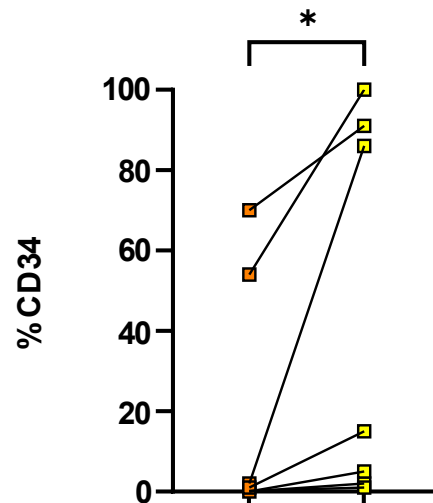


Figura 30. Gráfico comparativo de la expresión de CD34 en la población de células leucémicas comprometidas a LMNM entre el diagnóstico (cuadrado naranja) y la recaída (cuadrado amarillo). Los resultados muestran el porcentaje de expresión para cada antígeno. Las diferencias estadísticas se indican en el gráfico: *: $p<0,05$.

Por último, la población de células leucémicas monocíticas se identificó en 5 casos que ya la presentaron al diagnóstico. Lo más destacable fue la disminución en la expresión de antígenos asociados a madurez de la línea monocítica como CD11b, CD14, CD35, CD36 y CD300e, así como también una reducción en la expresión de CD56, aunque no se observaron diferencias significativas. En paralelo, se objetivó un aumento en la expresión de antígenos relacionados con inmadurez como CD117 en 3 casos y de CD34 únicamente en 1 paciente (**Figura 31**).

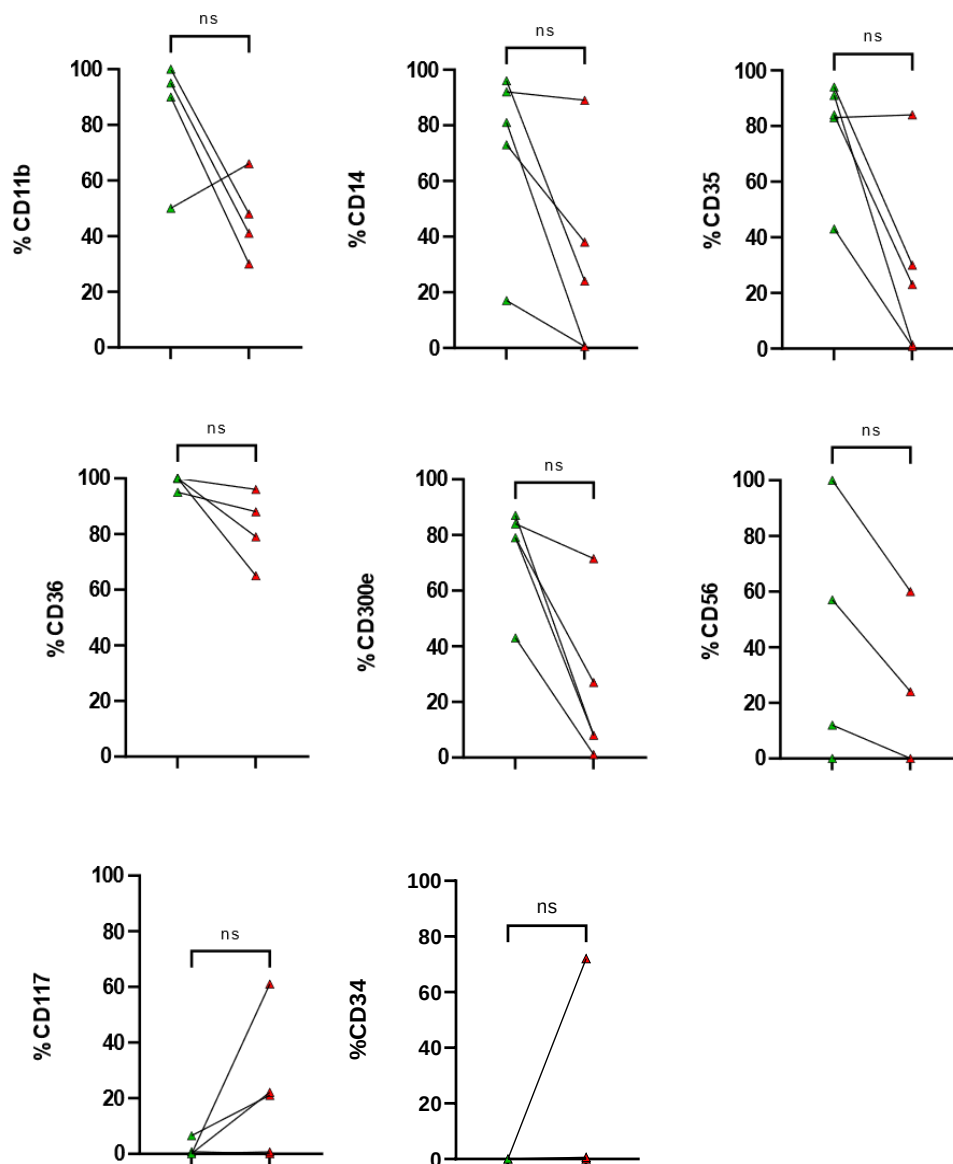


Figura 31. Gráficos comparativos de la expresión de diferentes antígenos en la población de células leucémicas monocíticas entre el diagnóstico (triángulo verde) y la recaída (triángulo rojo). Los resultados muestran el porcentaje de expresión para cada antígeno. No se encontraron diferencias significativas entre el diagnóstico y la recaída para ninguno de los antígenos (ns).

En los pacientes en los que se mantuvo la población leucémica monocítica en la recaída, se comparó el patrón de maduración y la distribución de las subpoblaciones monocíticas respecto al diagnóstico.

Se observó una mayor mediana de infiltración por células más inmaduras como monoblastos $CD34^+CD117^+$ y promonocitos $CD34^+CD117^+CD14^+CD35^+CD300e^-$, así como una disminución de la mediana de infiltración por monocitos atípicos en la recaída con respecto al diagnóstico, sin encontrar diferencias significativas entre ambos momentos de estudio (**Figura 32 y 33**).

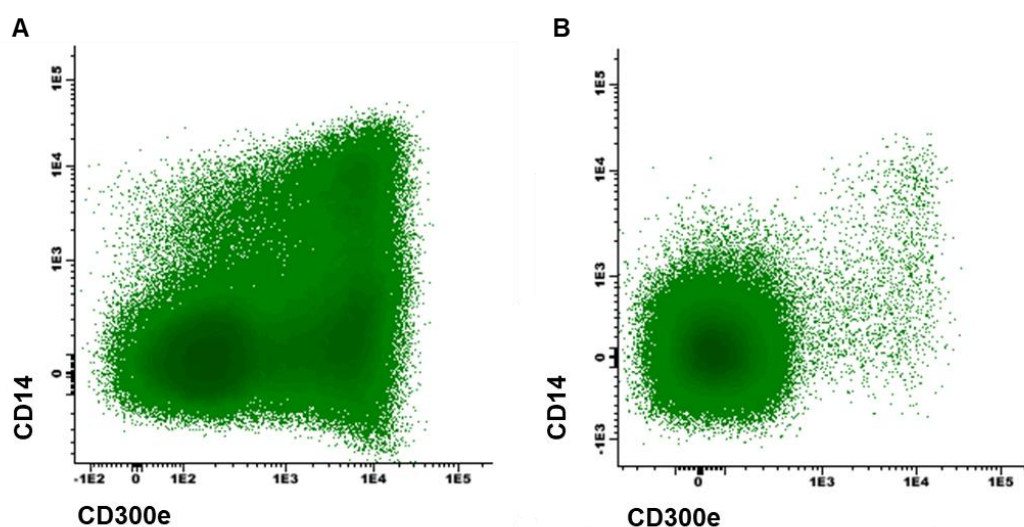


Figura 32. Diagramas biparamétricos del patrón madurativo CD14/CD300e de las células monocíticas leucémicas del paciente 61 al diagnóstico (A) y en la recaída (B). En la imagen se muestra cómo en el diagnóstico (A) se observó la presencia de formas tanto inmaduras como más diferenciadas. En la recaída (B) se evidenció un bloqueo madurativo con infiltración por formas más inmaduras $CD14^+CD300e^-$. Además, en ambos momentos se evidenció un asincronismo madurativo en el patrón de maduración CD14/CD300e.

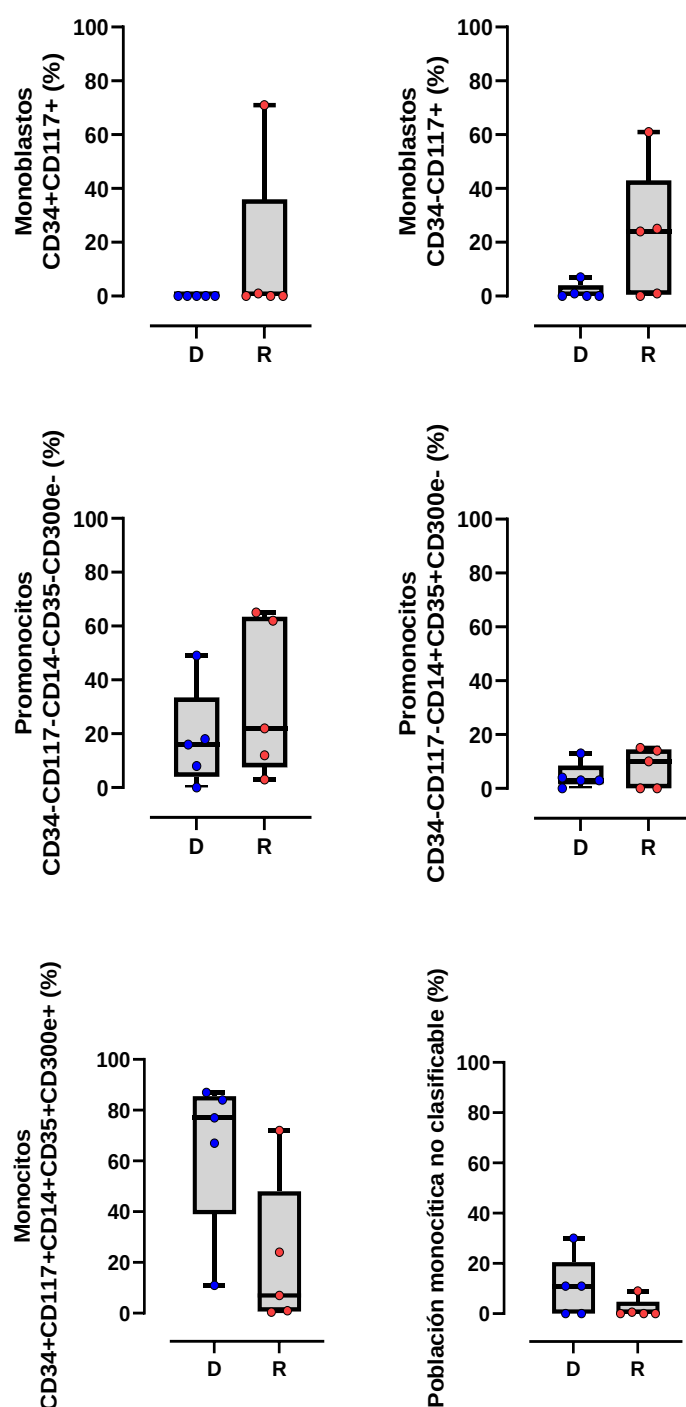


Figura 33. Gráficos comparativos de la distribución de las diferentes subpoblaciones del compartimento leucémico monocítico entre el diagnóstico (D, círculos azules) y la recaída (R, círculos rojos). En el diagrama se muestran mediana y rango. No se observaron diferencias significativas. En el gráfico de “población monocítica no clasificable” se consideró el porcentaje de celularidad que no pudo ser asignada a ningún estadio madurativo ya que presentaba asincronismo en los patrones de maduración.

En los cinco pacientes en los que se detectó en la recaída la población de células leucémicas monocíticas se valoró nuevamente el patrón de maduración de la línea monocítica: 2 pacientes no presentaron alteraciones ni al diagnóstico ni en la recaída; en los 3 pacientes restantes se identificaron asincronismos madurativos al diagnóstico (ganancia de CD300e previa a la expresión de CD14 y alteraciones del patrón de expresión de CD14 y CD35: CD14⁺CD35⁺), objetivándose la pérdida de ambas alteraciones en la recaída en 1 de estos 3 pacientes (20% de los casos).

Se analizó la evolución de los patrones inmunofenotípicos establecidos en nuestra clasificación-R entre el diagnóstico y la recaída para dilucidar la dinámica del comportamiento de las diferentes poblaciones involucradas en la LMA con mutación *NPM1*.

En un 42% de los pacientes se evidenció un cambio de patrón inmunofenotípico entre el diagnóstico y la recaída. En un 63% de estos casos se observó la aparición de una nueva población de células leucémicas comprometidas a LMNM que no estuvo presente al diagnóstico. Esta nueva población se clasificó en todos los casos como un patrón combinado con otra población leucémica.

A continuación, se describe la evolución detectada a partir de cada uno de los patrones del diagnóstico (D) según la clasificación-R y los cambios observados en la recaída (R) (**Figura 34**):

- Patrón 1D: dos casos mantuvieron su perfil inmunofenotípico, permaneciendo en la categoría de una única población de células leucémicas inmaduras durante la recaída (1R). En un caso, se observó un cambio del patrón 1D al patrón 5R, con la detección de una población de células leucémicas comprometidas a LMNM, mientras que la población de células leucémicas inmaduras persistió en la muestra.
- Patrón 2D: cinco casos mantuvieron un perfil de población de células leucémicas comprometidas a LMNM durante la recaída (2R), mostrando estabilidad fenotípica sin cambios significativos.
- Patrón 3D: un caso se mantuvo en la categoría de población de células leucémicas monocíticas (3R), sin variaciones que indicaran una evolución fenotípica durante la recaída.
- Patrón 4D (incluye tanto la población de células leucémicas inmaduras como la de monocítica): dos casos permanecieron en este patrón (4R). Los cambios registrados incluyeron un caso que evolucionó al patrón 1R por la desaparición

de la población de células leucémicas monocíticas, manteniéndose la población leucémica inmadura; dos casos que evolucionaron al patrón 5R con desaparición de la población leucémica monocítica y la detección de células leucémicas comprometidas a LMNM junto con la persistencia de la población leucémica inmadura. Además, dos pacientes progresaron del patrón 4D al patrón 7R, con la aparición de una población leucémica comprometida a LMNM y la persistencia de las poblaciones células leucémicas inmaduras y monocíticas.

- Patrón 5D: un caso mantuvo este perfil inmunofenotípico durante la recaída (5R), mientras que otro paciente experimentó un cambio del patrón 5D al 2R, con desaparición de la población leucémica inmadura y el mantenimiento de la población comprometida a LMNM.
- Patrón 6D: no se observaron pacientes en recaída con este patrón al diagnóstico.
- Patrón 7D: un caso mostró una transición del patrón 7D al patrón 1R, con desaparición tanto de la población de células leucémicas comprometida a LMNM como de la monocítica, manteniendo únicamente la población inmadura.

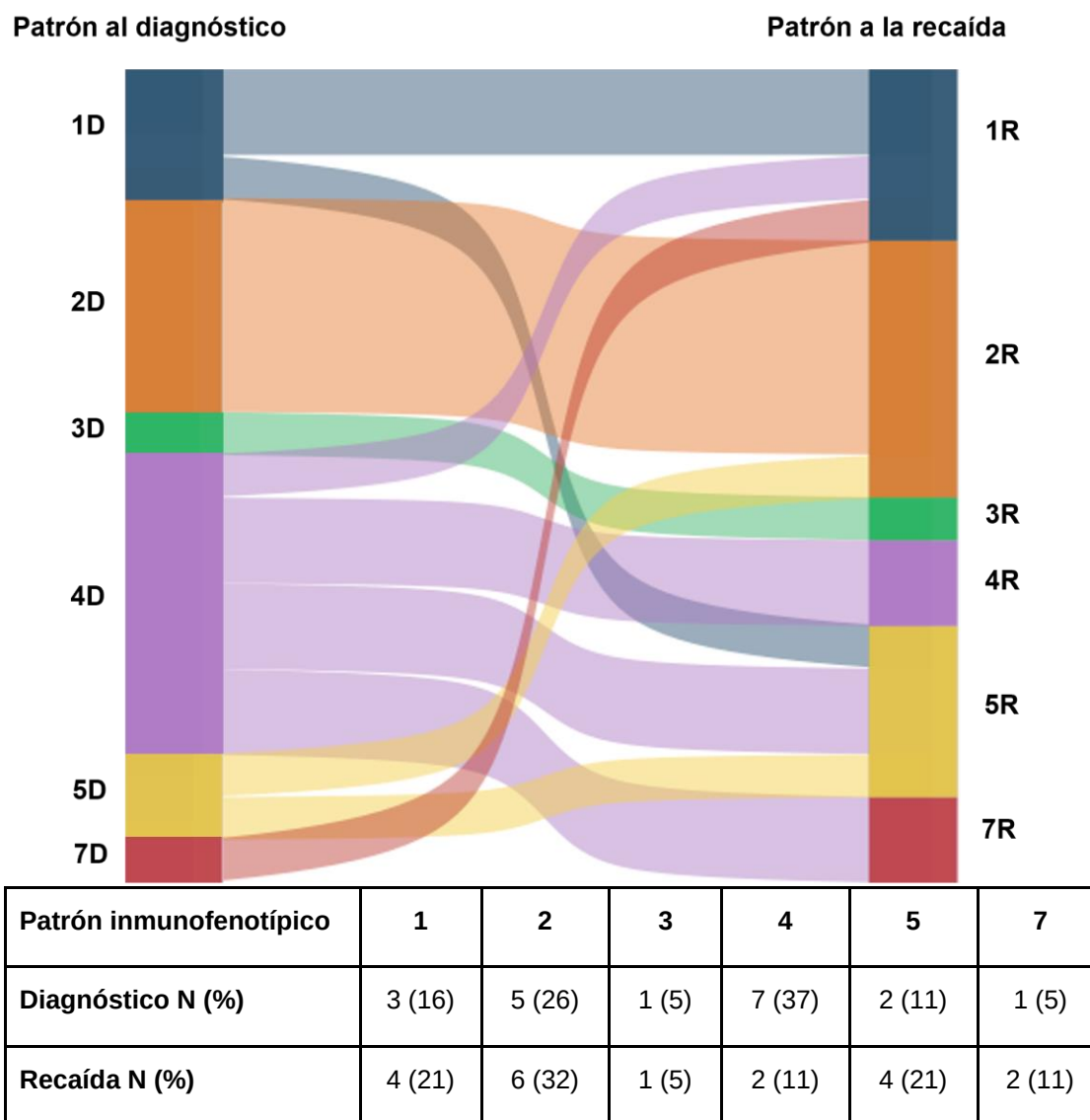


Figura 34. Diagrama de Sankey que ilustra el cambio de los patrones inmunofenotípicos entre el diagnóstico (D) y la recaída (R) según la clasificación-R propuesta en este estudio.

El estudio mediante citometría de flujo se realizó nuevamente en 2 de los 6 pacientes que presentaron resistencia. No se evidenciaron cambios en el patrón inmunofenotípico entre el diagnóstico y la resistencia en ninguno de los dos casos.

5.3.2. Alteraciones moleculares

En 22 de los 26 pacientes que presentaron recaída estuvo disponible el estudio de biología molecular. Se estudiaron los cambios en el perfil mutacional entre el diagnóstico y la recaída (**Figura 35**).

El patrón mutacional para *NPM1* se mantuvo estable en el 91% de los pacientes.

Los genes más estables fueron *DNMT3A*, *IDH2*, *IDH1*, *NF1* con tasas de estabilidad del 100%. Además, en estos genes se observaron adquisiciones de nuevas mutaciones en la recaída en un 18%, 12%, 11% y 6%, respectivamente. En contraste, algunos genes asociados a vías de señalización como *FLT3-ITD* (70%), *FLT3-TKD* (75%) y *NRAS* (67%); junto con *TET2* (67%) y *SRSF2* (75%) mostraron una mayor inestabilidad durante la recaída. Es importante destacar que, mientras que las mutaciones en *FLT3-ITD* se perdieron y adquirieron en proporciones similares, las mutaciones en *NRAS* predominante se perdieron.

La estabilidad se calculó dividiendo el número de mutaciones que persistieron en la recaída entre todas las mutaciones presentes en el diagnóstico. La adquisición en la recaída se calculó dividiendo el número de casos que adquirieron una nueva mutación en la recaída y que no se detectaron en el diagnóstico entre el número de casos que no tenían la misma mutación al diagnóstico. Las mutaciones en el mismo gen, pero de tipo diferente se consideran como pérdida y nueva adquisición de una mutación.

No se observaron cambios en el perfil mutacional entre el diagnóstico y la resistencia en los 2 pacientes en los que estuvo disponible el estudio de biología molecular (**Figura 36**).

		Tratamiento intensivo																						ESTABILIDAD	ADQUISICIÓN
NPM1	D																								
	R																								
DNMT3A	D																								
	R																								
FLT3-ITD	D																								
	R																								
IDH2	D																								
	R																								
TET2	D																								
	R																								
IDH1	D																								
	R																								
NF1	D																								
	R																								
FLT3-TKD	D																								
	R																								
SRSF2	D																								
	R																								
NRAS	D																								
	R																								
FLT3-OTROS	D																								
	R																								
WT1	D																								
	R																								
CEBPA	D																								
	R																								
GATA2	D																								
	R																								
KRAS	D																								
	R																								
PTPN11	D																								
	R																								
CBL	D																								
	R																								
RUNX1	D																								
	R																								
SF3B1	D																								
	R																								
U2AF1	D																								
	R																								
PRPF8	D																								
	R																								
CALR	D																								
	R																								
TP53	D																								
	R																								
BRAF	D																								
	R																								
SH2B3	D																								
	R																								
STAG2	D																								
	R																								
ASXL1	D																								
	R																								
ETV6-CHIC2*	D																								
	R																								

Figura 35. Patrón mutacional en muestras pareadas en el momento del diagnóstico (D) y primera recaída (R) de pacientes con mutación *NPM1*. Cada columna representa un paciente. Naranja oscuro: gen mutado; naranja claro: ausencia de detección de la mutación en otro momento de la enfermedad; blanco: no mutado; gris: dato no disponible; +: se adquiere una segunda mutación ++: se adquieren dos nuevas mutaciones; #: se pierde una de las mutaciones presentes al diagnóstico en la recaída. *: reordenamiento *ETV6-CHIC2* ITD: *internal tandem duplication*. TKD: *tyrosine kinase domain*. "Estabilidad" se calculó dividiendo el número de mutaciones que persistieron en la recaída entre todas las mutaciones presentes en el diagnóstico. "Adquisición" se calculó dividiendo el número de casos que adquirieron una nueva mutación en la recaída y que no se detectaron en el diagnóstico entre el número de casos que no tenían la misma mutación en el diagnóstico. Las mutaciones en el mismo gen, pero de tipo diferente se consideran como pérdida y nueva adquisición de una mutación. Para *PTPN11*, *PRPF8*, *TP53* y *ETV6-CHIC2* la estabilidad no pudo determinarse porque no se detectaron mutaciones en el diagnóstico. NA, no aplicable.

ESTABILIDAD (%)			
<i>NPM1</i>	D		
	R		
<i>FLT3-ITD</i>	D		
	R		
<i>NRAS</i>	D		
	R		
<i>STAG2</i>	D		
	R		

Figura 36. Patrón mutacional en muestras emparejadas en el momento del diagnóstico (D) y resistencia (R) de los 2 pacientes con mutación *NPM1* en resistencia. Cada columna representa un paciente. Naranja oscuro: gen mutado; blanco: no mutado; ITD: *internal tandem duplication*. La estabilidad mutacional se definió como el mantenimiento del perfil mutacional entre los dos momentos de estudio, es decir, cuando no se observó ni la adquisición ni la pérdida de mutaciones.

Los pacientes fueron clasificados en cuatro grupos según las diferencias observadas en el perfil mutacional entre el diagnóstico y la recaída. El grupo 1 incluyó a los pacientes que mantuvieron las mismas mutaciones en ambos momentos, denominándose "clon idéntico". En el grupo 2 se agruparon aquellos pacientes que perdieron mutaciones en la recaída en comparación con el diagnóstico, identificándose como "clon ancestral". El grupo 3 comprendió a los pacientes que, además de conservar las mismas mutaciones en la recaída, adquirieron otras nuevas, siendo designados como "clon inicial con evolución". Finalmente, en el grupo 4 se integraron los pacientes que perdieron algunas mutaciones y adquirieron otras en la recaída, clasificándose como "clon ancestral con evolución". No se observaron mutaciones no relacionadas con el diagnóstico en ningún paciente, por lo que no se designó ningún caso al grupo 5 "clon no relacionado" (**Figura 37**).

En este estudio, 4 de los 22 pacientes (18%) mantuvieron el mismo perfil mutacional tanto al diagnóstico como en la recaída (grupo 1). En contraste, los 18 pacientes restantes (82%), mostraron variaciones en su perfil mutacional (**Figura 37**):

- 3 (14%) pacientes perdieron una mutación (*FLT3-ITD*, *TET2*, *SRSF2* o *NPM1*) (grupo 2 "clon ancestral")
- 6 (27%) adquirieron una nueva mutación (*TP53*, *FLT3-ITD*, *DNMT3A* o *PTPN11*) (grupo 3 "clon inicial con evolución")

- 9 (41%) pacientes presentaron la adquisición y/o pérdida de ≥ 2 mutaciones (grupo 4 “clon ancestral con evolución”)

Es relevante mencionar que de los 2 pacientes que perdieron la mutación *NPM1*, en uno de ellos no se evidenciaron otros cambios en el perfil mutacional (se incluyó en el grupo 2) y en el otro restante se observó una pérdida de *TET2* y una adquisición de otra mutación en *DNMT3A* a la recaída (se incluyó en el grupo 4).

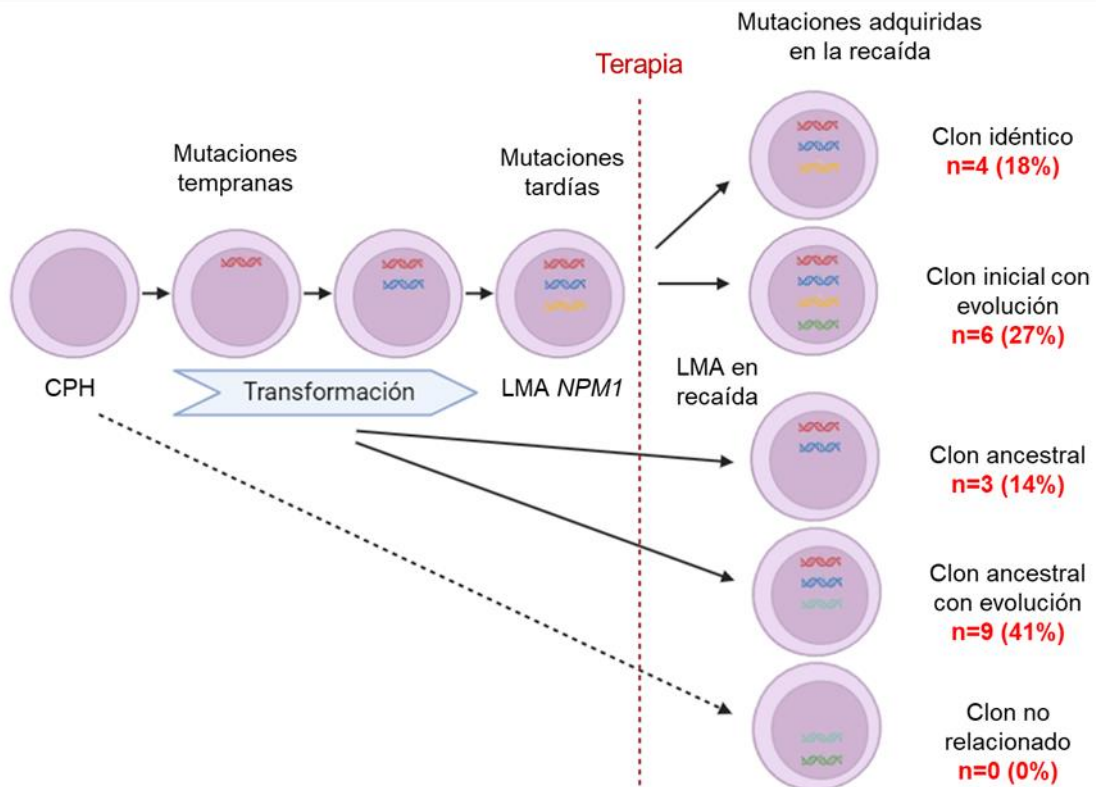


Figura 37. Modelo de evolución clonal basado en las diferencias entre el perfil mutacional del diagnóstico y de la recaída. CPH: célula progenitora hematopoyética. Figura adaptada de Kronke *et al.*, 2013 y creada con BioRender.com. Se tuvieron en cuenta pérdidas y ganancias de mutaciones en genes ya mutados.

Se llevó a cabo un análisis comparativo de la prevalencia mutacional entre los distintos momentos de estudio, únicamente se observaron diferencias significativas en el gen *PTPN11* entre el diagnóstico y la recaída y la resistencia (**Figura 38**). Así como también se comparó la frecuencia alélica de los genes más relevantes entre el diagnóstico, la recaída y la resistencia; los resultados se muestran en la **Figura 39**.

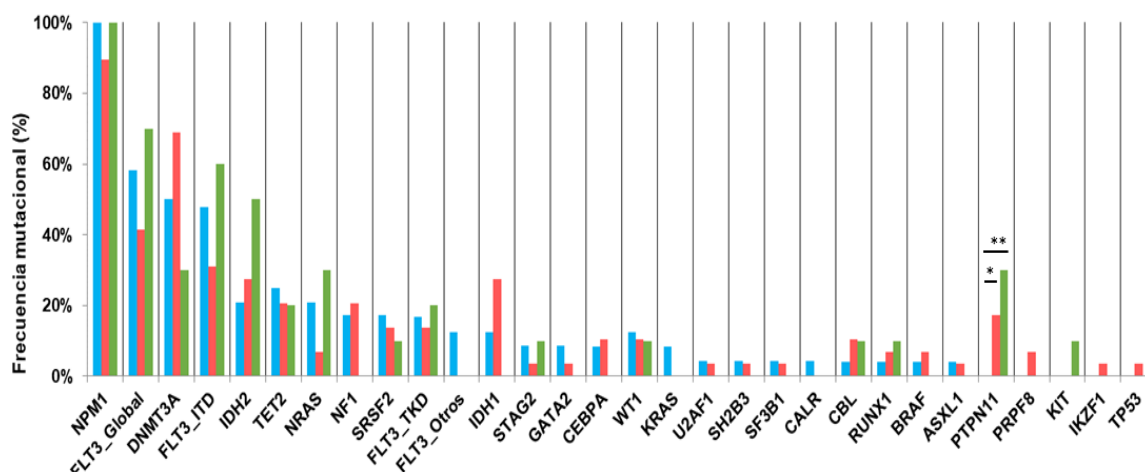


Figura 38. Gráfica comparativa de la frecuencia mutacional entre el diagnóstico (azul), recaída (rojo) y resistencia (verde). *: $p < 0,05$ y **: $p < 0,01$. ITD: *internal tandem duplication*. FLT3 global: todas las variantes detectadas en FLT3. TKD: *tyrosine kinase domain*.

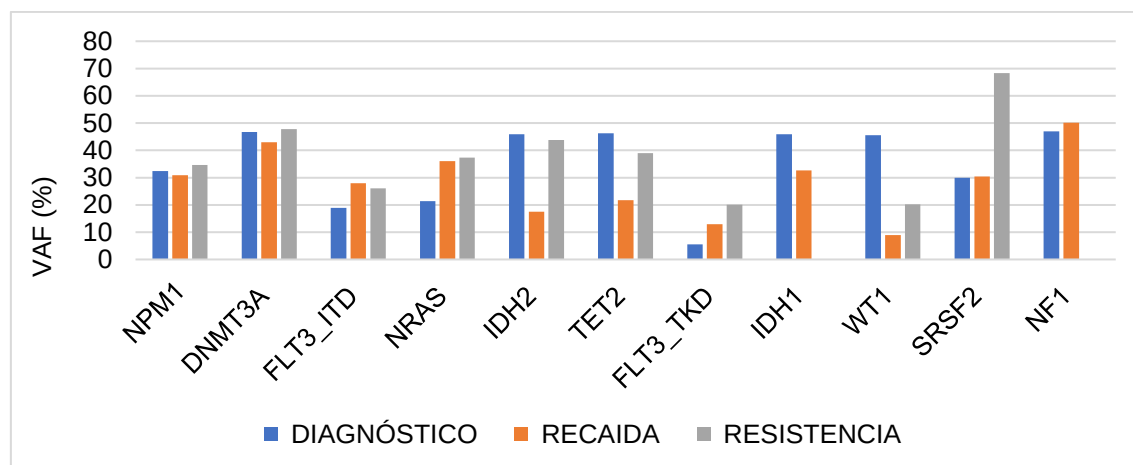


Figura 39. Gráfica comparativa de la mediana de la frecuencia alélica de los genes más relevantes entre el diagnóstico (azul), recaída (naranja) y resistencia (gris). ITD: *internal tandem duplication*. TKD: *tyrosine kinase domain*.

5.3.3. Correlación fenotipo-molecular

Se realizó un estudio comparativo entre el patrón inmunofenotípico y el perfil mutacional de los pacientes que experimentaron recaída. De los 25 pacientes con recaída hematológica incluidos en el estudio, únicamente 20 contaron con muestras pareadas para el estudio mediante CFM y biología molecular. Se excluyeron del análisis los dos pacientes que, en el momento de la recaída, mostraron pérdida de *NPM1*. Estos dos casos se describen de forma pormenorizada y por separado en el apartado 5.3.4 Pérdida de *NPM1* a la recaída.

En relación con el perfil mutacional, los pacientes fueron clasificados en los cuatro grupos de evolución clonal establecidos anteriormente teniendo en cuenta las diferencias observadas entre el diagnóstico y la recaída. En cuanto al perfil inmunofenotípico, los pacientes se clasificaron en dos grupos dependiendo de si presentaron o no cambios en el patrón inmunofenotípico entre el diagnóstico y la recaída según la clasificación-R.

Los pacientes con un "clon idéntico" (grupo 1) parecían tener una mayor estabilidad inmunofenotípica. Sin embargo, los pacientes asignados al grupo 3, caracterizado por la adquisición de nuevas mutaciones en el clon inicial ("clon inicial con evolución"), mostraron una tendencia más evidente a presentar cambios fenotípicos. En los pacientes incluidos en los grupos 2 y 4, la distribución en el número de casos entre los que presentaron o no cambios en el perfil inmunofenotípico fue similar. En ninguno de los grupos se observaron diferencias significativas en los cambios entre el patrón inmunofenotípico y el perfil mutacional (**Figura 40**). En cuanto a los dos pacientes que presentaron resistencia no se objetivaron cambios ni en el patrón inmunofenotípico ni en el perfil mutacional.

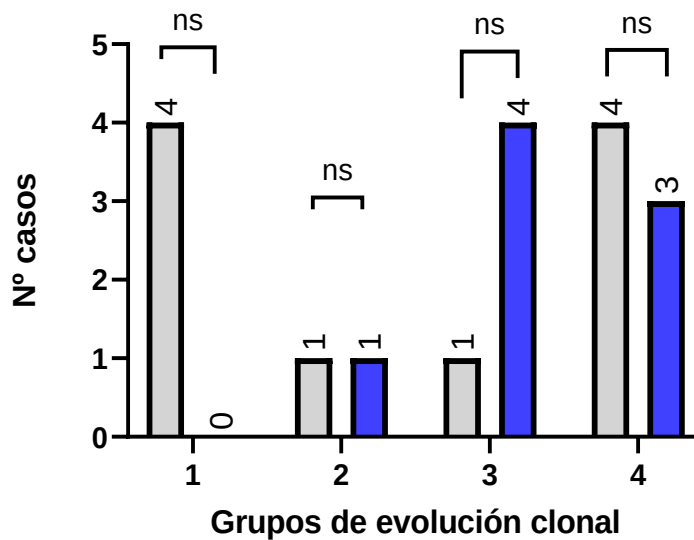


Figura 40. Estudio comparativo de los cambios entre el patrón inmunofenotípico (diagnóstico-recaída) y los grupos de evolución clonal según el perfil mutacional establecidos en este estudio. Los pacientes con cambios en el patrón inmunofenotípico entre el diagnóstico y la recaída se representan en azul, mientras que los pacientes que no experimentaron modificaciones del patrón se muestran en gris. En cuanto al perfil molecular, el grupo 1 incluyó a los pacientes que mantuvieron las mismas mutaciones en ambos momentos, denominándose "clon idéntico"; en el grupo 2 se agruparon aquellos pacientes que perdieron mutaciones en la recaída en comparación con el diagnóstico, identificándose como "clon ancestral"; el grupo 3 comprendió a los pacientes que, además de conservar las mismas mutaciones en la recaída, adquirieron nuevas mutaciones, denominándose como "clon inicial con evolución"; y finalmente, en el grupo 4 se integraron los pacientes que perdieron algunas mutaciones y adquirieron otras en la recaída, clasificándose como "evolución del clon ancestral".

5.3.4. Pérdida de *NPM1* a la recaída

A continuación, se detalla de forma pormenorizada la evolución de los dos pacientes con mutación *NPM1* al diagnóstico en los que no se detectó esta mutación en la recaída de la leucemia.

Paciente 66

En el análisis de CFM realizado al diagnóstico se caracterizaron dos poblaciones de células leucémicas atípicas que representaron el 25,1% de la CNT (**Figura 41**).

- La población mayoritaria, que correspondía a un 23,7% de la CNT y a un 94% de la población leucémica, mostró un inmunofenotipo compatible con células leucémicas comprometidas a linaje mieloide no monocítico (LMNM) con inmunofenotipo CD117⁺, HLA-DR⁻, CD34⁻, CD13^{-/+d}, CD33^{+a} y CD38⁺.
- La población minoritaria, que constituyó un 1,4% de la CNT y un 6% sobre el total de la población patológica, mostró un inmunofenotipo caracterizado por CD117^{+d}, HLA-DR^{-/+d}, CD34⁺, CD13^{+a}, CD33⁻ y CD38⁺, que correspondía a células leucémicas inmaduras.

El estudio molecular al diagnóstico reveló la presencia de las siguientes variantes (**Figura 42**):

- *NPM1* p. (Trp288Cysfs*12), c.860_863dupTCTG (VAF 27,16%)
- *IDH1* p. (Arg132Gly), c.394C>G (VAF 35,08%)
- *DNMT3A* p. (Pro743Leufs*30), c.2228_2252delinsTCCCTC (VAF 39,16%)
- *TET2* Splicesite, c.4045-1G>A (VAF 29,81%)
- *SRSF2* p. (Pro95His), c.284C>A (VAF 2,73%)

Por lo que fue clasificada inicialmente como una leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1*.

Tras el tratamiento de inducción, el paciente alcanzó remisión completa con recuperación hematológica incompleta (RCi). En el estudio de ERM mediante RT-qPCR no se observó expresión de *NPM1* ni en SP ni en MO (**Figura 42**). Sin embargo, mediante CFM se cuantificó un 0,05% sobre la CNT de una población mieloide atípica con inmunofenotipo CD117^{-/+d}, DR^{-/+d}, CD34^{+a}, CD13^{+a}, CD33⁻, CD38^{+d}, similar al observado en la población minoritaria identificada al diagnóstico. El resto de las células CD34⁺ no presentaron alteraciones inmunofenotípicas relevantes que las pudiese diferenciar de un progenitor normal. No se detectaron células con el inmunofenotipo de la población mayoritaria inicial (**Figura 41**).

La población considerada como ERM por CFM y el resto de las células CD34⁺ se aislaron mediante separación celular por citometría de flujo. Tras esto, se realizó la secuenciación masiva de estas dos poblaciones (**Tabla 18**). En las células compatibles con ERM no se observaron las alteraciones de *NPM1* y *TET2*. Sin embargo, sí se detectaron el resto de las mutaciones observadas al diagnóstico (*IDH1*, *DNMT3A* (p. (Pro743Leufs*30)) y *SRSF2*), y, además, se identificó la adquisición de una nueva alteración en el gen *DNMT3A* (p. (Arg736His)). En la segunda población aislada, constituida por el resto de las células CD34⁺ cuyo inmunofenotipo no fue compatible con el identificado al diagnóstico (no compatible con ERM), se evidenció la presencia de la mutación *DNMT3A* (p. (Pro743Leufs*30)) y no se identificaron las alteraciones de *TET2* y *DNMT3A* (p. (Arg736His)). Las regiones de los genes *NPM1*, *IDH1* y *SRSF2* no fueron valorables, por lo que los datos de estas alteraciones no estuvieron disponibles.

Tabla 18. Perfil mutacional de las poblaciones aisladas mediante separación celular por citometría de flujo en el momento post-inducción del paciente 66. Se aislaron las células correspondientes a enfermedad residual medible (ERM) y las células CD34⁺ con inmunofenotipo aparentemente normal.

Genes	Células de ERM (VAF%)	Células CD34 ⁺ sin IF de ERM (VAF%)
<i>NPM1</i>	No detectado	Región no valorable
<i>IDH1</i>	75,9	Región no valorable
<i>DNMT3A</i> ¹	36,4	42,5
<i>TET2</i>	No detectado	No detectado
<i>SRSF2</i>	11,1	Región no valorable
<i>DNMT3A</i> ^{2*}	5,7	No detectado

¹ p. (Pro743Leufs*30); ² p. (Arg736His); * mutación no presente al diagnóstico; ERM: enfermedad residual medible; VAF: *variant allele frequency*; IF: inmunofenotipo

Tras 2 ciclos de consolidación, el paciente presentó una recaída de la enfermedad, observándose un 5% de células con inmunofenotipo CD117⁺^d, HLA-DR^{-/+d}, CD34⁺, CD13^{+a}, CD33^{-/+} y CD38⁺ mediante CFM, similar al de la población minoritaria observada al diagnóstico. No se identificaron células con el inmunofenotipo de la población mayoritaria al diagnóstico. En lo que respecta a los estudios de las alteraciones moleculares, no se evidenció la presencia de las mutaciones de *NPM1* ni *TET2*. Sin embargo, se detectaron *DNMT3A* p. (Pro743Leufs*30) e *IDH1* con una VAF similar a la observada al diagnóstico, *SRSF2* con aumento de VAF respecto al diagnóstico y la adquisición de una nueva alteración en el gen *DNMT3A* (p. (Arg736His)), ya detectada en RC en la población aislada que correspondía a la ERM.

Después de la recaída se inició tratamiento de segunda línea. Cuando el paciente alcanzó remisión completa (RC), se estudió la ERM mediante CFM cuantificándose un 0,03% sobre la CNT de una población CD117^{-/+d}, DR^{-/+d}, CD34^{+a}, CD13^{+a}, CD33⁻, CD38^{+d} con inmunofenotipo similar a la población presente en la recaída y correspondiente a la población minoritaria al diagnóstico (**Figura 41**). Se realizó el estudio molecular en la médula ósea sin separación celular y se observaron las mismas mutaciones observadas en la recaída con VAF similares (**Figura 42**).

A los 19 meses de este estudio el paciente presentó una segunda recaída. El estudio mediante CFM reveló (**Figura 41**):

- Un 10% de la CNT correspondía a células hematopoyéticas mieloides CD34⁺, CD117⁺ y HLADR⁺ con alteraciones inmunofenotípicas. Una proporción de ellas (3,54% de la CNT) mostró un inmunofenotipo CD117^{-/+d}, DR^{-/+d}, CD34^{+a}, CD13^{+a}, CD33⁻, CD38^{+d} similar a la población presente en la primera recaída y correspondiente a la población minoritaria del diagnóstico.
- Un 15% de células monocíticas sobre la CNT (3% monoblastos; 11% promonocitos y 1% de monocitos).

En lo que respecta a los estudios moleculares en el total de la médula ósea se observaron las mismas mutaciones que en la primera recaída (*DNMT3A* p. (Pro743Leufs*30), *IDH1*, *SRSF2*, *DNMT3A* (p. (Arg736His)), más la adquisición de una nueva alteración en el gen *IKZF1*.

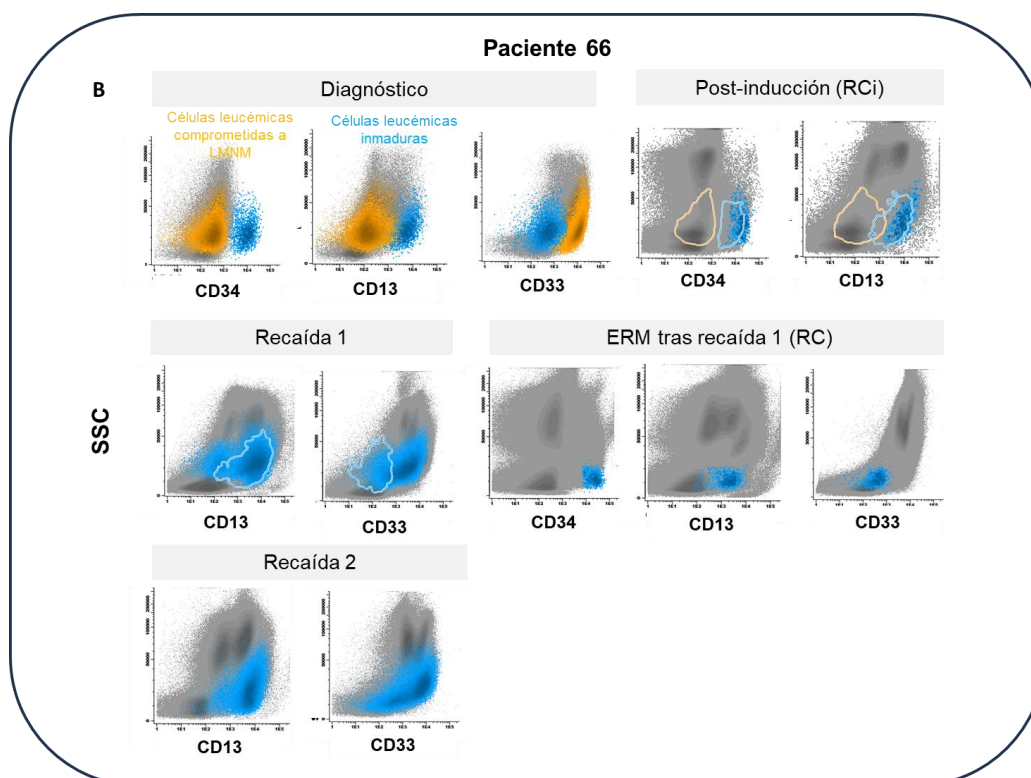
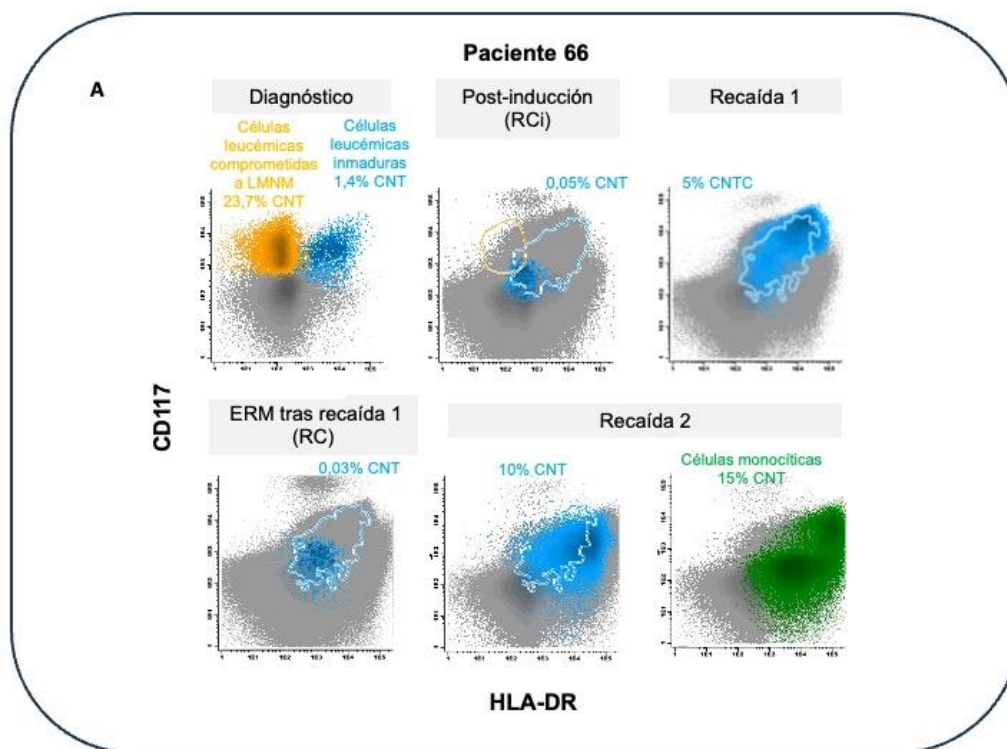


Figura 41. (Pie de figura en la página 132).

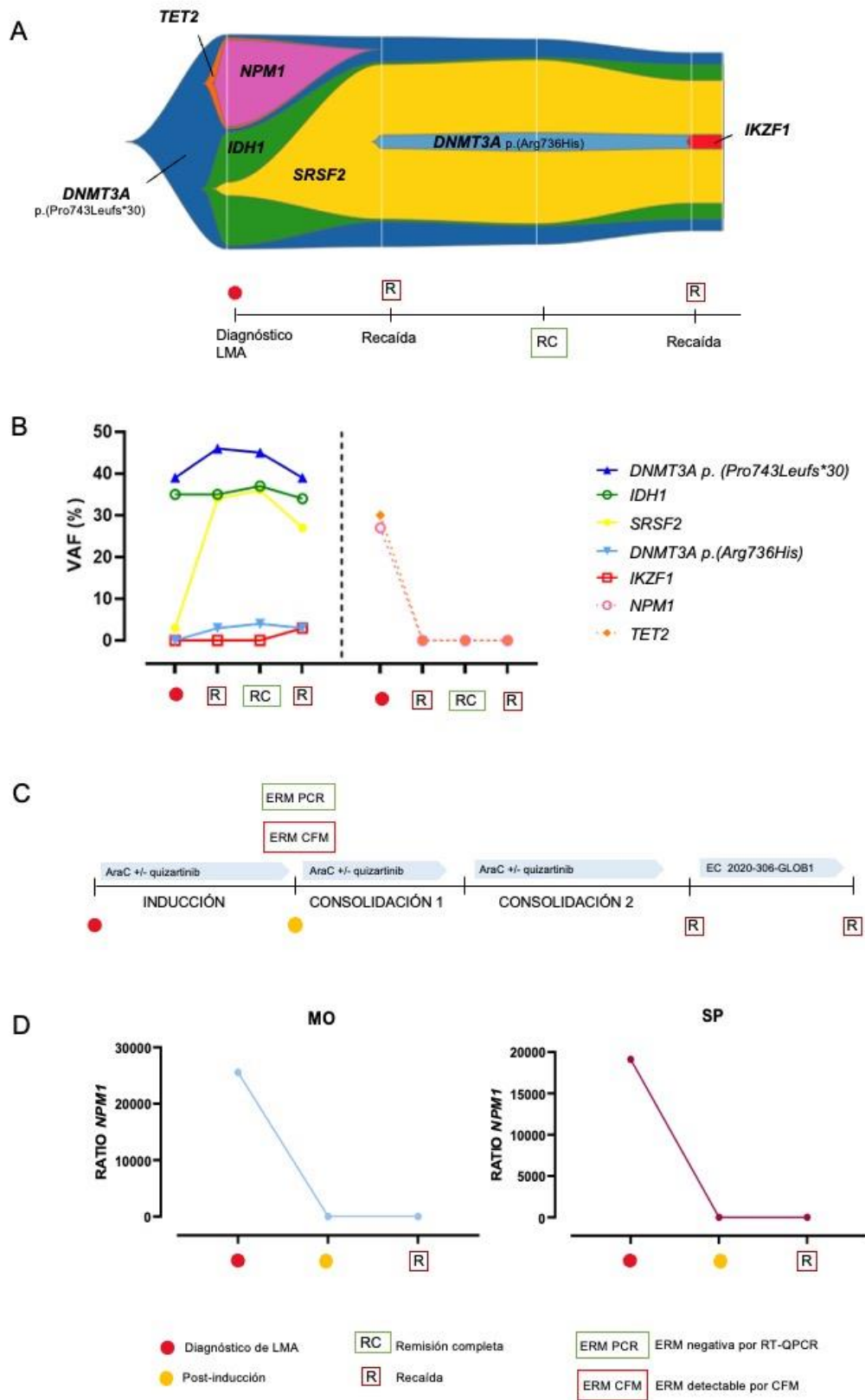


Figura 42. (Pie de figura en la página 132).

Figura 41. Diagramas biparamétricos de citometría que ilustran el análisis del paciente 66 en diferentes momentos evolutivos, en el que se objetivó la pérdida de la mutación *NPM1* en la recaída. La expresión de HLA-DR y CD117 en los diferentes momentos de estudio se muestra en A, mientras que la expresión de otros antígenos que permitieron realizar el seguimiento de la ERM y la evaluación de las recaídas se muestran en B. Ambas poblaciones leucémicas, células leucémicas comprometidas a LMNM (naranja) y células leucémicas inmaduras (azul), fueron detectadas al diagnóstico de la enfermedad. En los diagramas de puntos se observa la persistencia, aunque en bajo porcentaje, de la población de células leucémicas inmaduras durante la monitorización de la ERM en post-inducción y tras la primera recaída; así como la reaparición en las recaídas 1 y 2 de esta población. Las regiones delimitadas por líneas continuas en los gráficos de post-inducción y recaída 1 identifican la imagen de referencia de las poblaciones leucémicas al diagnóstico. La clonalidad y la relación entre los clones se ha inferido utilizando la frecuencia alélica, las relaciones de exclusividad mutacional y la presencia/ausencia de las alteraciones a lo largo del curso de la enfermedad.

Figura 42. Características moleculares del paciente 66 en la evolución de la leucemia mieloblástica aguda. *Fishplot* que muestra la dinámica de las mutaciones (A) Frecuencias alélicas (VAF) observadas en las diferentes mutaciones a lo largo de la evolución de la enfermedad, este gráfico se divide en dos para poder observar de manera adecuada la VAF de las mutaciones *NPM1* y *TET2* (B), Esquema terapéutico empleado en el paciente y resultados sobre la enfermedad residual medible (ERM) entre ambas técnicas (C). Ratio de la expresión de *NPM1* en los diferentes momentos de la enfermedad tanto en médula ósea (MO) como en sangre periférica (SP) (D). La clonalidad y la relación entre los clones se ha inferido utilizando la frecuencia alélica, las relaciones de exclusividad mutacional y la presencia/ausencia de las alteraciones a lo largo del curso de la enfermedad.

Paciente 83

Este paciente, con historia previa de SMD con displasia multilínea, evolucionó a los 3 años y 3 meses a una LMA con mutación *NPM1*.

En el análisis de la LMA al diagnóstico mediante CFM se observó una población de células atípicas que representó un 86% de la CNT con un inmunofenotipo compatible con células leucémicas comprometidas a linaje mielóide no monocítico (LMNM) CD117⁺ y HLA-DR⁺, CD34⁺, CD13^{+/+} y CD33^{het/+a} (**Figura 43**).

El estudio molecular al diagnóstico reveló la presencia de las siguientes variantes (**Figura 44**):

- *NPM1* p. (Trp288Cysfs*12), c.863_864insCAGA (VAF 27,4%)
- *IDH1* p. (Arg132Cys), c.394C>T (VAF 45,92%)
- *SRSF2* p. (Pro95Arg), c.284C>G (VAF 51,4%)

Las alteraciones detectadas en *IDH1* y *SRSF2* ya se observaron en el diagnóstico del SMD con una VAF similar (**Figura 44**).

Tras el tratamiento de inducción, el paciente alcanzó remisión completa (RC). En el estudio de ERM mediante RT-qPCR se detectaron copias de *NPM1* con una ratio de 55,38 en MO (**Figura 44**). La positividad para ERM por RT-qPCR en el momento de post-inducción en MO se consideró cuando el ratio ≥ 1000 . Sin embargo, mediante CFM se cuantificó un 0,1% sobre la CNT de una población con inmunofenotipo diferente de lo normal (DfN) CD117⁺, HLA-DR⁺, CD34⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD19⁻, CD10⁺, nuTdT⁺, CD38⁺, CD22⁻. No se detectaron células con el inmunofenotipo descrito al diagnóstico de la LMA. Tras el segundo ciclo de consolidación sólo se evaluó la ERM mediante RT-qPCR en SP que fue negativa. No estuvo disponible el estudio de ERM mediante CFM.

Al mes del segundo ciclo de consolidación tras la evaluación de ERM, el paciente presentó recaída de la leucemia, observándose mediante CFM un 6% de células atípicas sobre la CNT distribuidas en dos poblaciones distintas (**Figura 43**):

- Una población que representaba un 3% de la CNT con inmunofenotipo CD117⁺^a, HLA-DR⁺, CD34⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD22^{-/+}, CD38⁺^a.
- Otra población constituida por un 3% de células con inmunofenotipo CD117⁺^d, HLA-DR⁺, CD34^{-/+}, CD13^{-/+d}, CD33^{-/+d}, CD19⁻, CD10⁺, nuTdT⁺, CD38⁺^a, CD22⁺, que podrían corresponder a células linfoides B atípicas.

No se detectaron células con el inmunofenotipo del diagnóstico.

En lo que respecta a los estudios de las alteraciones moleculares, no se evidenció la presencia de la mutación de *NPM1*. Sin embargo, se detectaron *IDH1* y *SRSF2* con una VAF inferior a la observada al diagnóstico (**Figura 44**).

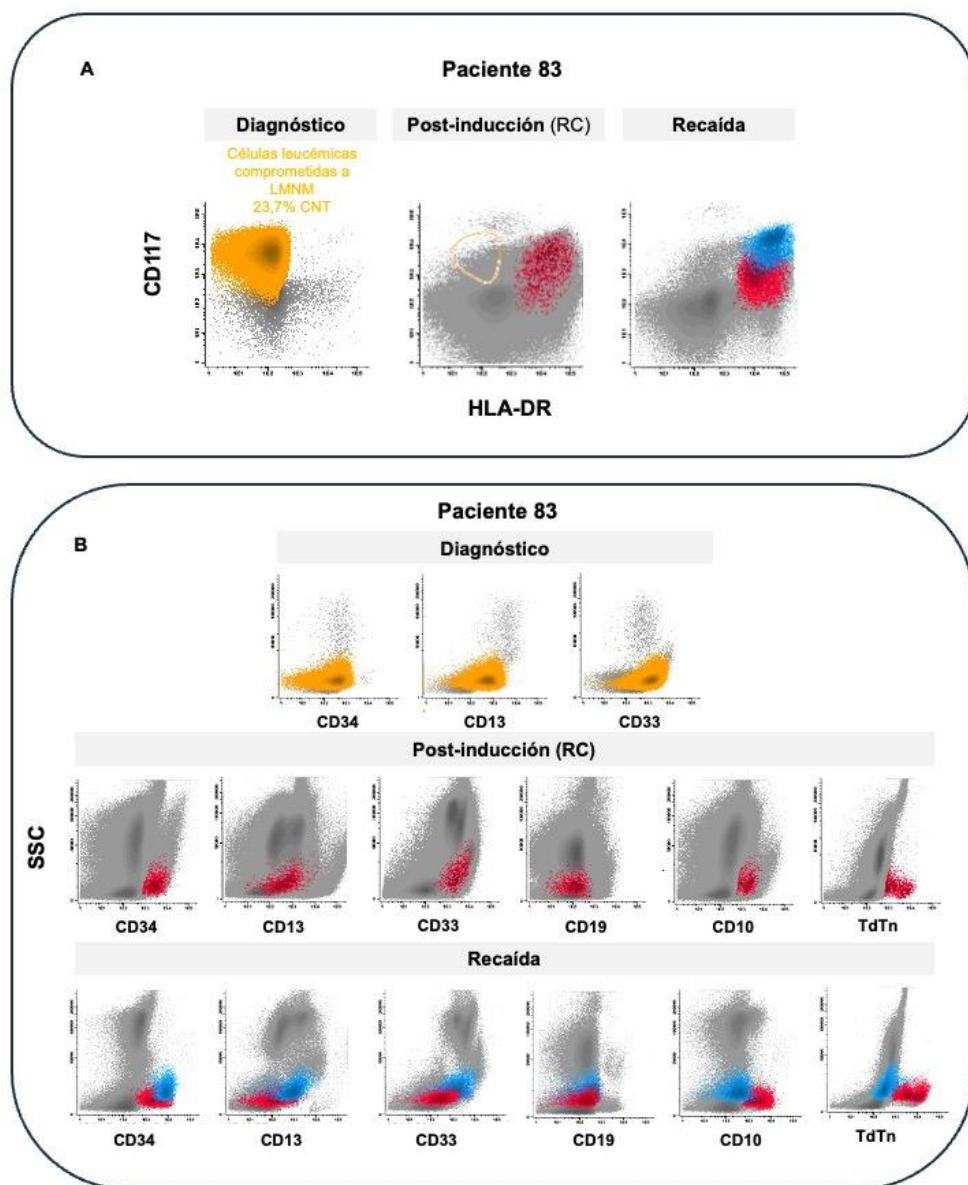


Figura 43. Diagramas biparamétricos de citometría que ilustran el análisis del paciente 83 en diferentes momentos evolutivos, en el que se objetivó la pérdida de la mutación *NPM1* en la recaída. La expresión de HLA-DR y CD117 en los diferentes momentos de estudio se muestra en A, mientras que la expresión de otros antígenos que permitieron identificar ERM en post-inducción (DfN) y la evaluación de la recaída se muestran en B. La población de células leucémicas comprometidas a LMNM (naranja) fue detectada al diagnóstico de la enfermedad. En los diagramas de puntos se observa la aparición de una nueva población con inmunofenotipo leucémico diferente del observado al diagnóstico (rojo). En la recaída, persiste la población leucémica anterior (rojo) y aparece otra nueva población leucémica (azul) no detectada al diagnóstico. La región delimitada por una línea continua en el gráfico de post-inducción identifica la imagen de referencia de la población leucémica al diagnóstico.

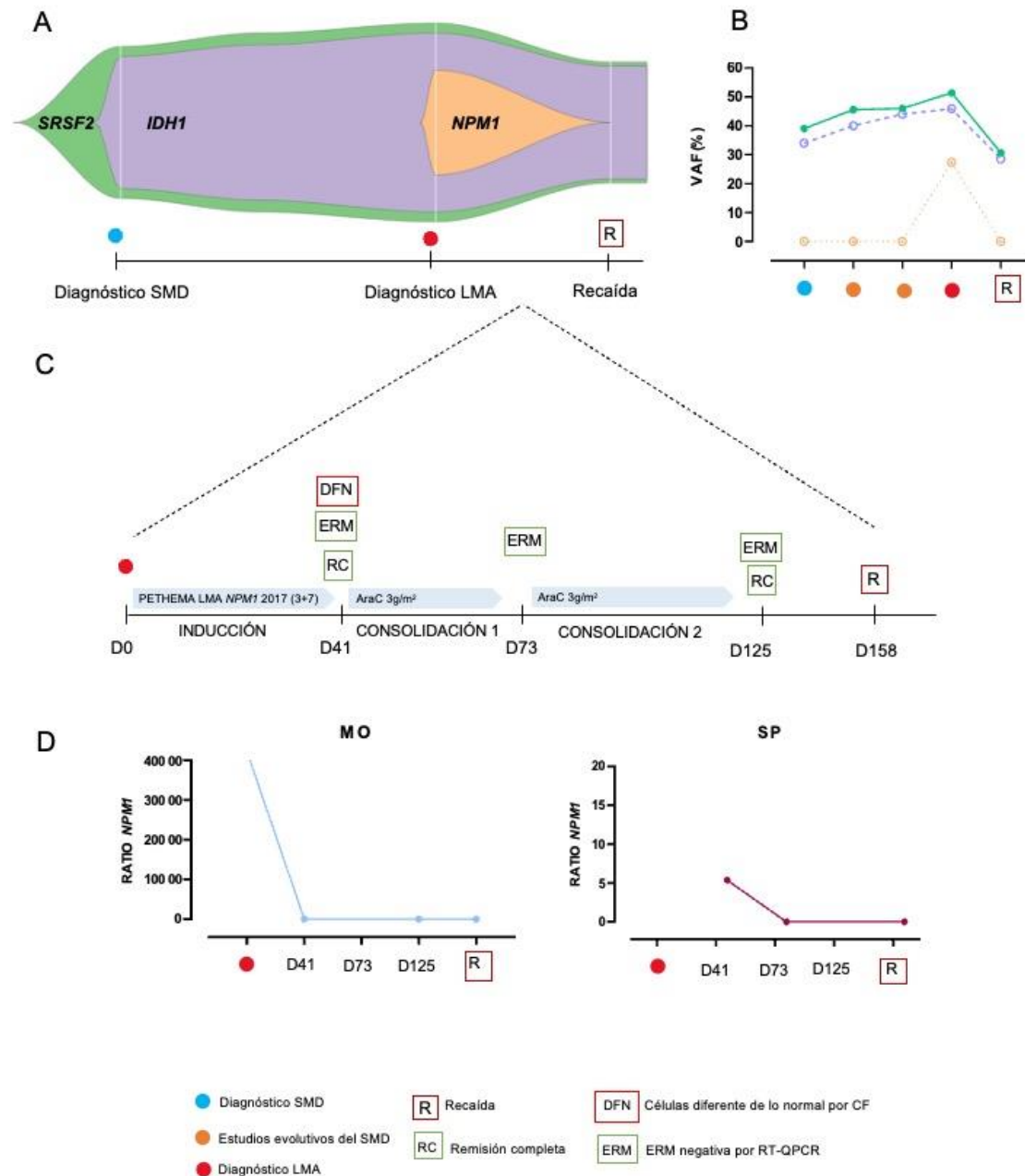


Figura 44. Características biológicas del paciente 83 en la evolución de la leucemia mieloblástica aguda. *Fishplot* que muestra la dinámica de las mutaciones (A) Frecuencias alélicas (VAF) observadas en a lo largo de la evolución de la enfermedad (B). Esquema terapéutico empleado en el paciente y resultados sobre la enfermedad residual medible (ERM) en ambas técnicas (C). Ratio de la expresión de *NPM1* en los diferentes momentos de la enfermedad tanto en médula ósea (MO) como en sangre periférica (SP) (D). La clonalidad y la relación entre los clones se ha inferido utilizando la frecuencia alélica, las relaciones de exclusividad mutacional y la presencia/ausencia de las alteraciones a lo largo del curso de la enfermedad.

5.4. Evolución clonal

Para llevar a cabo el estudio de la heterogeneidad y evolución clonal, se aislaron mediante *sorting* diferentes subpoblaciones celulares presentes en la médula ósea de 13 pacientes incluidos en el estudio (8 pacientes al diagnóstico, 6 pacientes en diferentes momentos de seguimiento de la ERM y 3 pacientes en recaída/resistencia). Los resultados del paciente 66, en el que fue posible aislar diferentes poblaciones mediante separación celular, ya se han detallado previamente en el apartado de los casos con pérdida de *NPM1* en la recaída.

En la **Figura 45**, se detallan las mutaciones presentes en las poblaciones aisladas mediante separación celular en los pacientes estudiados al diagnóstico.

En el momento del diagnóstico, el análisis de las células CD34⁺ mieloides aisladas con inmunofenotipo aparentemente normal no se detectó la mutación *NPM1* en 5 de 7 pacientes mientras que en los dos restantes sí se observó. La mutación CEBPA presente en las células leucémicas aisladas del paciente 67, no se detectó en las células CD34⁺ mieloides, así como tampoco alteraciones en genes de vías de señalización como *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*. Sin embargo, sí que se observaron mutaciones pre-leucémicas (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*) con frecuencias alélicas bajas.

Las principales poblaciones de células leucémicas (inmaduras y/o comprometidas a LMNM consideradas en la **Figura 45** como blastos, así como las células leucémicas monocíticas) mostraron variantes de hematopoyesis clonal (como *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*) y la adquisición de mutaciones en *NPM1* y *FLT3*. En 3 pacientes la frecuencia alélica de *NPM1* fue más alta en los blastos aislados con respecto al estudio realizado en el total de la celularidad de la médula ósea. La presencia de la alteración en *KRAS* se detectó exclusivamente en la población de células leucémicas monocíticas del paciente 67, sin observarse en los blastos de este mismo paciente.

En el paciente 72 no se observó participación monocítica en el análisis de la leucemia al diagnóstico. Sin embargo, esta población celular fue aislada durante la separación celular, observándose las mismas mutaciones detectadas en la población leucémica y en el total de la MO.

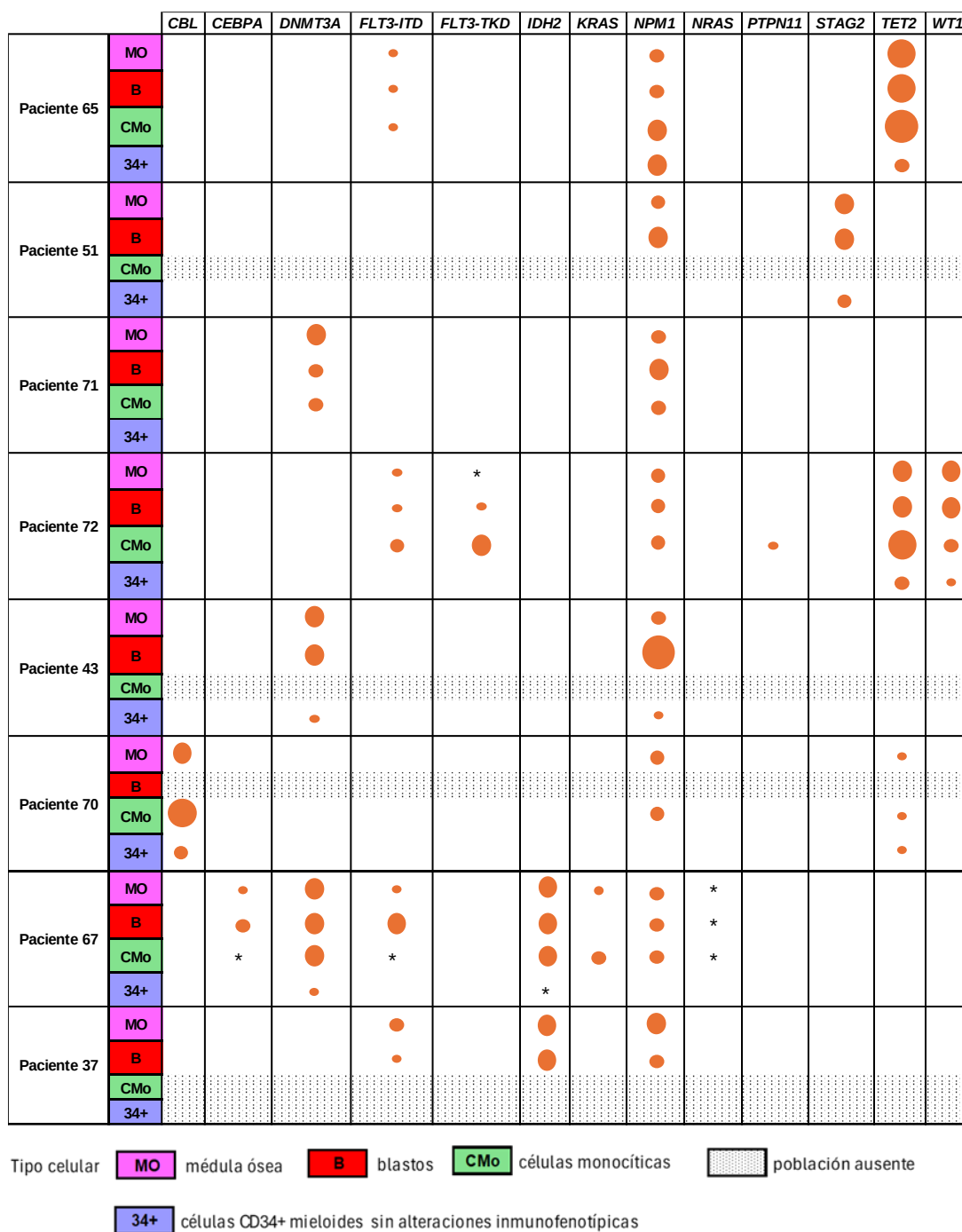


Figura 45. Perfil mutacional de las diferentes poblaciones celulares aisladas mediante separación celular por citometría de flujo en el momento del diagnóstico en 8 pacientes. Se comparó el perfil mutacional analizado en el total de la médula ósea frente a otros 3 tipos celulares: la población de blastos (inmaduras y/o comprometidas a LMNM), la de células monocíticas y la de las células CD34⁺ mieloides residuales presentes en la muestra con inmunofenotipo aparentemente normal. En todos los casos al diagnóstico también se aislaron los linfocitos T como control.

En la **Figura 46A** se detallan las mutaciones presentes en las poblaciones aisladas mediante separación celular en 2 pacientes que alcanzaron RC. Se compararon las mutaciones detectadas al diagnóstico en el total de la celularidad de la médula ósea con las diferentes poblaciones aisladas en RC. En el paciente 61, se mantuvo la alteración en *DNMT3A*, y se detectó *NPM1* a una VAF inferior al 5% sólo en las poblaciones de promonocitos CD34⁺CD117⁺CD14⁺CD35⁺CD300e⁻ (en la figura aparecen como promonocitos I) y promonocitos CD34⁺CD117⁺CD14⁺CD35⁺CD300e⁻ (en la figura aparecen como promonocitos II). En el paciente 63 se identificaron, por una parte, mutaciones en *ASXL1* y *NF1* que no habían sido detectadas al diagnóstico; y, por otro lado, se detectó *IDH2* a una VAF inferior al 5% en todas las poblaciones aisladas y *FL3-ITD* sólo en los promonocitos CD34⁺CD117⁺CD14⁺CD35⁺CD300e⁻ (en la figura aparecen como promonocitos I).

En la **Figura 46B** se detallan las mutaciones presentes en las poblaciones aisladas mediante separación celular en 2 pacientes en recaída/resistencia. En el paciente 32 se compararon las alteraciones observadas al diagnóstico y en la recaída en el total de la celularidad de la médula ósea frente a las diferentes poblaciones leucémicas aisladas en resistencia. La mutación *NPM1* no se detectó en la población de células leucémicas inmaduras CD117⁺HLA-DR⁺ y no se pudo valorar en las células leucémicas comprometidas a LMNM. Sin embargo, el estudio de la celularidad total de la MO sí que detectó la mutación *NPM1*, lo que podría indicar que la alteración estaba presente únicamente en las células leucémicas comprometidas a LMNM CD117⁺ HLA-DR⁻. Esta última población de células leucémicas no se detectó ni al diagnóstico ni en la recaída. En el paciente 56 se compararon las alteraciones observadas al diagnóstico y en la recaída en el total de la celularidad de la MO frente a las diferentes poblaciones aisladas en la recaída. En la población de progenitores mieloides CD117⁺HLA-DR⁺ sin alteraciones inmunofenotípicas relevantes no se detectaron mutaciones. En la población de células leucémicas comprometidas a LMNM CD117⁺HLA-DR⁻ se confirmó la mutación *NPM1* con una VAF similar a la del total de la MO y la alteración de *STAG2* con una VAF superior a la observada en el total de la MO.

A

			ASXL1	DNMT3A	FLT3-ITD	FLT3-TKD	IDH2	NF1	NPM1
Paciente 61	DIAGNÓSTICO	MO		●	●				●
	RC	CD34+ CD117+		●					
		Promonocitos I		●					*
		Promonocitos II		●					*
		Monocitos		●					
Paciente 63	DIAGNÓSTICO	MO			●	●	●		●
	RC	CD34+ CD117+	●				*	●	
		Promonocitos I	●		*		*	●	
		Promonocitos II	●				*	●	
		Monocitos	●				*	●	

B

			DNMT3A	FLT3-ITD	IDH2	NPM1	STAG2
Paciente 32	DIAGNÓSTICO	MO	●	●	●	●	
	RECAÍDA	MO	●	*	●	●	
	RESISTENCIA	MO	●	●	●	●	
		Blastos CD117+HLA-DR+	●	●	●		
		Blastos CD117+HLA-DR-	●	■	●	■	
Paciente 56	DIAGNÓSTICO	MO				●	●
	RECAÍDA	MO				●	*
		CD34+ CD117					
		Blastos CD117+HLA-DR-				●	●

VAF ● 80-100 ● 60-80 ● 40-60 ● 20-40 ● 5-20 * <5

Tipo celular MO médula ósea ■ Región no valorable en la NGS

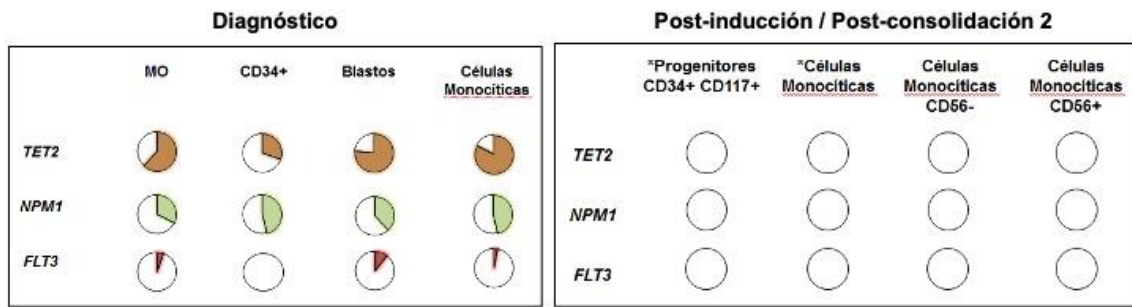
Figura 46. (A) Perfil mutacional de las diferentes poblaciones celulares aisladas mediante separación celular por citometría de flujo de 2 pacientes en remisión completa (RC). Se comparó el perfil mutacional realizado en el total de la celularidad de la médula ósea al diagnóstico (resaltado en rosa) con las diferentes poblaciones aisladas en RC: células progenitoras hematopoyéticas mieloides CD34⁺CD117⁺ y las diferentes subpoblaciones de células monocíticas (promonocitos I CD34⁺CD117⁺CD14⁺CD35⁺CD300e⁻; promonocitos II CD34⁺CD117⁺CD14⁺CD35⁺CD300e⁻). (B) Perfil mutacional de las diferentes poblaciones celulares aisladas mediante separación celular por citometría de flujo de 2 pacientes en recaída/resistencia. Se comparó el perfil mutacional realizado en el total de la celularidad de la médula ósea al diagnóstico y en recaída/resistencia (resaltado en rosa) con las diferentes poblaciones aisladas: células progenitoras hematopoyéticas mieloides CD34⁺CD117⁺ y blastos CD117⁺ HLA-DR⁺ (células leucémicas inmaduras) y/o CD117⁺ HLA-DR⁻ (células leucémicas comprometidas a LMNM).

A continuación, en la **Figura 47** se muestran 4 pacientes en los que se aislaron diferentes poblaciones celulares tanto al diagnóstico como en diferentes momentos del seguimiento de la enfermedad y se comparó el perfil mutacional entre los diferentes momentos.

- Paciente 65: En los dos momentos de seguimiento (post-inducción y post-consolidación 2), en los cuales se aislaron tanto los progenitores CD34⁺ CD117⁺ aparentemente normales como las células monocíticas, no se observaron alteraciones en ningún momento y en ninguna de las dos poblaciones. Además, en post-consolidación 2 se observó mediante CFM la positividad de CD56 en la celularidad monocítica, cuya expresión ya se había informado al diagnóstico. Tanto en la población de células monocíticas CD56⁻ como las CD56⁺ aisladas se realizó el estudio mediante NGS y no se encontró ninguna alteración.
- Paciente 70: no se observó la mutación *NPM1* en ninguna de las poblaciones aisladas en el momento de post-inducción, aunque se mantuvieron las alteraciones en *TET2* y *CBL* observadas al diagnóstico. Del mismo modo, en las células monocíticas CD56⁻ y CD56⁺ aisladas tampoco se detectó la mutación *NPM1* mientras que se mantuvieron las mutaciones *TET2* y *CBL*.
- Paciente 67: en las diferentes poblaciones aisladas en post-inducción, únicamente se observaron las alteraciones relacionadas con hematopoyesis clonal *IDH2* y *DNMT3A*, sin detectarse las diferentes alteraciones observadas al diagnóstico en *NPM1*, *CEBPA*, ni en genes de las vías de señalización (*FLT3*, *NRAS* y *KRAS*).
- Paciente 37: en el momento de la recaída, además de aislarse las células leucémicas comprometidas a LMNM (en la figura aparecen como blastos), también se aislaron las células leucémicas monocíticas que no estuvieron presentes al diagnóstico. Llamó la atención la pérdida de la mutación *FLT3* en la recaída en ambas poblaciones y la diferencia en la frecuencia alélica de *IDH2* entre los blastos y las células monocíticas, manteniéndose la mutación de *NPM1* en ambas poblaciones.

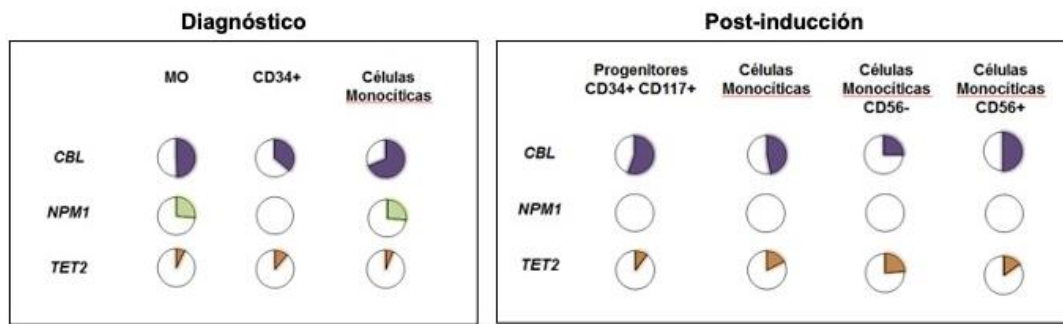
A

Paciente 65



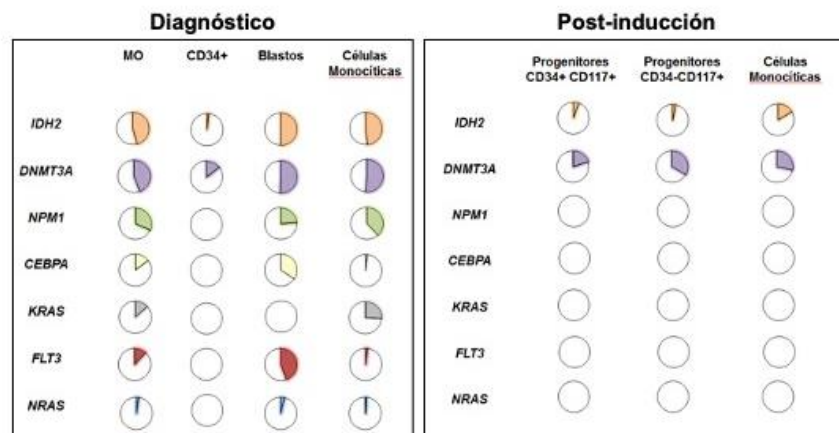
B

Paciente 70



C

Paciente 67



D

Paciente 37

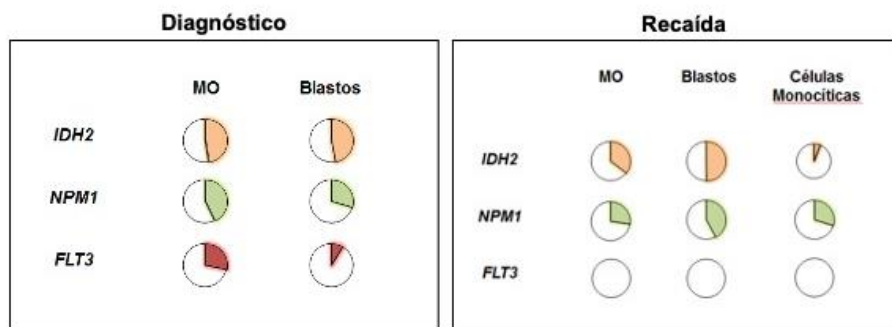


Figura 47. Comparación de la frecuencia alélica (VAF) de las mutaciones encontradas al diagnóstico y en diferentes momentos evolutivos en la celularidad total de la médula ósea y en diferentes poblaciones celulares leucémicas o aparentemente normales aisladas mediante separación celular por citometría de flujo para dilucidar la evolución clonal. Se muestran los resultados para 4 pacientes: (A) paciente 65 al diagnóstico y en remisión post-inducción / post-consolidación 2; (B y C) pacientes 70 y 67, respectivamente, al diagnóstico y en post-inducción; (D) paciente 37 al diagnóstico y en la recaída.

5.5. Comparativa de la ERM: CFM y RT-qPCR

Se realizó el estudio de ERM por CFM en 51 pacientes, de los cuales 46 recibieron quimioterapia intensiva y fueron incluidos en los siguientes análisis tras alcanzar RC. Se evaluó la ERM durante el seguimiento en 9 momentos evolutivos diferentes: posterior a la finalización del primer y segundo ciclo de inducción (momentos 1 y 2; n=37); después de la finalización del primer ciclo de consolidación (momento 3, n=11); al completar el segundo ciclo de consolidación (momento 4, n=13); tras el tercer y cuarto ciclo de consolidación (momentos 5 y 6, n=17); previo al alo- o autotrasplante de células progenitoras hematopoyéticas (momento 7, n=1); y, finalmente, en otros momentos tras el segundo ciclo de consolidación que se identificaron como seguimiento (momento 8, n=22).

Tras la inducción, se detectó la presencia de ERM mediante CFM en 8 pacientes con un rango de cuantificación de 0,007 a 0,34%. Se analizó el impacto en el momento de post-inducción, ya que era el valorado en los protocolos del grupo PETHEMA, en donde el punto de corte definido para positividad era de 0,1%. En los 37 pacientes con seguimiento de la ERM en CFM en MO post-inducción (momentos 1 y 2), se observó una tendencia hacia una mejor supervivencia global (SG) y una menor incidencia acumulada de recaída (IAR) en aquellos con ERM <0,1% (*p=0,04 y **p=0,006, respectivamente) (**Figura 48**).

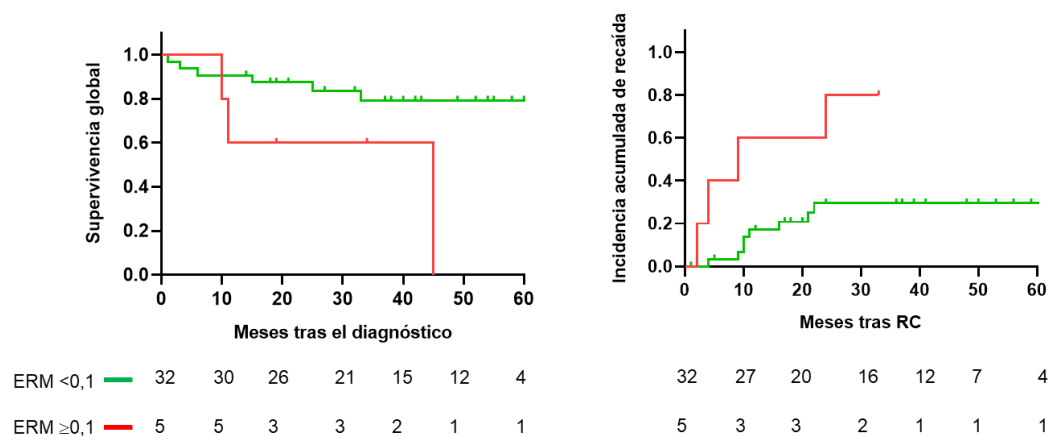


Figura 48. Curvas de supervivencia global e incidencia acumulada de recaída en los pacientes con leucemia mieloblástica aguda *NPM1* tratados con quimioterapia intensiva, alcanzando RC, y estratificados según la detección de enfermedad residual medible (ERM) $\geq 0,1\%$ mediante citometría de flujo multiparamétrica.

No se observó ERM $\geq 0,1$ por CFM en ninguna de las muestras estudiadas ni en el momento 3 (tras el primer ciclo de consolidación) ni en el momento 4 (tras segundo ciclo de consolidación) y no se pudo estudiar el impacto pronóstico de la ERM mediante CFM en estos momentos de estudio.

Para el análisis en paralelo de ambas técnicas se seleccionaron únicamente las muestras en las que coincidían las fechas de extracción y momentos de tratamiento. Las muestras de MO y SP se consideraron en todos los momentos de estudio a excepción de la SP tras inducción. Se ha considerado el punto de corte en MO post-inducción como ratio ≥ 1000 y en momentos posteriores ratio ≥ 150 ; y establecido en SP ≥ 1 en todos los momentos evaluados, de acuerdo con el protocolo PETHEMA LMA NPM1 2017. Los estudios de post-inducción mediante RT-qPCR en SP no se tuvieron en cuenta ya que no hay punto de corte establecido para SP en ese momento.

En total se analizaron 90 muestras de MO en las que se dispuso de un valor pareado de ERM mediante CFM y RT-qPCR. Se detectaron 82 negativos por RT-qPCR en MO, de los cuales 3 fueron positivos por CFM en MO; 8 positivos por qRT-PCR en MO, sólo 2 fueron positivos por CFM. También se estudiaron 56 muestras por CFM en MO en los que la RT-pPCR se realizó en SP. En 47 muestras los resultados fueron negativos para ambas técnicas; y en 9 estudios positivos en SP por RT-qPCR, sólo 1 fue positivo por CFM en MO (**Figura 49**). La concordancia entre ambas técnicas en MO para el estudio de ERM fue del 90%; mientras que la concordancia entre la CFM en MO y la RT-qPCR en SP fue del 86%.

CFM vs. RT-qPCR			
		RT-qPCR MO	
CFM MO		Negativo	Positivo
	Negativo	79	6
	Positivo	3	2

		RT-qPCR SP	
CFM MO		Negativo	Positivo
	Negativo	47	8
	Positivo	0	1

Figura 49. Gráfico comparativo de los resultados obtenidos en el análisis de enfermedad residual medible mediante citometría de flujo multiparamétrica (CFM) y RT-qPCR en los pacientes de la serie que recibieron quimioterapia intensiva. MO: médula ósea. SP: sangre periférica.

6.DISCUSIÓN

La leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1* es una entidad molecularmente individualizada con una reconocida y marcada heterogeneidad clínico-biológica. Su caracterización molecular ha sido el foco de numerosos trabajos que han contribuido en el conocimiento del origen y desarrollo clonal de esta leucemia (Cocciardi *et al.*, 2019; Giupponi *et al.*, 2023; Herold *et al.*, 2017; Höllein *et al.*, 2018; Krönke *et al.*, 2013). En los últimos años, algunos autores han evaluado el perfil inmunofenotípico de la LMA con mutación *NPM1* con el objetivo de determinar su relación con las características genéticas y así establecer la posible relevancia clínica de estos hallazgos (Arana-Rosainz *et al.*, 2021; Mason *et al.*, 2018, 2019; Matarraz *et al.*, 2023). Los estudios confirman la gran diversidad inmunofenotípica de este tipo de leucemia y plantean que la caracterización por citometría de flujo podría contribuir a orientar el diagnóstico molecular inicial y tendría un papel en el pronóstico de los pacientes con LMA y mutación *NPM1* (Mason *et al.*, 2019; Matarraz *et al.*, 2023).

La LMA con mutación *NPM1* representa una oportunidad para el estudio de la arquitectura y evolución clonal. La mutación presenta una gran estabilidad, detectándose desde los estadios iniciales hasta la recaída de la leucemia (Cocciardi *et al.*, 2019; Krönke *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2019). En esta dirección, nos propusimos integrar la información inmunofenotípica y molecular obtenidas mediante CFM y secuenciación masiva respectivamente, para intentar una valoración molecular individualizada de los diferentes compartimentos leucémicos implicados en la enfermedad. Inicialmente, se efectuó la identificación inmunofenotípica de las diferentes poblaciones celulares leucémicas individualizadas al diagnóstico que posteriormente se evaluaron en la recaída intentando caracterización genética. La valoración genética y funcional de los distintos subclones leucémicos podría ayudar a reconocer patrones inmunofenotípicos asociados a la resistencia leucémica, así como desentrañar la jerarquía y evolución clonal en este subtipo de leucemia. Esta información podría contribuir a mejorar el conocimiento de los mecanismos de resistencia e identificar nuevas dianas terapéuticas.

La RT-qPCR es la técnica de elección para la monitorización de la enfermedad residual medible en la LMA con mutación de *NPM1*, ya que se trata de un marcador molecular específico y estable en la recaída. Sin embargo, se pueden producir recaídas a expensas de poblaciones leucémicas *NPM1* negativas que escapan a la monitorización molecular. Estas nuevas poblaciones o células residuales quimiorresistentes presentes de manera minoritaria al diagnóstico, podrían ser

detectadas mediante CFM permitiendo conocer con antelación una posible recaída lo que posibilitaría una intervención terapéutica precoz.

En la LMA con mutación *NPM1*, la mayoría de los trabajos se centran en las diferencias observadas a nivel genético entre el diagnóstico y la recaída (Cocciardi *et al.*, 2019; Höllein *et al.*, 2018; Krönke *et al.*, 2013). Son pocos los estudios que han abordado el análisis inmunofenotípico entre ambos momentos evolutivos (Zhou *et al.*, 2019) y menos aun los que han correlacionado estos datos con los resultados genéticos (Martínez-Losada *et al.*, 2018).

En nuestro análisis, se incluyeron 91 pacientes adultos con diagnóstico de LMA con mutación *NPM1*. Aunque el número no es elevado, el estudio se ha realizado en un solo centro lo que aporta homogeneidad a los resultados, reduciendo la variabilidad de algunos factores que podrían influir en los datos obtenidos, como la estandarización de las técnicas empleadas desde el procesamiento de las muestras hasta la interpretación de los análisis, así como los esquemas terapéuticos administrados. En lo que respecta a las características generales, la mediana de edad fue de 64 años, muy similar a la observada por Mason *et al.*, (Mason *et al.*, 2019) pero superior a la reportada en otras series (K. Döhner *et al.*, 2005; Krönke *et al.*, 2013). Se evidenció un discreto predominio de mujeres frente a hombres, en consonancia con la literatura (Nomdedeu *et al.*, 2011; Thiede *et al.*, 2006). Al igual que en otros estudios, la mayor parte de los pacientes presentaron leucocitosis ($>10 \times 10^9/L$) al diagnóstico (74%) (Falini *et al.*, 2020) mientras que la infiltración extramedular fue del 6%, frente al 18% referido por Döhner *et al.*, (K. Döhner *et al.*, 2005) puesto que aquí no consideramos la hepatoesplenomegalia como infiltración extramedular. El análisis citológico de médula ósea de nuestros pacientes confirmó que en el 97% la proporción de blastos era superior al 20%. Recientemente, algunos autores señalan que las neoplasias mieloides con mutación *NPM1* presentan características clínicas y patológicas similares independientemente de la proporción de blastos en médula ósea sin tener en cuenta el corte del 20% (Gener-Ricos *et al.*, 2024). En lo que respecta al análisis citogenético, el 86% de los pacientes presentaron cariotipo normal similar a lo reportado en la literatura (Angenendt *et al.*, 2019; Haferlach *et al.*, 2009). Finalmente, la mayoría de los pacientes (68%) de esta serie recibieron tratamiento intensivo.

En los últimos años, se han publicado varios artículos que evalúan mediante CFM el inmunofenotipo de las diferentes poblaciones leucémicas de la LMA con mutación *NPM1* (Y.-R. Liu *et al.*, 2013; Mason *et al.*, 2018, 2019; Matarraz *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2019). Los trabajos coinciden en resaltar la gran heterogeneidad

inmunofenotípica de la LMA con mutación de *NPM1* confirmando que el componente leucémico mieloide se encuentra integrado por diferentes tipos celulares en distintas etapas de diferenciación (Mason *et al.*, 2019; Matarraz *et al.*, 2023). Mason *et al.*, analizaron 239 pacientes con LMA con mutación de *NPM1*, un 41% presentaron diferenciación monocítica y el 59% restante se distribuyeron en dos subtipos, uno que carecía de expresión de HLA-DR y CD34 o doble negativo (DN) (30% de los casos) y el otro fue definido como mieloide (29% de los casos). En un análisis posterior, Matarraz *et al.*, evalúan las características inmunofenotípicas de la LMA con mutación de *NPM1* comparándolo con el del resto de LMA, identificando en los pacientes con LMA y mutación de *NPM1*, tres poblaciones leucémicas mayoritarias: un primer subgrupo con un perfil inmunofenotípico mieloide inmaduro (CD117⁺ HLADR⁺); otro con un perfil monocítico (CD64⁺ / ⁺⁺ HLA-DR⁺ y expresión variable de CD117) que es el observado con mayor frecuencia; y un tercer subgrupo asociado a células comprometidas a linaje neutrófilo cuyo inmunofenotipo (CD117^{+/heterogéneo} HLA-DR⁻) es similar al de la LPA. En nuestro estudio, el análisis inicial de cada una de las muestras permitió identificar dentro del compartimento mieloide las tres poblaciones de células leucémicas definidas por Matarraz *et al.*, según la expresión de los antígenos CD117 y HLA-DR y el estadio de maduración: la población de células leucémicas inmaduras fue la más observada (65% de los casos) a diferencia de Matarraz *et al.*, que encuentran la población monocítica (Matarraz *et al.*, 2023) que en nuestro caso fue la segunda en frecuencia (58% de los casos) seguida por la población de células leucémicas comprometidas a LMNM (44% de los casos). La población de células leucémicas comprometidas a LMNM es la considerada por otros autores como el subgrupo con compromiso a linaje neutrófilo o DN que presenta un inmunofenotipo similar al de la LPA (Arana-Rosainz *et al.*, 2021; Mason *et al.*, 2018; Matarraz *et al.*, 2023). A diferencia de lo observado en nuestro estudio y en el de Matarraz *et al.*, otros autores (Y.-R. Liu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2019) no individualizaron la población de células leucémicas inmaduras de la población comprometida a LMNM.

En lo que respecta a la caracterización inmunofenotípica de las tres poblaciones leucémicas. Lo más destacado en nuestro estudio fue la baja expresión de CD34 en los 3 grupos celulares lo que coincide con lo publicado por otros autores (Y.-R. Liu *et al.*, 2013; Matarraz *et al.*, 2023). Aunque la expresión de CD34 fue superior en la población de células leucémicas inmaduras frente a los otros dos grupos (4% vs. 0%), sólo un 27% de los casos mostraron una positividad $\geq 20\%$. En la población de células leucémicas inmaduras se encontró un mayor porcentaje de muestras positivas para CD7 y CD25.

La expresión de CD7 ya ha sido descrita en este tipo de leucemia en un grupo de pacientes con expresión de antígenos linfoides (Zhou *et al.*, 2019) y al igual que en la serie de Matarraz *et al.*, el componente de células leucémicas inmaduras es el que mostró mayor positividad para este antígeno (Matarraz *et al.*, 2023). En lo que respecta al antígeno CD25, la expresión se ha relacionado con la detección de la mutación FLT3-*ITD* (Travaglini *et al.*, 2020), en nuestra serie la positividad para este marcador se detectó en la población de células leucémicas inmaduras (23%). En cuanto a la población de células leucémicas monocíticas se objetivó: 1) una baja mediana de expresión de CD13 (26%) y de MPOc (31%) lo que podría indicar una pérdida de estos antígenos, especialmente de CD13, y 2) una mayor expresión de CD56 lo cual es consistente con los hallazgos reportados en estudios previos (Y.-R. Liu *et al.*, 2013; Matarraz *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2019). Tal como es esperable, los niveles de expresión más altos de los antígenos monocíticos como CD4, CD9, CD11b, CD14, CD15, CD35, CD36, CD64 y CD300e se observaron en la población de células leucémicas monocíticas en consonancia con otros autores (Matarraz *et al.*, 2023). CD33, CD38 y CD123 mostraron altas tasas de positividad que fueron similares en los tres grupos celulares. Por otra parte, pacientes con población de células leucémicas inmaduras y comprometidas a LMNM (34% y 15% respectivamente), mostraron sobreexpresión del antígeno CD33 información que ya ha sido referida por otros autores (Nomdedeu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2019). Tanto la positividad como la sobreexpresión de CD33 en la LMA *NPM1* podría ser de utilidad como diana terapéutica. De hecho, en un ensayo clínico en fase III han evaluado la adición de gemtuzumab ozogamicina (anti-CD33) en los esquemas terapéuticos intensivos, observando menores tasas de recaída en los pacientes que lo recibieron (H. Döhner *et al.*, 2023).

En cuanto a los patrones de maduración de las células monocíticas leucémicas, los asincronismos más frecuentemente observados fueron CD300e⁺CD14⁻ (58% de los casos) y/o CD14⁻CD35⁺ (68%) frente a CD14⁺CD35⁻ (5%), esto resultados están en línea con estudios previos que demuestran que estos perfiles madurativos alterados están presentes en la mayoría de pacientes con LMA y mutación de *NPM1*, y que además la presencia de los dos primeros junto con débil expresión de CD34 parecen los fenotipos más específicos para diferenciar la LMA con mutación de *NPM1* del resto de LMA (Matarraz *et al.*, 2017, 2023). Estos patrones de maduración fueron evaluados en los 38 casos en los que la población monocítica no se consideró leucémica y también identificamos estas alteraciones madurativas, siendo la más frecuente el asincronismo de CD300e⁺CD14⁻. Fernández *et al.*, evalúan el perfil fenotípico y madurativo de los

compartimentos residuales de células eritroides, monocíticas y granulocíticas en la médula ósea de pacientes con LMA de *novo* encontrando una alta frecuencia de casos (>80%) con fenotipos alterados asociados a hematopoyesis clonal (Fernandez *et al.*, 2013).

Por otra parte, dependiendo de la proporción y la distribución relativa de las tres principales poblaciones de células leucémicas: inmaduras, comprometidas a LMNM y monocíticas, Matarraz *et al.*, describieron 7 patrones inmunofenotípicos diferentes (A-G) que fueron evaluados inicialmente en los pacientes de nuestra serie (Matarraz *et al.*, 2023). La validación de esta clasificación nos permitió confirmar resultados similares a los referidos por estos autores, el patrón inmunofenotípico predominante observado con mayor frecuencia fue el de células comprometidas a LMNM (25%), seguido del monocítico (22%) y del de células inmaduras (18%). Mientras que el patrón mixto que se documentó con mayor frecuencia fue el D que combinaba células inmaduras con monocíticas (21%). La constatación de recaídas originadas por poblaciones leucémicas minoritarias presentes al diagnóstico, generalmente inferiores al 20%, así como la posibilidad de cambios inmunofenotípicos en la recaída descritos en la literatura (Martínez-Losada *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019) hicieron que nos planteáramos la caracterización de todas las poblaciones leucémicas de la muestra al diagnóstico con idea de evaluar su implicación en el momento de la recaída. Estos hallazgos justificaron esta nueva clasificación-R que permitía distribuir a los pacientes en función de todas las poblaciones leucémicas con independencia de la proporción que presentaban. De los pacientes analizados, un total de 24 fueron reclasificados, de los cuales más de la mitad (13 casos) fueron reasignados a un nuevo patrón inmunofenotípico. En la mayoría de estos pacientes no se había valorado la población de células leucémicas inmaduras cuando se encontraba en una proporción inferior al 20%. Esta población de células leucémicas inmaduras parece que presentan una mayor resistencia a los tratamientos (Cocciardi *et al.*, 2019; van Gils *et al.*, 2021) y su detección en los pacientes con LMA *NPM1* les confiere un peor pronóstico (Mason *et al.*, 2019; Mer *et al.*, 2021). Al aplicar la clasificación-R, el patrón inmunofenotípico que identificamos con mayor frecuencia fue el patrón mixto 4 de células inmaduras y monocíticas (34%) seguido de los patrones de expansión predominantes de células comprometidas a LMNM (19%) y de células inmaduras (16%) (patrones 1 y 2 respectivamente). Se constató la disminución de la frecuencia del patrón 3 de células monocíticas, posiblemente por la reasignación de la mayoría de los pacientes al patrón mixto 4.

Respecto a las alteraciones moleculares detectadas al diagnóstico en nuestra serie, los hallazgos coinciden con lo reportado por otros autores en relación con la frecuencia de los tipos de mutación de *NPM1* y las comutaciones asociadas más recurrentes (Alpermann *et al.*, 2016; Sargas *et al.*, 2023; Yao *et al.*, 2024). Los genes reguladores de la metilación del ADN mostraron las VAF más altas, superiores a *NPM1* y al resto de genes analizados, mientras que los asociados a vías de señalización presentaron una VAF más baja, excepto *NF1*. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Mason *et al.*, que refieren VAF altas en mutaciones tempranas y más bajas en eventos tardíos (Cappelli *et al.*, 2018; Mason *et al.*, 2019).

Algunos autores han evaluado la correlación entre los patrones inmunofenotípicos y las mutaciones más comúnmente detectadas en la LMA *NPM1*. Mason *et al.*, describieron una cohorte de 40 pacientes con LMA *NPM1* con una población de células leucémicas DN con inmunofenotipo similar a LPA, en la que un 97,5% de los casos presentaba alteraciones en *TET2*, *IDH1* o *IDH2* (Mason *et al.*, 2018); este hallazgo ha sido corroborado por Arana Rosainz *et al.*, que confirman la correlación entre las mutaciones *TET2* o *IDH2* y los casos con la misma población de células leucémicas mieloides (Arana-Rosainz *et al.*, 2021). En un segundo estudio, Mason *et al.*, evidenciaron que estas alteraciones se asociaron principalmente con el fenotipo DN, y en menor medida con células mieloides leucémicas sin este perfil. En concordancia con Mason *et al.*, nuestros resultados mostraron una mayor prevalencia de *IDH1* (43%) en las células leucémicas comprometidas a LMNM en el patrón predominante como en el modelo mixto en combinación con la población de células leucémicas inmaduras. El resto de hallazgos en nuestra serie diferían con estos autores (Mason *et al.*, 2019). Así las alteraciones en *TET2* presentaron una mayor prevalencia en la población de células leucémicas monocíticas como población única (patrón 3), seguida de la combinación con células comprometidas a LMNM (patrón 6). En cuanto a *IDH2*, la mayor prevalencia (40%) se registró en el patrón 5 (población de células leucémicas comprometidas a LMNM combinada con la población de células leucémicas inmaduras) y en el patrón 6 (población de células leucémicas comprometidas a LMNM combinada con la población de células leucémicas monocíticas). En la serie de Mason *et al.*, se identifican tres subtipos inmunofenotípicos, sin considerar poblaciones minoritarias que en combinación podrían interferir en la prevalencia mutacional de cada grupo. Además, estos autores analizaron la correlación agrupando los genes (*TET2*, *IDH1* e *IDH2*) y no los estudiaron de forma individualizada. Estos factores, podrían justificar las discrepancias con nuestros resultados observadas en la correlación de los patrones inmunofenotípicos y

estas mutaciones. La serie de Arana Rosainz *et al.*, incluyó únicamente cinco casos con población DN, de los cuales cuatro presentaban mutaciones en *TET2* o *IDH2*. Finalmente, hay que tener en cuenta que la distribución en siete patrones de los 78 casos estudiados en nuestra serie condicionó un número reducido en algunos grupos, pudiendo influir en los resultados del análisis.

Hernández-Sánchez *et al.*, han evidenciado que la combinación de *DNMT3A* y *FLT3*-ITD en los pacientes con LMA *NPM1* confiere un pronóstico desfavorable con una SG a 2 años del 25% (Hernández-Sánchez A, CO-130- junio de 2022). La presencia de las mutaciones de *FLT3*-ITD en las poblaciones más inmaduras ha sido observada por algunos autores (Mer *et al.*, 2021). En nuestra serie encontramos que las alteraciones de *DNMT3A* y *FLT3*-ITD se presentaron con una prevalencia más alta en aquellos pacientes que tenían en común la población de células leucémicas inmaduras (patrones 1, 4, 5 y en menor medida en 7). Se analizó la SG y la IAR de estos pacientes frente a aquellos con el resto de los patrones inmunofenotípicos, sin que pudiéramos observar diferencias significativas posiblemente por la limitación del tamaño muestral.

Por otra parte, nuestros resultados indican que la frecuencia alélica de *NPM1* y las alteraciones cromosómicas no varían significativamente según el patrón inmunofenotípico, en contraste con Mason *et al.*, quienes encontraron una frecuencia alélica de *NPM1* más alta en pacientes con fenotipo mieloide que en aquellos con fenotipos monocítico o mieloide DN (Mason *et al.*, 2019).

Se constató la recaída de la leucemia en el 29% de los pacientes del estudio con una mediana de tiempo de 12 meses, similar a lo reportado por Zhou *et al.*, (Zhou *et al.*, 2019). La mutación de *NPM1* persistió en el 91% de los pacientes a la recaída, este dato está en consonancia con los hallazgos observados por otros autores que reportan una estabilidad entorno al 91-92% (Cocciardi *et al.*, 2019; Krönke *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2019). La mayoría de los pacientes en recaída presentaron una población de células leucémicas inmaduras (12 de 19), que ya estaba al diagnóstico, y/o con una población de células leucémicas comprometidas a LMNM (12 de 19), que en 5 pacientes no se detectó al diagnóstico. Al comparar el inmunofenotipo entre el diagnóstico y la recaída, se observó un aumento en la expresión de CD34 en ambas poblaciones y un incremento en la expresión de CD15 en la población de células leucémicas inmaduras. Ambos hallazgos ya han sido descritos por otros autores que señalan los cambios de estos dos antígenos como los más frecuentemente detectados (Martínez-Losada *et al.*, 2018; Nomdedeu *et al.*, 2011). El aumento de CD34, podría estar en relación con niveles más altos de las proteínas ERK1/2 y BCL-2 en las células CD34⁺, que se asocia con la

resistencia a la apoptosis durante la quimioterapia, lo que les permitiría sobrevivir mejor al tratamiento que las células CD34⁺ (Hayun et al., 2020). Estas células CD34⁺ podrían encontrarse en escasa proporción al diagnóstico y resistir al tratamiento siendo el origen en algunos pacientes de la recaída. Asimismo, la persistencia de la población de células leucémicas inmaduras podría deberse a que las LMA con mutación *NPM1*, que presentan características de inmadurez, son más resistentes a la quimioterapia y, por lo tanto, tienen una mayor probabilidad de recaída (Cocciardi et al., 2019). Por otro lado, la aparición de poblaciones celulares más diferenciadas, como las células leucémicas comprometidas a LMNM, detectadas en la recaída de los 5 pacientes en los que no se observaron al diagnóstico, podría estar vinculada a la búsqueda de mecanismos de escape y adaptación ante la presión selectiva del tratamiento. La detección de la población de células leucémicas monocíticas en la recaída en sólo en un 26% de los casos se podría explicar por la menor IAR observada en los pacientes que presentaban esta población al diagnóstico. Al comparar el inmunofenotipo de las células leucémicas monocíticas entre el diagnóstico y la recaída se observó una disminución en la expresión de antígenos monocíticos asociados a madurez y un aumento en la expresión de antígenos relacionados con inmadurez (CD117), además de una mayor infiltración por formas más inmaduras: monoblastos CD34⁺CD117⁺ y promonocitos CD34⁺CD117⁺CD14⁺CD35⁺CD300e⁺. Los genes *TET2* y *SRSF2* se asociaron a la población de células leucémicas monocíticas (patrón 3) al diagnóstico, en este momento se observó principalmente infiltración por formas más diferenciadas de este linaje. La mayor inestabilidad de estos dos genes en la recaída frente al resto de mutaciones junto con una mayor resistencia a la terapia por las células más inmaduras podría explicar la aparición de un fenotipo más precoz de células leucémicas monocíticas en la recaída. Estudios con un mayor número de pacientes que evalúen los cambios de expresión de los marcadores monocíticos junto con el patrón de diferenciación y el perfil mutacional entre el diagnóstico y la recaída, podrían ayudar a predecir la respuesta al tratamiento y servir de base para el desarrollo de terapias dirigidas específicamente a erradicar estas células.

Un 42% de los pacientes sufrieron un cambio de patrón inmunofenotípico entre el diagnóstico y la recaída, lo que apoya el dinamismo evolutivo de la LMA con mutación *NPM1*, con la coexistencia de diversas poblaciones leucémicas que pueden emerger o desaparecer en respuesta a los diferentes esquemas terapéuticos posiblemente como consecuencia de la selección por la presión del tratamiento (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

Un 18% de los pacientes de este estudio mantuvieron el mismo perfil mutacional, mientras que en el 82% restante se detectaron variaciones, lo que coincide con lo publicado por Kronke *et al.*, (Krönke *et al.*, 2013). Estos resultados difieren con otros autores como Martínez-Losada *et al.*, que no observaron diferencias en el perfil mutacional entre el diagnóstico y la recaída en la mayoría de los pacientes (62,5%). Estos autores incluyeron únicamente a pacientes de riesgo favorable según la ELN y esta selección no realizada en nuestra serie podría explicar las diferencias (Martínez-Losada *et al.*, 2018).

Junto con *NPM1*, los genes que encontramos más estables fueron *DNMT3A*, *IDH2*, *IDH1*, *NF1*. La estabilidad de *DNMT3A* e *IDH2* es consistente con lo reportado en la literatura (Chou *et al.*, 2011; Cocciardi *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2012; Sargas *et al.*, 2023). La mayor estabilidad de estos genes se podría explicar por su adquisición temprana en la leucemogénesis como eventos pre-leucémicos. Esto se encuentra en consonancia con el modelo de evolución clonal más ampliamente aceptado, que determina que la LMA con mutación *NPM1* se desarrolla a partir de una hematopoyesis clonal preexistente (*DNMT3A* o *IDH2*) (Desai *et al.*, 2018; Falini *et al.*, 2020; Potter *et al.*, 2019). La estabilidad de *IDH1* parece más variable, es mayor en nuestro estudio en comparación con Kronke *et al.*, aunque es similar a lo observado por Schnittger *et al.*, (Schnittger *et al.*, 2010). Además, en la recaída también se identificaron adquisiciones de nuevas mutaciones en: *DNMT3A*, *IDH2*, *IDH1*, *NF1*, *RUNX1*, *CBL*, *GATA2*, *CEBPA*, *TET2*, *FLT3-ITD*, *PTPN11*, *PRPF8*, *TP53*, y el reordenamiento *ETV6:CHIC2*. Esto podría explicar un incremento en la complejidad genética de esta leucemia en la recaída (Krönke *et al.*, 2013). Algunos genes asociados a vías de señalización como *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* y *NRAS*; junto con *TET2* y *SRSF2* fueron más inestables. Es importante destacar que, mientras que las mutaciones en *FLT3-ITD* se perdieron y se ganaron en proporciones similares, las mutaciones en *NRAS* se perdieron de forma predominante. La pérdida de mutaciones en la recaída podría sugerir que estas alteraciones son eventos tardíos en el desarrollo de la leucemogénesis y que las células que las portan sufren mayor sensibilidad a la quimioterapia.

Los casos en los que se observó diferencias en el perfil mutacional entre el diagnóstico y la recaída se distribuyeron en 3 grupos: clon ancestral con evolución en 9 pacientes (41%), clon inicial con evolución en 6 pacientes (27%) y clon ancestral en 3 pacientes (14%); estas frecuencias son similares a las reportadas por Kronke *et al.*, en estos mismos grupos de evolución clonal (Krönke *et al.*, 2013). Estos hallazgos podrían sugerir que los esquemas terapéuticos actuales no logran erradicar todas las células

leucémicas presentes en los pacientes, tanto las portadoras de mutaciones más tempranas como de las tardías, que tendrían capacidad de regenerar la leucemia. No se identificó ningún paciente con un “clon no relacionado” en la recaída, lo que podría sugerir que en la LMA con mutación *NPM1* existe una correlación entre la leucemia inicial y la recaída (con o sin *NPM1*), indicando un origen común entre ambas.

Con respecto al estudio comparativo entre el patrón inmunofenotípico y el perfil mutacional, los pacientes con un “clon idéntico” mostraron mayor estabilidad inmunofenotípica, mientras que los pacientes asignados al grupo del “clon inicial con evolución” (pacientes que presentaron el mismo perfil mutacional y además adquirieron otras alteraciones), mostraron una tendencia más clara a experimentar cambios fenotípicos. Ninguno de los grupos estudiados mostró diferencias significativas, lo que podría atribuirse al reducido tamaño muestral de este estudio. Estos hallazgos están en línea con lo reportado por Martínez-Losada et al., que evidenciaron que los cambios en el perfil mutacional estuvieron presentes en el 36,5% de los pacientes con LMA y mutación *NPM1*, y que el 66% de estos casos también presentaron cambios inmunofenotípicos (Martínez-Losada et al., 2018).

Un 7% de los pacientes de nuestra serie, presentaron resistencia primaria, y ninguno de ellos mostró cambios en el perfil inmunofenotípico ni mutacional. Esta información concuerda con lo referido en la literatura, en la que aproximadamente un 49% de los pacientes con LMA refractaria mantienen el mismo perfil mutacional observado al diagnóstico (Sargas et al., 2023)

Sólo en dos (9%) de nuestros pacientes se confirmó la pérdida de *NPM1* en la recaída. Este hallazgo ha sido descrito en un 10% de los pacientes con progresión de la leucemia (Cocciardi et al., 2019; Giupponi et al., 2023; Herold et al., 2017; Höllein et al., 2018). Los dos casos de nuestra serie son de especial interés por la relevancia que tuvo el seguimiento mediante CFM.

En el paciente 66 la CFM permitió identificar todas las poblaciones leucémicas presentes al diagnóstico independientemente de su porcentaje. La población leucémica CD117^{-/+d}HLA-DR^{-/+d}CD34⁺aCD13⁺aCD33⁻CD38⁺d que representaba al diagnóstico un 1% de la CNT fue detectada en los estudios de ERM y posteriormente en la recaída. El inmunofenotipo de esta población es similar al descrito por Zhou et al., en los pacientes con pérdida de *NPM1* durante la recaída en los que observó expresión de CD34 con aumento de CD13 y disminución de CD33 (Zhou et al., 2019). Llama la atención, la pérdida del inmunofenotipo característico de esta entidad en la recaída de estos

pacientes. En cuanto a los cambios en el perfil mutacional, se observó el mantenimiento de las mutaciones *DNMT3A* (p. (Pro743Leufs*30)), *IDH1* y *SRSF2*, junto con la pérdida de *TET2* y *NPM1* y la adquisición de una nueva mutación en *DNMT3A* (p. (Arg736His)) en la primera recaída. La persistencia de mutaciones en *DNMT3A* en estos casos indica que esta alteración es anterior a *NPM1* en la leucemogénesis aunque se han descrito en algunos pacientes la adquisición de nuevas alteraciones en este gen como eventos tardíos (Martínez-Losada *et al.*, 2018). Estos cambios mutacionales observados en la recaída ya se habían detectado en la población considerada como ERM por CFM que se aisló mediante separación celular, además de identificarse de nuevo cuando el paciente alcanzó RC tras la primera recaída. Mientras que estos datos están en consonancia con lo descrito por Hasserjian *et al.*, que relacionan la presencia de algunas alteraciones de hematopoyesis clonal como *IDH1* e *IDH2* con un pronóstico más adverso (Hasserjian *et al.*, 2020), difieren con los resultados de Jongen-Lavrencic *et al.*, que no confieren valor pronóstico a largo plazo a la persistencia de mutaciones asociadas a hematopoyesis clonal (Jongen-Lavrencic *et al.*, 2018).

El paciente 83, fue monitorizado mediante CFM utilizando la doble aproximación de *LAIP* y *DfN* recomendada por la ELN (Heuser *et al.*, 2021). Tras el tratamiento de inducción, el paciente alcanzó RC, identificándose por CFM un 0,1% de la CNT de células atípicas con un inmunofenotipo *DfN*. Estas células junto con otra nueva población atípica que apareció en la recaída fueron las responsables de la progresión de la enfermedad. En cuanto a las mutaciones, es relevante mencionar que se mantuvieron las de *IDH1* y *SRSF2* y se constató la pérdida de *NPM1*. Loghavi *et al.*, observaron una población de precursores mieloides *CD34⁺CD13⁺CD33⁺* con inmunofenotipo atípico en un 40% de pacientes con LMA *NPM1* que tras alcanzar RC mantenían mutaciones de hematopoyesis clonal. Aunque algunos autores no asocian *SRSF2* a un mayor riesgo de recaída (Hasserjian *et al.*, 2020; Jongen-Lavrencic *et al.*, 2018), Loghavi *et al.*, encuentran que las mutaciones *IDH2* y *SRSF2* se observaron exclusivamente en el grupo de pacientes que presentaron esta población de progenitores con inmunofenotipo atípico (Loghavi *et al.*, 2021). Son necesarios más estudios que permitan distinguir claramente aquellas mutaciones que puedan indicar la persistencia de células leucémicas residuales frente a células atípicas portadoras de alteraciones relacionadas con hematopoyesis clonal y caracterizar los inmunofenotipos patológicos presentes en células premalignas con mutaciones relacionadas con la hematopoyesis clonal.

En el caso del paciente 66 se podría hablar de progresión de la enfermedad originada por un clon ancestral (minoritario) presente al diagnóstico que adquiere alguna mutación en la recaída (clon ancestral con evolución), esto ya ha sido observado por Ding *et al.*, como uno de los principales mecanismos de evolución clonal (Ding *et al.*, 2012). El paciente 83, presentaba historia previa de SMD, en este caso la recaída fue producida por un clon ancestral (Grimwade *et al.*, 2016). Actualmente, no está claro si los casos con pérdida de la mutación *NPM1* se podrían explicar cómo recaída de la misma enfermedad o como un mecanismo de evolución clonal a partir de un clon pre-leucémico o como última opción por el desarrollo de una neoplasia mieloide secundaria a la terapia (Cocciardi *et al.*, 2019; Giupponi *et al.*, 2023).

Es complejo realizar la inferencia de los clones sin las técnicas de secuenciación de célula única, por ello los gráficos de *fishplot* de los dos pacientes con pérdida de *NPM1* a la recaída se realizaron teniendo en cuenta la frecuencia alélica, las relaciones de exclusividad mutacional y la presencia/ausencia de las alteraciones a lo largo del curso de la enfermedad. La estrategia planteada en este estudio para abordar el análisis de la evolución clonal posiblemente pueda ser superada por la nueva tecnología de secuenciación de célula única que permite integrar datos moleculares e inmunofenotípicos a nivel de cada célula, proporcionando información sobre la heterogeneidad y la dinámica de la evolución clonal (García-Álvarez *et al.*, 2023; Morita *et al.*, 2020).

Aunque sólo se trata de 2 casos, la CFM aportó información complementaria durante el seguimiento de la enfermedad en pacientes en progresión con pérdida de la mutación del gen *NPM1*. La NGS es considerado un método alternativo que podría ser utilizado en la monitorización de múltiples alteraciones en un mismo paciente y en la detección de clones emergentes, aunque en la actualizada no ha sido implementado como técnica asistencial (H. Döhner *et al.*, 2022; Duncavage *et al.*, 2022).

Algunos estudios han resaltado la importancia del análisis de la evolución clonal de la LMA para intentar comprender como contribuye en la recaída de la leucemia (Ding *et al.*, 2012; García-Álvarez *et al.*, 2023; Morita *et al.*, 2020). En este proyecto se propuso inicialmente evaluarla mediante el aislamiento de las diferentes poblaciones leucémicas por CFM y la posterior NGS. Entre las poblaciones aisladas al diagnóstico, destaca la población de células CD34⁺ mieloides sin alteraciones inmunofenotípicas en las que en 5 pacientes de 7 no se observó la mutación *NPM1*. Sin embargo, sí que se detectaron mutaciones asociadas a hematopoyesis clonal (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*). Esto podría indicar que se tratan de pre-LSC con alteraciones de hematopoyesis clonal, y

posiblemente las LSC de estos casos se encontrarían en el compartimento CD34⁻ (Martelli *et al.*, 2010; Taussig *et al.*, 2010). Estos hallazgos coinciden con lo reportado Shlush *et al.*, quienes aíslan *stem cells* de pacientes con LMA *NPM1* que no presentan esta mutación, pero sí *DNMT3A* indicando que estas células tienen una mayor actividad repobladora. Así como también con lo referido por Potter *et al.*, que postula la existencia de células pre-leucémicas CD34⁺CD33⁻ con alteraciones iniciales y sin *NPM1* (Potter *et al.*, 2019). Esto contrasta con lo publicado por Zeijlemaker *et al.*, que tras separar células CD34⁺ de pacientes con LMA *NPM1* identificaron la mutación también en esta población (Zeijlemaker *et al.*, 2015). Por otra parte, Martelli *et al.*, observó que tras aislar la fracción leucémica CD34⁺ esta contenía células *NPM1* que iniciaban la leucemia tras trasplantarlas en ratones (Martelli *et al.*, 2010). En cuanto a las principales poblaciones de células leucémicas (inmaduras, comprometidas a LMNM y células leucémicas monocíticas), estas mostraron variantes de hematopoyesis clonal (como *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*) y la adquisición secuencial de mutaciones en *NPM1* y *FLT3*. La presencia de la alteración en *KRAS* se detectó exclusivamente en la población de células leucémicas monocíticas del paciente 67, sin observarse en el resto de las células leucémicas de este mismo paciente. Esto sugiere que estas mutaciones se adquirieron en un subconjunto menor de células en una etapa posterior de la leucemogénesis. Mer *et al.*, reportaron que mientras que las poblaciones más inmaduras de la LMA *NPM1* estaban enriquecidas en mutaciones de *FLT3*-ITD, las más diferenciadas como la de células leucémicas monocíticas, presentaban mutaciones en genes asociados a vías de señalización RAS como *NRAS* y en *FLT3*-TKD (Mer *et al.*, 2021).

Tras alcanzar remisión completa, en la mayoría de los pacientes sólo se detectaron alteraciones en *DNMT3A*, *TET2* e *IDH1*, lo que apoya que estas podrían corresponder a hematopoyesis clonal. La persistencia de mutaciones relacionadas con hematopoyesis clonal en RC ya ha sido comentada por varios grupos (Gaidzik *et al.*, 2018; Onecha *et al.*, 2020). Algunos indican que no está asociada a la recaída mientras que otros señalan su relación (Hasserjian *et al.*, 2020). Según Debarri *et al.*, la detección de mutaciones en *IDH1* e *IDH2* en RC en pacientes LMA *NPM1* con ERM negativa está relacionada con mayor riesgo de recaída (Debarri *et al.*, 2015; Ok *et al.*, 2019). La persistencia de estas variantes podría indicar ERM con riesgo de recaída o un mayor riesgo de evolución clonal distinto no relacionado con la LMA inicial a partir de estas células pre-leucémicas.

En el caso de la LMA *NPM1*, la RT-qPCR es la técnica de elección para la monitorización de la ERM (Heuser *et al.*, 2021). En este estudio se propuso el análisis

comparativo con la CFM observándose una buena concordancia entre la CFM realizada en MO y la RT-qPCR efectuada en SP y en MO que fueron del 86% y 90% respectivamente. En nuestro caso la concordancia es mayor que lo publicado por López *et al.*, que compararon la CFM y la RT-qPCR en 81 muestras pareadas concluyendo una concordancia del 57%. En el estudio de estos autores, el número de células adquiridas fue inferior (500.000) y la estrategia utilizada para el análisis de la ERM fue únicamente la búsqueda de LAIP (Lopez *et al.*, 2021), ambos factores pudieron explicar las discrepancias con nuestros resultados. Otras diferencias que también pueden contribuir son las condicionadas por la muestra analizada y los puntos de corte utilizados para valorar la positividad de ERM mediante RT-qPCR. Los aplicados en MO en nuestra serie son la ratio ≥ 1000 en post-inducción y en momentos posteriores ratio ≥ 150 , este último es similar al de Krönke *et al.*, que consideraron una ratio ≥ 200 . La SP parece más adecuada para la monitorización, en MO la detección de PCR positiva a niveles bajos, puede no significar una posterior recaída (Krönke *et al.*, 2011). Sin embargo, la positividad en SP ratio ≥ 1 tras la consolidación o en el seguimiento se relaciona con una probabilidad de recaída muy alta (Ivey *et al.*, 2016). En nuestro estudio la RT-qPCR detectó más casos positivos en SP que la CFM en MO (8 vs. 1), esto va en línea con lo indicado por Pettersson *et al.*, que compararon ambas técnicas en muestras de 15 pacientes (mutación *NPM1* tipo A) recogidas durante 43 meses, en este trabajo, la ERM fue qPCR⁺ en 32 de las 45 muestras de seguimiento, en contraste con la CFM sólo positiva en 2 de las 45 muestras evaluadas. Los autores confirman con estos resultados que la qPCR es más sensible y precisa que la CFM para la determinación de ERM en *NPM1* tipo A (Pettersson *et al.*, 2016).

Tras esta información, se decidió valorar el impacto pronóstico de la ERM en dos momentos diferentes del seguimiento: tras el primer ciclo de consolidación, que es evaluado en el protocolo LMA FLOW de PETHEMA y también en las guías de la ELN 2022 para las LMA sin seguimiento por técnicas moleculares y tras el segundo ciclo de consolidación, que es el momento considerado en el protocolo LMA *NPM1* de PETHEMA como el óptimo para el estudio en SP de la carga mutacional de *NPM1* mediante técnicas moleculares. Sin embargo, mediante CFM no se observó detección de ERM $\geq 0,1$ en ninguna de las muestras analizadas ni en el momento 3 (tras primer ciclo de consolidación) ni en el momento 4 (tras segundo ciclo de consolidación) por lo que no pudimos evaluar el papel pronóstico de la ERM mediante CFM en estos momentos de estudio.

A su vez, también se analizó el impacto de la ERM detectada mediante CFM en 37 pacientes en MO post-inducción con un corte de positividad de $\geq 0,1\%$ observándose diferencias significativas con una tendencia hacia una mejor SG y una menor IAR en aquellos casos con ERM $< 0,1\%$. Estos resultados deben ser confirmados en otras series que incluyan un mayor número de pacientes que permitan determinar el valor añadido que puede aportar la CFM a la RT-qPCR en la predicción de la recaída.

Las discordancias entre ambas técnicas tienen diferentes explicaciones. Cuando se trata de la misma muestra de MO, el orden de recolección de los tubos puede influir en la hemodilución del material extraído haciendo que no sea homogéneo. Además, la detección de ERM mediante CFM en la LMA es compleja y podría haberse visto limitada por varios motivos. 1) No todas las células leucémicas presentan un fenotipo atípico que permita diferenciarlas de la hematopoyesis normal; 2) los fenotipos pueden cambiar con la evolución de la enfermedad y la selección de subclones (Cui *et al.*, 2014; Martínez-Losada *et al.*, 2018; Pettersson *et al.*, 2020); y 3) la presencia de precursores mieloides en regeneración, en ocasiones con alteraciones inmunofenotípicas transitorias, y de poblaciones minoritarias que puedan mimetizar la ERM, dificultan el análisis (Eckel *et al.*, 2020; Hanekamp *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023). A título de ejemplo, la identificación de los patrones de maduración atípicos de la serie monocítica pueden ser difíciles de evaluar con la presencia de diferentes poblaciones de células dendríticas presentes en la MO (Van Der Pan *et al.*, 2022), esto junto con la falta de LAIPs y la expresión reactiva y transitoria de CD56 en esta población de células, complica la detección de las células monocíticas leucémicas que persisten tras el tratamiento (S. S. Patel, 2024). Posiblemente, la implementación y estandarización de combinaciones de más de 8 colores que permitan evaluar más antígenos celulares amplíe el conocimiento de los patrones de maduración y mejoren la detección de la ERM con CFM en la LMA.

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, en el contexto de la evaluación de la ERM, existe una cuestión no resuelta sobre las alteraciones inmunofenotípicas que se puedan identificar tanto por DfN como por LAIP y que estén presentes en células pre-leucémicas con alteraciones relacionadas con hematopoyesis clonal. La posibilidad de que la hematopoyesis clonal persistente, tras la erradicación de la mutación *NPM1*, pueda llevar a una detección errónea de ERM mediante CFM ha justificado investigaciones más recientes (Loghavi *et al.*, 2021; S. S. Patel, 2024), especialmente ante la posibilidad de que los pacientes que presentan hematopoyesis clonal puedan tener más riesgo de recaída, tema que actualmente sigue siendo controvertido

(Hasserjian *et al.*, 2020; Jongen-Lavrencic *et al.*, 2018). Loghavi *et al.*, en una serie de pacientes con diagnóstico de LMA con mutación *NPM1*, encontraron al valorar la ERM, que la mitad de los pacientes con mutaciones de hematopoyesis clonal persistentes en ausencia de *NPM1*, tenían una pequeña proporción de precursores mieloides CD34⁺, CD13⁺, CD33⁺ con inmunofenotipo atípico que describieron como pre-leucémico que no se correlacionó con la supervivencia libre de recaída (Loghavi *et al.*, 2021; S. S. Patel, 2024).

Por otro lado, en los dos pacientes en los que se perdió la mutación *NPM1* en la recaída, la CFM detectó ERM antes de que esto sucediera: en el paciente 66 se objetivaba la presencia de la población minoritaria al diagnóstico (*LAIP*) y en el paciente 83 se detectó una población con inmunofenotipo atípico (*DfN*). Esto sugiere que un pequeño grupo de pacientes con pérdida de *NPM1* en la recaída podría beneficiarse de análisis combinados mediante ambas técnicas de ERM. Estudios prospectivos de monitorización de la ERM de manera pareada mediante ambas técnicas (CFM y biología molecular) en un mayor número de pacientes podrían contribuir a ampliar la información biológica de los casos con pérdida de la mutación *NPM1* y alertar de la progresión de la enfermedad y de la posibilidad de recaída. Posibles, inconvenientes de una valoración pareada a nivel asistencial, ante la alta estabilidad de *NPM1*, serían la sobrecarga de trabajo y de recursos económicos en los laboratorios con implicación de más personal y un mayor tiempo de respuesta. Por otro lado, ante casos discrepantes se podrían tomar decisiones erróneas basados en la técnica no estándar.

Es importante reconocer las principales limitaciones encontradas lo largo del desarrollo de este estudio. Entre los problemas técnicos, destaca un volumen insuficiente y la calidad deficiente de algunas muestras. Además, los procedimientos de CFM y separación celular debían realizarse preferentemente dentro de las primeras 24 horas, lo que complicó su ejecución. La escasa proporción de células de ERM seleccionadas dificultó la extracción de ADN y los análisis moleculares, lo que resultó en un número limitado de muestras aptas para el estudio del perfil mutacional.

En la actualidad, la información inmunofenotípica disponible de las LMA con mutación *NPM1* deja muchas cuestiones por resolver. Este tipo de leucemia no es biológicamente uniforme y posiblemente abarca diferentes subtipos inmunofenotípicos. Son necesarios más estudios que permitan confirmar los datos planteados en los últimos trabajos, especialmente en lo referente al perfil inmunofenotípico y su correlación con los hallazgos genéticos. La información aportada en este estudio contribuye a mejorar el conocimiento biológico de la LMA con mutación *NPM1* integrando la caracterización

inmunofenotípica y el perfil mutacional tanto en el diagnóstico como en la recaída, pero el desarrollo de todos los objetivos se ha visto limitado en ocasiones. En los últimos años numerosos autores destacan la aplicabilidad de la técnica de secuenciación de célula única en el estudio de la evolución clonal de la LMA (García-Álvarez *et al.*, 2023; J. Liu *et al.*, 2024; Miles *et al.*, 2020; Morita *et al.*, 2020). Este enfoque permite integrar datos moleculares e inmunofenotípicos a nivel de cada célula, proporcionando información sobre la heterogeneidad y la dinámica de la evolución clonal. La aplicación de esta nueva técnica podría ayudar en la caracterización biológica de la LMA con mutación *NPM1* y, en consecuencia, podría abrir la puerta al desarrollo de estrategias de tratamiento cada vez más personalizadas, con el potencial de optimizar el manejo clínico y mejorar el pronóstico de este subgrupo de pacientes.

7.CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral cuyo objetivo primordial ha sido la caracterización y correlación inmunofenotípica y molecular de la leucemia mieloblástica aguda con mutación de *NPM1*, así como el estudio de su evolución clonal son:

1. El análisis inmunofenotípico de la leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1* al diagnóstico mediante citometría de flujo ha permitido identificar y caracterizar la heterogeneidad clonal de esta entidad (poblaciones de células leucémicas inmaduras, comprometidas a linaje mieloide no monocítico y monocíticas), así como las alteraciones inmunofenotípicas y los patrones de maduración característicos de la LMA *NPM1*.
2. El aislamiento mediante separación celular de los diferentes compartimentos celulares identificados al diagnóstico ha posibilitado determinar las alteraciones moleculares presentes en cada población.
3. Las células progenitoras mieloides con un perfil inmunofenotípico aparentemente normal también pueden presentar alteraciones en genes asociados a eventos más tempranos de la leucemogénesis y hematopoyesis clonal (*DNMT3A*, *TET2*). Sin embargo, no muestran mutaciones fundadoras de la LMA (*NPM1*), ni alteraciones en genes de vías de señalización (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS*). En las principales poblaciones de células leucémicas se observaron tanto mutaciones vinculadas a eventos más tempranos y hematopoyesis clonal, como alteraciones fundadoras de la enfermedad, que también están presentes en células no leucémicas más diferenciadas.
4. El aislamiento mediante separación celular de células con inmunofenotipo compatible con enfermedad residual medible es complejo por la escasa proporción de estas células que dificulta la extracción de ADN y, por lo tanto, los posteriores estudios moleculares. Se necesitan técnicas más sofisticadas para diseccionar genéticamente la ERM.
5. En pacientes en remisión completa en los que se aislaron diferentes poblaciones celulares de la médula ósea no se observaron alteraciones fundadoras de la leucemogénesis. Sin embargo, se detectaron alteraciones relacionadas con hematopoyesis clonal, las cuales podrían predisponer a la adquisición de mutaciones adicionales que condujesen de nuevo a la leucemogénesis.
6. La caracterización inmunofenotípica mediante citometría de flujo de la leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1* en la recaída permite identificar cambios



en los patrones inmunofenotípicos detectados al diagnóstico. Aunque las diferencias obtenidas no son significativas, el mantenimiento de las mutaciones iniciales sumado a la adquisición de otras nuevas (clon inicial con evolución) muestra una tendencia a presentar cambios en los patrones inmunofenotípicos, mientras que el mantenimiento de las mismas mutaciones del clon inicial (clon idéntico) parece predisponer a una mayor estabilidad inmunofenotípica.

7. La asociación entre los patrones inmunofenotípicos y los diferentes perfiles mutacionales podrían contribuir a determinar el pronóstico de los pacientes con LMA *NPM1*.
8. El estudio en paralelo de la enfermedad residual medible mediante citometría de flujo y RT-qPCR muestra una alta correlación, siendo más sensible el método molecular.
9. La citometría de flujo puede ser una técnica valiosa en aquellos pacientes con pérdida de *NPM1* en la recaída, ya que permite detectar clones leucémicos emergentes *NPM1* negativos. Son necesarios más estudios que permitan identificar aquellos casos en los que fuera necesaria la monitorización de la enfermedad residual mediante ambas técnicas.
10. Las técnicas que integren los datos inmunofenotípicos y moleculares, como la secuenciación de célula única, ayudarán a proporcionar información sobre la heterogeneidad y la dinámica de la evolución clonal de la leucemia mieloblástica aguda con mutación *NPM1* y, en consecuencia, podrán brindar el acceso al desarrollo de estrategias de tratamiento personalizadas, potenciando la optimización del manejo clínico y mejorando el pronóstico en este subgrupo de pacientes.

8.BIBLIOGRAFÍA

- Al-Mawali, A., Gillis, D., Hissaria, P., & Lewis, I. (2008). Incidence, Sensitivity, and Specificity of Leukemia-Associated Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia Using Specific Five-Color Multiparameter Flow Cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 129(6), 934-945. <https://doi.org/10.1309/FY0UMAMM91VPMR2W>
- Al-Mawali, A., Gillis, D., & Lewis, I. (2009). The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*, 131(1), 16-26. <https://doi.org/10.1309/AJCP5TSD3DZXFLCX>
- Alpermann, T., Schnittger, S., Eder, C., Dicker, F., Meggendorfer, M., Kern, W., Schmid, C., Aul, C., Staib, P., Wendtner, C.-M., Schmitz, N., Haferlach, C., & Haferlach, T. (2016). Molecular subtypes of NPM1 mutations have different clinical profiles, specific patterns of accompanying molecular mutations and varying outcomes in intermediate risk acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 101(2), e55-e58. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.133819>
- Angelini, D. F., Ottone, T., Guerrera, G., Lavorgna, S., Cittadini, M., Buccisano, F., De Bardi, M., Gargano, F., Maurillo, L., Divona, M., Noguera, N. I., Consalvo, M. I., Borsellino, G., Bernardi, G., Amadori, S., Venditti, A., Battistini, L., & Lo-Coco, F. (2015). A Leukemia-Associated CD34/CD123/CD25/CD99+ Immunophenotype Identifies *FLT3* -Mutated Clones in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 21(17), 3977-3985. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3186>
- Angenendt, L., Röllig, C., Montesinos, P., Martínez-Cuadrón, D., Barragan, E., García, R., Botella, C., Martínez, P., Ravandi, F., Kadia, T., Kantarjian, H. M., Cortes, J., Juliusson, G., Lazarevic, V., Höglund, M., Lehmann, S., Recher, C., Pigneux, A., Bertoli, S., ... Schliemann, C. (2019). Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts. *Journal of Clinical Oncology*, 37(29), 2632-2642. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00416>
- Arana-Rosainz, M. J., Nguyen, N., Wahed, A., Lelenwa, L. C., Aakash, N., Schaefer, K., Rios, A., Kanaan, Z., & Chen, L. (2021). Acute myeloid leukemia with mutated *NPM1* mimics acute promyelocytic leukemia presentation. *International Journal of Laboratory Hematology*, 43(2), 218-226. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13357>
- Batsivari, A., Grey, W., & Bonnet, D. (2021). Understanding of the crosstalk between normal residual hematopoietic stem cells and the leukemic niche in acute myeloid

leukemia. *Experimental Hematology*, 95, 23-30.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2021.01.004>

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M., & Flandrin, G. (1985). Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, 103(4), 620.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-4-620>

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias FRENCH -A MERICAN -B RITISH (FAB) C O-OPERATIVE G ROUP. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451-458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1991). Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British Journal of Haematology*, 78(3), 325-329.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb04444.x>

Bezerra, M. F., Lima, A. S., Piqué-Borràs, M.-R., Silveira, D. R., Coelho-Silva, J. L., Pereira-Martins, D. A., Weinhäuser, I., Franca-Neto, P. L., Quek, L., Corby, A., Oliveira, M. M., Lima, M. M., De Assis, R. A., De Melo Campos, P., Duarte, B. K., Bendit, I., Rocha, V., Rego, E. M., Traina, F., ... Lucena-Araujo, A. R. (2020). Co-occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis. *Blood*, 135(11), 870-875.
<https://doi.org/10.1182/blood.2019003339>

Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7).

Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., & Nigg, E. A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56(3), 379-390.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90241-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90241-9)

Brunetti, L., Gundry, M. C., & Goodell, M. A. (2019). New insights into the biology of acute myeloid leukemia with mutated NPM1. *International Journal of Hematology*, 110(2), 150-160. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-02578-7>

Bueno, C., Almeida, J., Lucio, P., Marco, J., García, R., de Pablos, J. M., Parreira, A., Ramos, F., Ruiz-Cabello, F., Suárez-Vilela, D., San Miguel, J. F., & Orfao, A.

- (2004). Incidence and characteristics of CD4+/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica*, 89(1), 58-69.
- Cappelli, L. V., Meggendorfer, M., Baer, C., Nadarajah, N., Kern, W., Haferlach, T., Haferlach, C., & Höllein, A. (2018). NPM1 Mutated AML Is Characterized By Pre-Leukemic Mutations and the Persistence and Acquisition of Co-Mutations in Molecular Remission Leads to Inferior Prognosis. *Blood*, 132(Supplement 1), 996. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-118286>
- Çelik, H., Lindblad, K. E., Popescu, B., Gui, G., Goswami, M., Valdez, J., DeStefano, C., Lai, C., Thompson, J., Ghannam, J. Y., Fantoni, G., Biancotto, A., Candia, J., Cheung, F., Sukumar, G., Dalgard, C. L., Smith, R. H., Larochele, A., Dillon, L. W., & Hourigan, C. S. (2020). Highly multiplexed proteomic assessment of human bone marrow in acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, 4(2), 367-379. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001124>
- Chou, W.-C., Lei, W.-C., Ko, B.-S., Hou, H.-A., Chen, C.-Y., Tang, J.-L., Yao, M., Tsay, W., Wu, S.-J., Huang, S.-Y., Hsu, S.-C., Chen, Y.-C., Chang, Y.-C., Kuo, K.-T., Lee, F.-Y., Liu, M.-C., Liu, C.-W., Tseng, M.-H., Huang, C.-F., & Tien, H.-F. (2011). The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 25(2), 246-253. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.267>
- Cocciardi, S., Dolnik, A., Kapp-Schwoerer, S., Rücker, F. G., Lux, S., Blätte, T. J., Skambraks, S., Krönke, J., Heidel, F. H., Schnöder, T. M., Corbacioglu, A., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Teleanu, V., Göhring, G., Thol, F., Heuser, M., Ganser, A., Weber, D., ... Döhner, K. (2019). Clonal evolution patterns in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation. *Nature Communications*, 10(1), 2031. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09745-2>
- Cui, W., Zhang, D., Cunningham, M. T., & Tilzer, L. (2014). Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: Changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *International Journal of Laboratory Hematology*, 36(6), 636-649. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12193>
- Debarri, H., Lebon, D., Roumier, C., Cheok, M., Marceau-Renaut, A., Nibourel, O., Geffroy, S., Helevaut, N., Rousselot, P., Gruson, B., Gardin, C., Chretien, M.-L., Sebda, S., Figeac, M., Berthon, C., Quesnel, B., Boissel, N., Castaigne, S., Dombret, H., ... Preudhomme, C. (2015). IDH1/2 but not DNMT3A mutations are

suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: A study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget*, 6(39), 42345. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5645>

Desai, P., Mencia-Trinchant, N., Savenkov, O., Simon, M. S., Cheang, G., Lee, S., Samuel, M., Ritchie, E. K., Guzman, M. L., Ballman, K. V., Roboz, G. J., & Hassane, D. C. (2018). Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nature Medicine*, 24(7), 1015-1023. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0081-z>

Dillon, R., Potter, N., Freeman, S., & Russell, N. (2021). How we use molecular minimal residual disease (MRD) testing in acute myeloid leukaemia (AML). *British Journal of Haematology*, 193(2), 231-244. <https://doi.org/10.1111/bjh.17185>

DiNardo, C. D., & Luger, S. M. (2012). Beyond morphology: Minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 1. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283501325>

Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., Ritchey, J. K., Young, M. A., Lamprecht, T., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Wallis, J. W., Lu, C., Shen, D., Harris, C. C., Dooling, D. J., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Chen, K., ... DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481(7382), 506-510. <https://doi.org/10.1038/nature10738>

Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H.-F., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4), 424-447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>

Döhner, H., Weber, D., Krzykalla, J., Fiedler, W., Kühn, M. W. M., Schroeder, T., Mayer, K., Lübbert, M., Wattad, M., Götze, K., Fransecky, L., Koller, E., Wulf, G., Schleicher, J., Ringhoffer, M., Greil, R., Hertenstein, B., Krauter, J., Martens, U. M., ... Ganser, A. (2023). Intensive chemotherapy with or without gemtuzumab ozogamicin in patients with NPM1-mutated acute myeloid leukaemia (AMLSCG 09–09): A randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Haematology*, 10(7), e495-e509. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(23\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(23)00089-3)

- Döhner, H., Wei, A. H., Appelbaum, F. R., Craddock, C., DiNardo, C. D., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Godley, L. A., Hasserjian, R. P., Larson, R. A., Levine, R. L., Miyazaki, Y., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G., Röllig, C., Sierra, J., Stein, E. M., Tallman, M. S., ... Löwenberg, B. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140(12), 1345-1377. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>
- Döhner, K., Schlenk, R. F., Habdank, M., Scholl, C., Rücker, F. G., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Fröhling, S., Döhner, H., & for the AML Study Group (AMLSG). (2005). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood*, 106(12), 3740-3746. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2164>
- Duncavage, E. J., Bagg, A., Hasserjian, R. P., DiNardo, C. D., Godley, L. A., Iacobucci, I., Jaiswal, S., Malcovati, L., Vannucchi, A. M., Patel, K. P., Arber, D. A., Arcila, M. E., Bejar, R., Berliner, N., Borowitz, M. J., Branford, S., Brown, A. L., Cargo, C. A., Döhner, H., ... Cazzola, M. (2022). Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 140(21), 2228-2247. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015853>
- Eckel, A. M., Cherian, S., Miller, V., & Soma, L. (2020). CD33 expression on natural killer cells is a potential confounder for residual disease detection in acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 98(2), 174-178. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21846>
- Eisfeld, A.-K., Kohlschmidt, J., Mims, A., Nicolet, D., Walker, C. J., Blachly, J. S., Carroll, A. J., Papaioannou, D., Kolitz, J. E., Powell, B. E., Stone, R. M., De La Chapelle, A., Byrd, J. C., Mrózek, K., & Bloomfield, C. D. (2020). Additional gene mutations may refine the 2017 European LeukemiaNet classification in adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged <60 years. *Leukemia*, 34(12), 3215-3227. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0872-3>
- Falini, B., Alcalay, M., Starza, R. L., Santucci, A., Pucciarini, A., Fazi, P., Saglio, G., & Pelicci, P.-G. (2005). Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*.
- Falini, B., Bolli, N., Jing, S., Martelli, M. P., Liso, A., Pucciarini, A., Bigerna, B., Pasqualucci, L., Mannucci, R., Rosati, R., Gorello, P., Diverio, D., Roti, G., Tiacci, R., ...

- E., Cazzaniga, G., Biondi, A., Schnittger, S., Haferlach, T., Hiddemann, W., ... Nicoletti, I. (2006). Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*, 107(11), 4514-4523. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4745>
- Falini, B., Bolli, N., Liso, A., Martelli, M. P., Mannucci, R., Pileri, S., & Nicoletti, I. (2009). Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: Molecular basis and clinical implications. *Leukemia*, 23(10), 1731-1743. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.124>
- Falini, B., Brunetti, L., Sportoletti, P., & Martelli, M. P. (2020). NPM1-mutated acute myeloid leukemia: From bench to bedside. *Blood*, 136(15), 1707-1721. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004226>
- Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M. F., & Mecucci, C. (2007). Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): Biologic and clinical features. *Blood*, 109(3), 874-885. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-012252>
- Fernandez, C., Santos-Silva, M. C., López, A., Matarraz, S., Jara-Acevedo, M., Ciudad, J., Gutierrez, M. L., Sánchez, M. L., Salvador-Osuna, C., Berrueto, M. J., Díaz-Arias, J. Á., Palomo-Hernández, A. M., Colado, E., González, N., Gallardo, D., Asensio, A., García-Sánchez, R., Saldaña, R., Cerveró, C., ... Orfao, A. (2013). Newly diagnosed adult AML and MPAL patients frequently show clonal residual hematopoiesis. *Leukemia*, 27(11), 2149-2156. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.109>
- Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Paiva, B., Puig, N., García-Sánchez, O., Böttcher, S., Van Der Velden, V. H. J., Pérez-Morán, J.-J., Vidriales, M.-B., García-Sanz, R., Jimenez, C., González, M., Martínez-López, J., Corral-Mateos, A., Grigore, G.-E., Fluxá, R., Pontes, R., Caetano, J., Sedek, L., ... Orfao, A. (2017). Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, 31(10), 2094-2103. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.29>
- Gaidzik, V. I., Weber, D., Paschka, P., Kaumanns, A., Krieger, S., Corbacioglu, A., Krönke, J., Kapp-Schwoerer, S., Krämer, D., Horst, H.-A., Schmidt-Wolf, I., Held, G., Kündgen, A., Ringhoffer, M., Götze, K., Kindler, T., Fiedler, W., Wattad, M., Schlenk, R. F., ... Döhner, K. (2018). DNMT3A mutant transcript levels persist in

- remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 32(1), 30-37. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.200>
- Gale, R. E., Green, C., Allen, C., Mead, A. J., Burnett, A. K., Hills, R. K., & Linch, D. C. (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 111(5), 2776-2784. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-109090>
- García-Álvarez, M., Yeguas, A., Jiménez, C., Medina-Herrera, A., González-Calle, V., Hernández-Ruano, M., Maldonado, R., Aires, I., Casquero, C., Sánchez-Villares, I., Balanzategui, A., Sarasquete, M. E., Alcoceba, M., Vidriales, M. B., González-Díaz, M., García-Sanz, R., & Chillón, M. C. (2023). Single-Cell DNA Sequencing and Immunophenotypic Profiling to Track Clonal Evolution in an Acute Myeloid Leukemia Patient. *Biomedicines*, 12(1), 66. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010066>
- Gener-Ricos, G., Bataller, A., Rodriguez-Sevilla, J. J., Chien, K. S., Quesada, A. E., Almanza-Huante, E., Hammond, D., Sasaki, K., DiNardo, C., Kadia, T., Daver, N., Borthakur, G., Issa, G. C., Short, N. J., Kanagal-Shamanna, R., Kantarjian, H. M., Garcia-Manero, G., & Montalban-Bravo, G. (2024). *NPM1* -mutated myeloid neoplasms are a unique entity not defined by bone marrow blast percentage. *Cancer*, 130(20), 3452-3462. <https://doi.org/10.1002/cncr.35433>
- Giupponi, C., Bertoli, D., Borlenghi, E., Cattaneo, C., Zollner, T., Masina, L., Bagnasco, S., Cerqui, E., Federico, F., Pagani, C., Archetti, S., Brugnani, D., Rossi, G., & Tucci, A. (2023). Myeloid neoplasm occurrence during stable molecular remission of NPM1-mutated AML: Are we facing secondary disease or AML relapse? *Blood Cancer Journal*, 13(1), 194. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00959-8>
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Grimwade, D., Ivey, A., & Huntly, B. J. P. (2016). Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*, 127(1), 29-41. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604496>
- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., & Pandolfi, P. P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 493-505. <https://doi.org/10.1038/nrc1885>

- Haferlach, C., Mecucci, C., Schnittger, S., Kohlmann, A., Mancini, M., Cuneo, A., Testoni, N., Rege-Cambrin, G., Santucci, A., Vignetti, M., Fazi, P., Martelli, M. P., Haferlach, T., & Falini, B. (2009). AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*, *114*(14), 3024-3032. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-197871>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanekamp, D., Bachas, C., van de Loosdrecht, A., Ossenkoppele, G., & Cloos, J. (2020). Re: Myeloblasts in normal bone marrows expressing leukaemia-associated immunophenotypes. *Pathology*, *52*(2), 289-291. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.021>
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., & Bloomfield, C. D. (1999). The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Annals of Oncology*, *10*(12), 1419-1432. <https://doi.org/10.1023/A:1008375931236>
- Hasserjian, R. P., Steensma, D. P., Graubert, T. A., & Ebert, B. L. (2020). Clonal hematopoiesis and measurable residual disease assessment in acute myeloid leukemia. *Blood*, *135*(20), 1729-1738. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004770>
- Hayun, M., Zaatra, M., Itzkovich, C., Sahar, D., Rosenberg, D., Filatova, M., Ringelstein-Harlev, S., Baris, H., Moustafa-Hawash, N., Louria-Hayon, I., & Ofran, Y. (2020). ERK Activity in Immature Leukemic Cells Drives Clonal Selection during Induction Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *Scientific Reports*, *10*(1), 8349. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65061-6>
- Heath, E. M., Chan, S. M., Minden, M. D., Murphy, T., Shlush, L. I., & Schimmer, A. D. (2017). Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*, *31*(4), 798-807. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.30>
- Herold, S., Sockel, K., Sayehli, C., Herbst, R., Dührsen, U., Oelschlägel, U., Böttner, A., Hindahl, H., Kullmer, J., Helas, S., Sauer, M., Mohr, B., Mies, A., Bornhäuser, M., Ehninger, G., Röllig, C., Thiede, C., & Platzbecker, U. (2017). Evolution of NPM1-

- negative therapy-related myelodysplastic syndromes following curative treatment of NPM1-mutant AML. *Leukemia*, 31(10), 2247-2251. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.217>
- Heuser, M., Freeman, S. D., Ossenkoppele, G. J., Buccisano, F., Hourigan, C. S., Ngai, L. L., Tetters, J. M., Bachas, C., Baer, C., Béné, M.-C., Bücklein, V., Czyz, A., Denys, B., Dillon, R., Feuring-Buske, M., Guzman, M. L., Haferlach, T., Han, L., Herzig, J. K., ... Cloos, J. (2021). 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: A consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*, 138(26), 2753-2767. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013626>
- Hirsch, P., Zhang, Y., Tang, R., Joulin, V., Boutroux, H., Pronier, E., Moatti, H., Flandrin, P., Marzac, C., Bories, D., Fava, F., Mokrani, H., Betems, A., Lorre, F., Favier, R., Féger, F., Mohty, M., Douay, L., Legrand, O., ... Delhommeau, F. (2016). Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nature Communications*, 7(1), 12475. <https://doi.org/10.1038/ncomms12475>
- Höllein, A., Meggendorfer, M., Dicker, F., Jeromin, S., Nadarajah, N., Kern, W., Haferlach, C., & Haferlach, T. (2018). NPM1 mutated AML can relapse with wild-type NPM1: Persistent clonal hematopoiesis can drive relapse. *Blood Advances*, 2(22), 3118-3125. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023432>
- Hou, H.-A., Kuo, Y.-Y., Liu, C.-Y., Chou, W.-C., Lee, M. C., Chen, C.-Y., Lin, L.-I., Tseng, M.-H., Huang, C.-F., Chiang, Y.-C., Lee, F.-Y., Liu, M.-C., Liu, C.-W., Tang, J.-L., Yao, M., Huang, S.-Y., Ko, B.-S., Hsu, S.-C., Wu, S.-J., ... Tien, H.-F. (2012). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: Stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*, 119(2), 559-568. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-369934>
- Ivey, A., Hills, R. K., Simpson, M. A., Jovanovic, J. V., Gilkes, A., Grech, A., Patel, Y., Bhudia, N., Farah, H., Mason, J., Wall, K., Akiki, S., Griffiths, M., Solomon, E., McCaughan, F., Linch, D. C., Gale, R. E., Vyas, P., Freeman, S. D., ... Grimwade, D. (2016). Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *New England Journal of Medicine*, 374(5), 422-433. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507471>
- Jongen-Lavrencic, M., Grob, T., Hanekamp, D., Kavelaars, F. G., Al Hinai, A., Zeilemaker, A., Erpelinck-Verschueren, C. A. J., Gradowska, P. L., Meijer, R.,

Cloos, J., Biemond, B. J., Graux, C., Van Marwijk Kooy, M., Manz, M. G., Pabst, T., Passweg, J. R., Havelange, V., Ossenkoppele, G. J., Sanders, M. A., ... Valk, P. J. M. (2018). Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 378(13), 1189-1199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716863>

Kalina, T., Flores-Montero, J., Lecrevisse, Q., Pedreira, C. E., Van Der Velden, V. H. J., Novakova, M., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Böttcher, S., Karsch, D., Sędek, Ł., Trinquand, A., Boeckx, N., Caetano, J., Asnafi, V., Lucio, P., Lima, M., Helena Santos, A., Bonaccorso, P., ... Orfao, A. (2015). Quality assessment program for E uro F low protocols: Summary results of four-year (2010–2013) quality assurance rounds. *Cytometry Part A*, 87(2), 145-156. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22581>

Kalina, T., Flores-Montero, J., Van Der Velden, V. H. J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonça, A., De Tute, R., Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M. B., Pérez, J. J., Te Marvelde, J. G., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Szczepański, T., Van Dongen, J. J. M., ... on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26(9), 1986-2010. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>

Kern, W., Bacher, U., Haferlach, C., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2010). The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 23(3), 379-390. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2010.06.007>

Khoury, J. D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J. F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J. K. C., Chen, W., Chen, X., Chng, W.-J., Choi, J. K., Colmenero, I., Coupland, S. E., Cross, N. C. P., De Jong, D., Elghetany, M. T., ... Hochhaus, A. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1703-1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>

Krönke, J., Bullinger, L., Teleanu, V., Tschürtz, F., Gaidzik, V. I., Kühn, M. W. M., Rücker, F. G., Holzmann, K., Paschka, P., Kapp-Schwörer, S., Späth, D., Kindler, T., Schittenhelm, M., Krauter, J., Ganser, A., Göhring, G., Schlegelberger, B., Schlenk, R. F., Döhner, H., & Döhner, K. (2013). Clonal evolution in relapsed

- NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*, 122(1), 100-108. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-479188>
- Krönke, J., Schlenk, R. F., Jensen, K.-O., Tschürtz, F., Corbacioglu, A., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Onken, S., Eiwen, K., Habdank, M., Späth, D., Lübbert, M., Wattad, M., Kindler, T., Salih, H. R., Held, G., Nachbaur, D., Von Lilienfeld-Toal, M., Germing, U., ... Döhner, K. (2011). Monitoring of Minimal Residual Disease in *NPM1* -Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Study From the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 29(19), 2709-2716. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.0371>
- Li, W., Morgan, R., Nieder, R., Truong, S., Habeebu, S. S. M., & Ahmed, A. A. (2021). Normal or reactive minor cell populations in bone marrow and peripheral blood mimic minimal residual leukemia by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 100(5), 590-601. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21968>
- Liu, J., Jiang, P., Lu, Z., Yu, Z., & Qian, P. (2024). Decoding leukemia at the single-cell level: Clonal architecture, classification, microenvironment, and drug resistance. *Experimental Hematology & Oncology*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00479-6>
- Liu, Y.-R., Zhu, H.-H., Ruan, G.-R., Qin, Y.-Z., Shi, H.-X., Lai, Y.-Y., Chang, Y., Wang, Y.-Z., Lu, D., Hao, L., Li, J.-L., Li, L.-D., Jiang, B., & Huang, X.-J. (2013). NPM1-mutated acute myeloid leukemia of monocytic or myeloid origin exhibit distinct immunophenotypes. *Leukemia Research*, 37(7), 737-741. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.03.009>
- Loghavi, S., DiNardo, C. D., Furudate, K., Takahashi, K., Tanaka, T., Short, N. J., Kadia, T., Konopleva, M., Kanagal-Shamanna, R., Farnoud, N. R., Pierce, S., Khoury, J. D., Jorgensen, J. L., Patel, K. P., Daver, N., Yilmaz, M., Medeiros, L. J., Kantarjian, H., Ravandi, F., & Wang, S. A. (2021). Flow cytometric immunophenotypic alterations of persistent clonal haematopoiesis in remission bone marrows of patients with *NPM1* -mutated acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 192(6), 1054-1063. <https://doi.org/10.1111/bjh.17347>
- Lopez, A., Patel, S., Geyer, J. T., Racchumi, J., Chadburn, A., Simonson, P., Ouseph, M. M., Inghirami, G., Mencia-Trinchant, N., Guzman, M. L., Gomez-Arteaga, A., Lee, S., Desai, P., Ritchie, E. K., Roboz, G. J., Tam, W., & Kluk, M. J. (2021). Comparison of Multiple Clinical Testing Modalities for Assessment of NPM1-

Mutant AML. *Frontiers in Oncology*, 11, 701318.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.701318>

Martelli, M. P., Pettirossi, V., Thiede, C., Bonifacio, E., Mezzasoma, F., Cecchini, D., Pacini, R., Tabarrini, A., Ciurnelli, R., Gionfriddo, I., Manes, N., Rossi, R., Giunchi, L., Oelschlägel, U., Brunetti, L., Gemei, M., Delia, M., Specchia, G., Liso, A., ... Falini, B. (2010). CD34+ cells from AML with mutated NPM1 harbor cytoplasmic mutated nucleophosmin and generate leukemia in immunocompromised mice. *Blood*, 116(19), 3907-3922.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238899>

Martínez-Cuadrón, D., Serrano, J., Gil, C., Tormo, M., Martínez-Sánchez, P., Pérez-Simón, J. A., García-Boyero, R., Rodríguez-Medina, C., López-Pavía, M., Benavente, C., Bergua, J., Lavilla-Rubira, E., Amigo, M. L., Herrera, P., Alonso-Domínguez, J. M., Bernal, T., Colorado, M., Sayas, M. J., Algarra, L., ... Montesinos, P. (2021). Evolving treatment patterns and outcomes in older patients (≥60 years) with AML: Changing everything to change nothing? *Leukemia*, 35(6), 1571-1585. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01058-4>

Martínez-Losada, C., Serrano-López, J., Serrano-López, J., Noguera, N. I., Garza, E., Piredda, L., Lavorgna, S., Consalvo, M. A. I., Ottone, T., Alfonso, V., Peinado, J. R., Garcia-Ortiz, M. V., Morales-Ruiz, T., Jérez, A., Hurtado, A. M., Montesinos, P., Cervera, J., Such, E., Ibañez, M., ... Sánchez-García, J. (2018). Clonal genetic evolution at relapse of favorable-risk acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation is associated with phenotypic changes and worse outcomes. *Haematologica*, 103(9), e400-e403.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188433>

Martín-Martín, L., Almeida, J., Hernández-Campo, P. M., Sánchez, M. L., Lécresse, Q., & Orfao, A. (2009). Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion*, 49(8), 1692-1708.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02170.x>

Mason, E. F., Hasserjian, R. P., Aggarwal, N., Seegmiller, A. C., & Pozdnyakova, O. (2019). Blast phenotype and comutations in acute myeloid leukemia with mutated NPM1 influence disease biology and outcome. *Blood Advances*, 3(21), 3322-3332. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000328>

- Mason, E. F., Kuo, F. C., Hasserjian, R. P., Seegmiller, A. C., & Pozdnyakova, O. (2018). A distinct immunophenotype identifies a subset of *NPM1* -mutated AML with *TET2* or *IDH1/2* mutations and improved outcome. *American Journal of Hematology*, 93(4), 504-510. <https://doi.org/10.1002/ajh.25018>
- Matarraz, S., Almeida, J., Flores-Montero, J., Lécresse, Q., Guerri, V., López, A., Bárrera, S., Van Der Velden, V. H. J., Te Marvelde, J. G., Van Dongen, J. J. M., & Orfao, A. (2017). Introduction to the diagnosis and classification of monocytic-lineage leukemias by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 92(3), 218-227. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21219>
- Matarraz, S., Leoz, P., Yeguas-Bermejo, A., Van Der Velden, V., Bras, A. E., Sánchez Gallego, J. I., Lécresse, Q., Ayala-Bueno, R., Teodosio, C., Criado, I., González-González, M., Flores-Montero, J., Avendaño, A., Vidriales, M. B., Chillón, M. C., González, T., García-Sanz, R., Prieto Conde, M. I., Villamor, N., ... Orfao, A. (2023). Baseline immunophenotypic profile of bone marrow leukemia cells in acute myeloid leukemia with nucleophosmin-1 gene mutation: A EuroFlow study. *Blood Cancer Journal*, 13(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00909-4>
- Matarraz, S., López, A., Barrena, S., Fernandez, C., Jensen, E., Flores-Montero, J., Rasillo, A., Sayagues, J. M., Sánchez, M. L., Bárcena, P., Hernandez-Rivas, J. M., Salvador, C., Fernandez-Mosteirín, N., Giralt, M., Perdiguier, L., Laranjeira, P., Paiva, A., & Orfao, A. (2010). Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: A pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78B(3), 154-168. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20513>
- Mauvieux, Delabesse, Bourquelot, Radford-Weiss, Bennaceur, Flandrin, Valensi, & Macintyre. (1999). NG2 expression in MLL rearranged acute myeloid leukaemia is restricted to monoblastic cases. *British Journal of Haematology*, 107(3), 674-676. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01730.x>
- McGowan-Jordan, J., Hastings, R., & Moore, S. (2020). *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. Basel: Karger.
- McGowan-Jordan, J., Simons, A., & Schmid, M. (2016). *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. Basel: Karger.

- Mer, A. S., Heath, E. M., Madani Tonekaboni, S. A., Dogan-Artun, N., Nair, S. K., Murison, A., Garcia-Prat, L., Shlush, L., Hurren, R., Voisin, V., Bader, G. D., Nislow, C., Rantalainen, M., Lehmann, S., Gower, M., Guidos, C. J., Lupien, M., Dick, J. E., Minden, M. D., ... Haibe-Kains, B. (2021). Biological and therapeutic implications of a unique subtype of NPM1 mutated AML. *Nature Communications*, 12(1), 1054. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21233-0>
- Miles, L. A., Bowman, R. L., Merlinsky, T. R., Csete, I. S., Ooi, A. T., Durruthy-Durruthy, R., Bowman, M., Famulare, C., Patel, M. A., Mendez, P., Ainali, C., Demaree, B., Delley, C. L., Abate, A. R., Manivannan, M., Sahu, S., Goldberg, A. D., Bolton, K. L., Zehir, A., ... Levine, R. L. (2020). Single cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature*, 587(7834), 477. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2864-x>
- Mitrea, D. M., Cika, J. A., Stanley, C. B., Nourse, A., Onuchic, P. L., Banerjee, P. R., Phillips, A. H., Park, C.-G., Deniz, A. A., & Kriwacki, R. W. (2018). Self-interaction of NPM1 modulates multiple mechanisms of liquid–liquid phase separation. *Nature Communications*, 9(1), 842. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03255-3>
- Morita, K., Wang, F., Jahn, K., Hu, T., Tanaka, T., Sasaki, Y., Kuipers, J., Loghavi, S., Wang, S. A., Yan, Y., Furudate, K., Matthews, J., Little, L., Gumbs, C., Zhang, J., Song, X., Thompson, E., Patel, K. P., Bueso-Ramos, C. E., ... Takahashi, K. (2020). Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nature Communications*, 11(1), 5327. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19119-8>
- Nachmani, D., Bothmer, A. H., Grisendi, S., Mele, A., Bothmer, D., Lee, J. D., Monteleone, E., Cheng, K., Zhang, Y., Bester, A. C., Guzzetti, A., Mitchell, C. A., Mendez, L. M., Pozdnyakova, O., Sportoletti, P., Martelli, M.-P., Vulliamy, T. J., Safra, M., Schwartz, S., ... Pandolfi, P. P. (2019). Germline NPM1 mutations lead to altered rRNA 2'-O-methylation and cause dyskeratosis congenita. *Nature Genetics*, 51(10), 1518-1529. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0502-z>
- Nomdedeu, J., Bussaglia, E., Villamor, N., Martinez, C., Esteve, J., Tormo, M., Estivill, C., Queipo, M. P., Guardia, R., Carricondo, M., Hoyos, M., Llorente, A., Juncà, J., Gallart, M., Domingo, A., Bargay, J., Mascaró, M., Moraleda, J. M., Florensa, L., ... Sierra, J. (2011). Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: Prognostic impact of the leukemic compartment size. *Leukemia Research*, 35(2), 163-168. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.05.015>

- Nowell, P. C. (1976). The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations: Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science*, 194(4260), 23-28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Ok, C. Y., Loghavi, S., Sui, D., Wei, P., Kanagal-Shamanna, R., Yin, C. C., Zuo, Z., Routbort, M. J., Tang, G., Tang, Z., Jorgensen, J. L., Luthra, R., Ravandi, F., Kantarjian, H. M., DiNardo, C. D., Medeiros, L. J., Wang, S. A., & Patel, K. P. (2019). Persistent IDH1/2 mutations in remission can predict relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 104(2), Article 2. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.191148>
- Onecha, E., Rapado, I., Morales, M. L., Carreño-Tarragona, G., Pilar Martinez-Sanchez, José María Sánchez Pina, Miguel Gallardo, Joaquín Martínez-López, & Rosa Ayala. (2020). Monitoring of clonal evolution of acute myeloid leukemia identifies the leukemia subtype, clinical outcome and potential new drug targets for post-remission strategies or relapse. *Haematologica*, 106(9), 2325-2333. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.254623>
- Orfao, A., Matarraz, S., Pérez-Andrés, M., Almeida, J., Teodosio, C., Berkowska, M. A., & Van Dongen, J. J. M. (2019). Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. *Journal of Immunological Methods*, 475, 112684. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112684>
- Ossenkoppele, G. J., Van De Loosdrecht, A. A., & Schuurhuis, G. J. (2011). Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *British Journal of Haematology*, 153(4), 421-436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08595.x>
- Paiva, B., Vidriales, M.-B., Sempere, A., Tarín, F., Colado, E., Benavente, C., Cedena, M.-T., Sánchez, J., Caballero-Velazquez, T., Cordon, L., Garces, J.-J., Simoes, C., Martínez-Cuadrón, D., Bernal, T., Botella, C., Grille, S., Serrano, J., Rodríguez-Medina, C., Algarra, L., ... PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study group. (2021). Impact of measurable residual disease by decentralized flow cytometry: A PETHEMA real-world study in 1076 patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 35(8), 2358-2370. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01126-3>
- Patel, J. L., Schumacher, J. A., Frizzell, K., Sorrells, S., Shen, W., Clayton, A., Jattani, R., & Kelley, T. W. (2017). Coexisting and cooperating mutations in NPM1 -

- mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 56, 7-12.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.01.027>
- Patel, S. S. (2024). *NPM1*-Mutated Acute Myeloid Leukemia: Recent Developments and Open Questions. *Pathobiology*, 91(1), 18-29. <https://doi.org/10.1159/000530253>
- Pettersson, L., Chen, Y., George, A. M., Rigo, R., Lazarevic, V., Juliusson, G., Saal, L. H., & Ehinger, M. (2020). Subclonal patterns in follow-up of acute myeloid leukemia combining whole exome sequencing and ultrasensitive IBSAFE digital droplet analysis. *Leukemia & Lymphoma*, 61(9), 2168-2179.
<https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1755855>
- Pettersson, L., Levéen, P., Axler, O., Dvorakova, D., Juliusson, G., & Ehinger, M. (2016). Improved minimal residual disease detection by targeted quantitative polymerase chain reaction in *Nucleophosmin 1* type a mutated acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 55(10), 750-766.
<https://doi.org/10.1002/gcc.22375>
- Potter, N., Miraki-Moud, F., Ermini, L., Titley, I., Vijayaraghavan, G., Papaemmanuil, E., Campbell, P., Gribben, J., Taussig, D., & Greaves, M. (2019). Single cell analysis of clonal architecture in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 33(5), 1113-1123.
<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0319-2>
- Rafei, H., & DiNardo, C. D. (2019). Hereditary myeloid malignancies. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 32(2), 163-176.
<https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.05.001>
- Sargas, C., Ayala, R., Larráyoz, M. J., Chillón, M. C., Carrillo-Cruz, E., Bilbao-Sieyro, C., Prados de la Torre, E., Martínez-Cuadrón, D., Rodríguez-Veiga, R., Boluda, B., Gil, C., Bernal, T., Bergua, J. M., Algarra, L., Tormo, M., Martínez-Sánchez, P., Soria, E., Serrano, J., Alonso-Domínguez, J. M., ... On, B. O. P. G. (2023). Molecular Landscape and Validation of New Genomic Classification in 2668 Adult AML Patients: Real Life Data from the PETHEMA Registry. *Cancers*, 15(2), 438.
<https://doi.org/10.3390/cancers15020438>
- Sasaki, K., Ravandi, F., Kadia, T. M., DiNardo, C. D., Short, N. J., Borthakur, G., Jabbour, E., & Kantarjian, H. M. (2021). De novo acute myeloid leukemia: A population-based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, 1980 to 2017. *Cancer*, 127(12), 2049-2061. <https://doi.org/10.1002/cncr.33458>

- Schnittger, S., Haferlach, C., Ulke, M., Alpermann, T., Kern, W., & Haferlach, T. (2010). IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood*, 116(25), 5486-5496. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-267955>
- Schuurhuis, G. J., Heuser, M., Freeman, S., Béné, M.-C., Buccisano, F., Cloos, J., Grimwade, D., Haferlach, T., Hills, R. K., Hourigan, C. S., Jorgensen, J. L., Kern, W., Lacombe, F., Maurillo, L., Preudhomme, C., Van Der Reijden, B. A., Thiede, C., Venditti, A., Vyas, P., ... Ossenkoppele, G. J. (2018). Minimal/measurable residual disease in AML: A consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*, 131(12), 1275-1291. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-801498>
- Scott, D. D., & Oeffinger, M. (2016). Nucleolin and nucleophosmin: Nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(5), 419-432. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0068>
- Shaffer, L., Slovak, M., & Campbell, L. (2013). *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger.
- Shlush, L. I., Mitchell, A., Heisler, L., Abelson, S., Ng, S. W. K., Trotman-Grant, A., Medeiros, J. J. F., Rao-Bhatia, A., Jaciw-Zurakowsky, I., Marke, R., McLeod, J. L., Doedens, M., Bader, G., Voisin, V., Xu, C., McPherson, J. D., Hudson, T. J., Wang, J. C. Y., Minden, M. D., & Dick, J. E. (2017). Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*, 547(7661), 104-108. <https://doi.org/10.1038/nature22993>
- Shlush, L. I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W. C., Brandwein, J. M., Gupta, V., Kennedy, J. A., Schimmer, A. D., Schuh, A. C., Yee, K. W., McLeod, J. L., Doedens, M., Medeiros, J. J. F., Marke, R., Kim, H. J., Lee, K., McPherson, J. D., Hudson, T. J., Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, T. H., ... Dick, J. E. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, 506(7488), 328-333. <https://doi.org/10.1038/nature13038>
- Short, N. J., Zhou, S., Fu, C., Berry, D. A., Walter, R. B., Freeman, S. D., Hourigan, C. S., Huang, X., Nogueras Gonzalez, G., Hwang, H., Qi, X., Kantarjian, H., & Ravandi, F. (2020). Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and

Meta-analysis. *JAMA Oncology*, 6(12), 1890.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.4600>

Sommer, U., Eck, S., Marszalek, L., Stewart, J. J., Bradford, J., McCloskey, T. W., Green, C., Vitaliti, A., Oldaker, T., & Litwin, V. (2021). High-sensitivity flow cytometric assays: Considerations for design control and analytical validation for identification of Rare events. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 100(1), 42-51. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21949>

Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., & Thiele, J. (2017). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press.

Taussig, D. C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S. G., Lister, T. A., Gribben, J. G., & Bonnet, D. (2010). Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood*, 115(10), 1976-1984. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206565>

Terwijn, M., Zeijlemaker, W., Kelder, A., Rutten, A. P., Snel, A. N., Scholten, W. J., Pabst, T., Verhoef, G., Löwenberg, B., Zweegman, S., Ossenkoppele, G. J., & Schuurhuis, G. J. (2014). Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE*, 9(9), e107587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107587>

Tettero, J. M., Freeman, S., Buecklein, V., Venditti, A., Maurillo, L., Kern, W., Walter, R. B., Wood, B. L., Roumier, C., Philippé, J., Denys, B., Jorgensen, J. L., Bene, M. C., Lacombe, F., Plesa, A., Guzman, M. L., Wierzbowska, A., Czyz, A., Ngai, L. L., ... Buccisano, F. (2022). Technical Aspects of Flow Cytometry-based Measurable Residual Disease Quantification in Acute Myeloid Leukemia: Experience of the European LeukemiaNet MRD Working Party. *HemaSphere*, 6(1), e676. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000676>

Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., & Ehninger, G. (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 107(10), 4011-4020. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3167>

Travaglini, S., Angelini, D. F., Alfonso, V., Guerrero, G., Lavorgna, S., Divona, M., Nardoza, A. M., Consalvo, M. I., Fabiani, E., De Bardi, M., Neri, B., Forghieri,

- F., Marchesi, F., Paterno, G., Cerretti, R., Barragan, E., Fiori, V., Dominici, S., Del Principe, M. I., ... Ottone, T. (2020). Characterization of FLT3-ITDmut acute myeloid leukemia: Molecular profiling of leukemic precursor cells. *Blood Cancer Journal*, 10(8), 85. <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00352-9>
- Trumpp, A., & Haas, S. (2022). Cancer stem cells: The adventurous journey from hematopoietic to leukemic stem cells. *Cell*, 185(8), 1266-1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.025>
- Van Der Pan, K., De Bruin-Versteeg, S., Damasceno, D., Hernández-Delgado, A., Van Der Sluijs-Gelling, A. J., Van Den Bossche, W. B. L., De Laat, I. F., Díez, P., Naber, B. A. E., Diks, A. M., Berkowska, M. A., De Mooij, B., Groenland, R. J., De Bie, F. J., Khatri, I., Kassem, S., De Jager, A. L., Louis, A., Almeida, J., ... Teodosio, C. (2022). Development of a standardized and validated flow cytometry approach for monitoring of innate myeloid immune cells in human blood. *Frontiers in Immunology*, 13, 935879. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.935879>
- Van Dongen, J. J. M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., Van Der Velden, V. H. J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., De Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A. W., Mendonça, A., ... on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908-1975. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>
- van Gils, N., Denkers, F., & Smit, L. (2021). Escape From Treatment; the Different Faces of Leukemic Stem Cells and Therapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.659253>
- Vardiman, J. W., Harris, N. L., & Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), 2292-2302. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1199>
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., & Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-951. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>

- Venditti, A., Piciocchi, A., Candoni, A., Melillo, L., Calafiore, V., Cairoli, R., De Fabritiis, P., Storti, G., Salutari, P., Lanza, F., Martinelli, G., Luppi, M., Mazza, P., Martelli, M. P., Cuneo, A., Albano, F., Fabbiano, F., Tafuri, A., Chierichini, A., ... Amadori, S. (2019). GIMEMA AML1310 trial of risk-adapted, MRD-directed therapy for young adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood*, *134*(12), 935-945. <https://doi.org/10.1182/blood.2018886960>
- Vidriales, M. B., San-Miguel, J. F., Orfao, A., Coustan-Smith, E., & Campana, D. (2003). Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, *16*(4), 599-612. [https://doi.org/10.1016/S1521-6926\(03\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S1521-6926(03)00067-7)
- Vosberg, S., & Greif, P. A. (2019). Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *58*(12), 839-849. <https://doi.org/10.1002/gcc.22806>
- Wang, S. A., Jorgensen, J. L., Hu, S., Jia, F., Li, S., Loghavi, S., Ok, C. Y., Thakral, B., Xu, J., Medeiros, L. J., & Wang, W. (2023). Validation of a 12-color flow cytometry assay for acute myeloid leukemia minimal/measurable residual disease detection. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *104*(5), 356-366. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.22140>
- Westers, T. M., Cremers, E. M. P., Oelschlaegel, U., Johansson, U., Bettelheim, P., Matarraz, S., Orfao, A., Moshaver, B., Brodersen, L. E., Loken, M. R., Wells, D. A., Subirá, D., Cullen, M., Te Marvelde, J. G., Van Der Velden, V. H. J., Preijers, F. W. M. B., Chu, S.-C., Feuillard, J., Guérin, E., ... Van De Loosdrecht, A. A. (2017). Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. *Haematologica*, *102*(2), 308-319. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.147835>
- Yao, Y., Zhou, Y., Zhuo, N., Xie, W., Meng, H., Lou, Y., Mao, L., Tong, H., Qian, J., Yang, M., Yu, W., Zhou, D., Jin, J., & Wang, H. (2024). Co-mutation landscape and its prognostic impact on newly diagnosed adult patients with NPM1-mutated de novo acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, *14*(1), 1-5. <https://doi.org/10.1038/s41408-024-01103-w>
- Zeijlemaker, W., Kelder, A., Wouters, R., Valk, P. J. M., Witte, B. I., Cloos, J., Ossenkoppele, G. J., & Schuurhuis, G. J. (2015). Absence of leukaemic CD 34⁺ cells in acute myeloid leukaemia is of high prognostic value: A longstanding

controversy deciphered. *British Journal of Haematology*, 171(2), 227-238.
<https://doi.org/10.1111/bjh.13572>

Zhou, Y., Moon, A., Hoyle, E., Fromm, J. R., Chen, X., Soma, L., Salipante, S. J., Wood, B. L., & Wu, D. (2019). Pattern associated leukemia immunophenotypes and measurable disease detection in acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome with mutated *NPM1*. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 96(1), 67-72. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21744>