

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular



ESTUDIO GENÓMICO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

TESIS DOCTORAL

JAVIER SUELA RUBIO

Madrid, 2008

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular



ESTUDIO GENÓMICO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Tesis doctoral presentada por Javier Suela Rubio,
Licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor.

Directores

Dr. Juan C. Cigudosa
Jefe de Grupo

Dra. Sara Álvarez de Andres
Investigador

**Grupo de Citogenética Molecular
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)**

Madrid, 2008



Grupo de Citogenética Molecular

El Dr. Juan C Cigudosa, Jefe del Grupo de Citogenética Molecular del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), y la Dra. Sara Álvarez, Investigadora del mismo grupo, como directores

CERTIFICAN:

Que Don Javier Suela Rubio ha realizado el presente trabajo: “**Estudio Genómico de la Leucemia Mieloide Aguda.**” que a nuestro juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biología**, a cuyos efectos será presentado en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste se extiende el presente certificado.

Madrid, 2008.

Dr. Juan C Cigudosa

Dra. Sara Álvarez de Andrés

Así mismo, la Dra. Mercedes Robledo, Profesora Honoraria de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefa del Grupo de Cáncer Endocrino del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), como tutora, da el visto bueno a su presentación y defensa.

Vº Bº

Dra. Mercedes Robledo Batanera

Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda del “Programa nacional de formación de profesorado universitario (FPU)” del Ministerio de Educación y Ciencia.

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en
nuestros genes.”*

James D. Watson

“No está en nuestros genes”

Richard C. Lewontin

AGRADECIMIENTOS

Siempre creí que sería fácil comenzar esta sección; sin embargo, creo que ha sido la más difícil de completar para mí. La sección de agradecimientos implica recordar todos los momentos pasados en un proceso que ha durado aproximadamente cinco años. Y siento que nunca podré agradecer lo suficiente a la gente que me ha acompañado en este tiempo que hemos compartido. A todos vosotros, os pido perdón por este burdo intento de agradecer vuestra ayuda, de una u otra manera.

Ha pasado tiempo, bastante, desde que comencé este loco sueño de realizar una tesis doctoral. Aún recuerdo cuando, lleno de ilusión, fui admitido en el año 2001 por Eduardo Martínez Naves en su laboratorio de Inmunología en la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid. Nunca podré agradecerle lo suficiente su fe en mí y, en el momento de mi marcha, el respeto que guardó para con mi decisión. A él y a todos los profesores, compañeros y amigos que allí dejé les doy mil gracias de sincero corazón. Muchos ya no están allí, pero siempre les identificaré con ese lugar.

Tras ese comienzo, fallido por una parte y exitoso por otra, recalé en el año 2005 en el laboratorio de Juan Cruz Cigudosa, en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, al que le agradezco con mucho aprecio su tutela en este trabajo, su confianza en mí en el trabajo que hemos realizado y, especialmente, su paternal modo de guiarme en este largo camino (con mucha más mano izquierda de lo que se supondría hacia un cabezota como yo). Siempre recordaré con cariño el que ha sido mi laboratorio, el grupo de Citogenética molecular. A todos os agradezco eternamente aguantar mis quejas, que han sido a veces muchas, aunque espero que recordéis los buenos momentos también, como yo lo haré siempre. Brevemente, gracias de corazón a Sara (sobre todo por la parte que le toca en este manuscrito y por tratarme con tanto cariño), Sandra (por impedir que repitiera la misma PCR hasta el día de hoy y por aportarme tu alegría en estos últimos momentos de la tesis), Mamen (por enseñarme a cariotipar de todo, o casi y por los muchos *hobbies* compartidos), Carmen (por enseñarme a ver dos señales y cuando eran dos señales y por tu amistad), Miguel (el equipo RACE se despide, pero nunca se olvida), Gloria (por los experimentos más arriesgados, desde Celgene hasta la “biotecnología avanzada”), Francesco (por tu accesibilidad para ayudarme, pero especialmente por los momentos compartidos en el *tea time*), Alba (ahora te toca a ti, espero que tu camino por este mundillo sea tan feliz como el

mío) y por último, a Bibiana (por no dejar que fuera un completo desastre en el laboratorio y contagiarme de su maravillosa forma de ser). Dentro de esta “familia” me gustaría incluir también a gente que fue parte del laboratorio y que me ayudó en este trabajo: David, Sergio, Carol y Cristina. Y a Filipe, que aunque no es del laboratorio, ¡parece de él!

Quiero también agradecer su ayuda al resto del programa de Genética Humana, especialmente al director del programa, Javier Benítez, a Mercedes Robledo (mi tutora), a Miguel Urioste, Fátima, Anna, Guille, Tais, Charo, Roger, Alicia, Ricardo... (la lista es muy larga, pero os lo agradezco a todos). Dentro de ese programa quiero recordar especialmente a mis amigos Loren y Juanma (Ross), con los que he compartido algunos de los mejores momentos de mi vida (*Stormbringer Ruler!* y cosas por el estilo, ¡ya sabéis!).

No quisiera olvidarme en estas felicitaciones y agradecimientos de mis amigos de Talavera y del Tora, por el hecho de que siempre han estado a mi lado, en los momentos fáciles y los difíciles.

Esta tesis, además, tiene una parte personal muy importante. Creo que he vertido mucha pasión, mucha emoción en este trabajo. Por ello, agradezco a mi familia el hecho de haberme acompañado en este viaje, a su apoyo y al hecho de haberme educado tal como soy. Gracias a la familia Suela por cederme parte de su firmeza y fortaleza de espíritu, así como un carácter discutidor tan propio de nosotros (gracias, tíos), a la familia Rubio por su carácter emprendedor, dinámico y cálido (¡gracias a todos!), y a la familia Asensio Villanueva por aceptarme como uno de ellos. En especial, gracias a mi hermano Eduardo: estoy seguro que esta memoria te ha hecho sentirte muy orgulloso; y a mi madre, Rosario, por ser como eres y haberme dado la confianza para trabajar en lo que creo. Finalmente, quiero agradecer a Virginia su dedicación, su paciencia y su día a día. Ella tiene gran parte de culpa de que haya conseguido terminar esta tesis, y espero que tenga esa misma culpa en todos los proyectos que nos quedan por emprender (que van a ser muchos y por mucho tiempo, no me cabe duda).

En un último párrafo quiero dedicar este trabajo a la memoria de Urbano Suela, cuyo ejemplo de vida me hizo seguir hacia delante y convertirme en lo que soy. Tu recuerdo y tu manera de enfocar tu enfermedad me ha acompañado todo este tiempo, y me ha hecho plantearme este trabajo desde otra perspectiva, más activa y más personal de la que nunca hubiera pensado jamás.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
Abreviaturas	XI
Relación de tablas	XV
Relación de figuras	XVII
Abstract	XIX
Resumen	XXIII
INTRODUCCIÓN	1
1. El cáncer es una enfermedad genética.	3
2. Las enfermedades mieloides.	5
2.1. Clasificación de las enfermedades mieloides.	7
3. La leucemia mieloide aguda.	7
3.1. Sistemas de clasificación de la LMA.....	8
3.1.1. LMA mínimamente o no diferenciada (M0).	9
3.1.2. LMA sin maduración (M1).....	10
3.1.3. LMA con maduración (M2)	10
3.1.4. Leucemia promielocítica aguda (M3)	10
3.1.5. Leucemia mielomonocítica aguda (M4)	11
3.1.6. Leucemia monocítica aguda (M5)	11
3.1.7. Leucemia eritrocítica aguda o eritroleucemia (M6)	11
3.1.8. Leucemia megacariocítica aguda (M7)	12
3.2. La citogenética en la leucemia mieloide aguda	12

3.2.1. Grupo de riesgo favorable.	14
3.2.1.1. LMA con t(15;17)(q22;q21): leucemia promielocítica aguda (LPA).	14
3.2.1.2. LMA con con t(8;21)(q22;q22).....	15
3.2.1.3. LMA con inv(16)(p13;q22): leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia.	16
3.2.2. Grupo de riesgo intermedio	17
3.2.2.1. LMA con cariotipo normal (CN)	18
3.2.2.2. LMA con trisomía 8.....	18
3.2.3. Grupo de riesgo adverso	18
3.2.3.1. LMA con reordenamientos que implican el gen MLL.....	18
3.2.3.2. LMA con cariotipo complejo.....	19
3.2.4. Efecto de alteraciones adicionales en LMA con alteraciones pronósticas.	19
3.3. La genética molecular en la leucemia mieloide aguda	22
3.4. La genómica en la leucemia mieloide aguda	22
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. Material y técnicas básicas	33
1.1. Selección de pacientes.	33
1.1.1. Análisis de la información de número de copia del ADN utilizando herramientas de array-CGH.....	33
1.1.2. Análisis combinado de número de copia y pérdida de heterocigosidad neutra utilizando herramientas de array-SNP	34
1.1.3. Selección de pacientes de LMA para realizar tissue microarrays (TMA) .	34

1.2. Extracción de ADN.....	34
1.3. Obtención de suspensiones citogenéticas.....	34
1.4. Producción de tissue microarrays	35
2. Herramientas de arrays genómicos.....	35
2.1. Array-CGH de oligonucleótidos.....	35
2.1.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	35
2.1.2. Marcaje mediante cebado aleatorio.	36
2.1.3. Preparación de la solución de hibridación	36
2.1.4. Hibridación.....	37
2.1.5. Lavado del array hibridado.....	37
2.1.5. Tratamiento de las imágenes	37
2.2. Array de SNP.....	38
2.3. Análisis de los datos.....	42
2.3.1. Análisis de calidad y visualización de los arrays de CGH	42
2.3.2. Análisis de calidad y visualización de los arrays de SNP	43
2.3.3. Estimación del número de copias (VNC) y determinación de las regiones	43
2.3.4. Eliminación de polimorfismos de número de copia conocidos	44
2.3.5. Cálculo de la pérdida de heterocigosidad	44
2.3.6. Estudio de regiones de homocigosidad (LOH no debidas a enfermedad) en donantes sanos	44

2.3.7. Determinación de las regiones mínimas recurrentes (RMR) del estudio (número de copia y LOH).....	45
2.3.8. Análisis bioinformáticos de agrupamiento y selección de regiones candidatas en array-CGH y array-SNP.....	45
3. Hibridación in situ fluorescente (FISH)	46
3.1. Obtención de sondas para FISH	47
3.1.1. Diseño de las sondas.....	47
3.1.2. Cultivo de los clones bacterianos	47
3.1.3. Extracción del ADN plasmídico.....	48
3.1.4. Marcaje de la sonda	49
3.2. Protocolo de FISH	50
3.2.1. Preparación de la sonda	51
3.2.2. Preparación de la muestra.....	51
3.2.2.1. Envejecimiento de las suspensiones citogenéticas.....	51
3.2.2.2. Preparación de tissue-microarrays utilizando el protocolo DAKO FISH kit modificado.....	51
3.2.3. Hibridación, desnaturalización e incubación.....	52
3.2.4. Lavados post-hibridación.....	52
3.2.5. Captura y análisis de las imágenes	52
3.2.6. Descripción de las sondas utilizadas.....	53
4. Secuenciación genómica	53
5. Inmunohistoquímica	55

6. Análisis estadístico	56
RESULTADOS.....	59
1. Estudio genómico de una serie de LMA <i>de novo</i> utilizando array-CGH..	61
1.1. Descripción clínica de la serie	61
1.2. Descripción genómica de la serie	62
1.3. Desarrollo de la clasificación genómica.....	64
1.4. Comparación de la clasificación genómica con la citogenética	65
1.5. Estudio de supervivencia global en LMA	66
1.5.1. Impacto de las variables clínicas y genómicas en la supervivencia utilizando el test univariante de Log-Rank.....	66
1.5.1.1. Estudio de las variables clínicas y genómicas sobre la cohorte completa	66
1.5.1.2. Estudio de las variables clínicas y genómicas sobre el grupo de LMA de cariotipo normal.	68
1.5.2. Independencia de las variables clínicas y genómicas en la supervivencia utilizando el test multivariante de Cox	69
1.6. Definición de las regiones mínimas recurrentes (RMR-r)	70
2. Estudio genómico de LMA <i>de novo</i> utilizando array-SNP.....	73
2.1. Análisis de regiones LOH neutras en LMA	73
2.2. Detección de patrones complejos de número de copia y LOH.....	75
2.3. Combinación de herramientas genómicas en la búsqueda de genes candidatos en LMA.....	76
2.3.1. Genes candidatos en el cromosoma 17	76

2.3.2. Validación independiente mediante FISH de la delección de NF1	78
2.3.3. Cuantificación mediante inmunohistoquímica de los niveles de neurofibromina tras la delección de NF1	78
<i>DISCUSIÓN</i>	81
1. Frecuencia de alteraciones genómicas detectadas utilizando en array-CGH.....	84
2. Clasificación genómica y supervivencia usando array-CGH.....	86
3. Pérdida de heterocigosidad en LMA.	87
4. Caracterización de las regiones recurrentemente alteradas mediante la combinación de array-CGH y array-SNP.....	89
4.1. Eventos genómicos en el cromosoma 5	90
4.2. Eventos genómicos en el cromosoma 16	91
4.3. Eventos genómicos en el cromosoma 18	92
4.4. Eventos genómicos en el cromosoma 20	92
4.5. Eventos genómicos en el cromosoma 17	93
<i>CONCLUSIONES</i>	97
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	103
<i>ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO</i>	<i>a</i>
<i>ANEXO II: PUBLICACIONES</i>	<i>u</i>

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo (antibody)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AF9	Alias de MLLT3 (MLL translocated to 3)
Antifade	1,4 diazabicyclo-(2.2.2)-octano
Array-CGH	Micromatriz de CGH o microarray de CGH
Array-SNP	Micromatriz de SNP o microarray de SNP
ARN	Ácido ribonucleico
AML1	Acute myeloid leukemia 1 oncogene
BAALC	Brain and acute leukemia, cytoplasmic
BAC	Cromosoma artificial de bacteria (Bacterial Artificial Chromosome)
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
CALGB	Cancer and leukemia group B
CBF	Core binding factor
CBFβ	Core binding factor subunidad beta
CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M
CDKL3	Cyclin-dependent kinase-like 3
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), subunidad alfa
CGH	Hibridación Genómica Comparada (<i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
CID	Coagulopatía intravascular diseminada
CN	Cariotipo normal
Cr	Cromosoma
Cy3	Cianina -3
Cy5	Cianina -5
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4,6-diamino-2 fenilindol
dATP	2' Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2' Desoxicitosina 5'-trifosfato
del	Delección
dGTP	2' Desoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTP	2' desoxinucleósido 5'-trifosfato
dTTP	2' Desoxitimidita 5'-trifosfato
dUTP	2' Desoxiuridina 5'-trifosfato
ETO	Alias de RUNX1T1 (translocado 1 de la proteína AML1)
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog
FA2H	Fatty acid 2-hydroxylase
FAB	French-American-British cooperative group
FISH	Hibridación in situ con Fluorescencia (<i>Fluorencence in situ Hybridization</i>)
FLT3	Fms-related Tyrosine Kinase 3
GST	Gen supresor de tumores

H2AX	miembro X de la familia de la histona 2A
HOX	Homeobox
HRP	Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)
IHQ	Inmunohistoquímica
Kb	Kilobase
L3MBTL	homólogo del gen de <i>Drosophila</i> l(3)mbt-like
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMMJ	Leucemia mielomonocítica juvenil
LOH	Pérdida de heterocigosidad (<i>Loss of Heterozigosity</i>)
MLL	Mixed lineage leukemia
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYH11	Gen de la cadena pesada 11 de la miosina
Mb	Megabase
MRC	Medical Research Council
NF1	Neurofibromatosis-1 (gen), neurofibromin (proteína)
NPM1	Nucleofosmina
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Par de bases
PBS	Tampón salino fosfatado
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
PETHEMA	Programa para el estudio de la terapéutica en hemopatía maligna
PML	Promyelocytic leukemia protein
PPP2CA	protein phosphatase 2A catalytic subunit, isoforma alfa
LOH	Pérdida de heterocigosidad
RARα	Receptor del ácido retinoico subunidad alfa
RAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
RMR	Región mínima recurrente
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SKP1A	S-phase kinase-associated protein 1
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SOTA	Self Organizing Tree Algorithm
SSC	Solución salina de citrato de sodio.
SWOG	Southwest oncology group
t	Translocación
T.A	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
TMA	micromatriz de tejidos o Tissue microarray
TP53	Tumor protein p53
UBE2B	Ubiquitin-conjugating enzyme E2B
VNC	Variación de número de copia

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de enfermedades mieloides según la OMS.....	7
Tabla 2. Clasificación de la LMA según el consorcio FAB y alteraciones genéticas asociadas.....	8
Tabla 3. Clasificación de la LMA según la OMS.	9
Tabla 4. Alteraciones más frecuentes en LMA adulta	13
Tabla 5. Pronóstico asignado por los tres principales estudios colaborativos en AML adulta.	21
Tabla 6. Reacción de cebado aleatorio.....	50
Tabla 7. BACs empleados para FISH.	53
Tabla 8. Cebadores utilizados en la secuenciación del gen TP53.	53
Tabla 9. Protocolo de la PCR.	54
Tabla 10. Descripción clínica de la serie.....	61
Tabla 11. Información genómica de la serie dentro de los grupos de riesgo de la CALGB.	63
Tabla 12. Relación entre la clasificación citogenética y los grupos de inestabilidad.....	65
Tabla 13. Estudio univariante de los factores pronóstico sobre la cohorte completa.....	66
Tabla 14. Estudio univariante de los factores pronósticos sobre los casos con cariotipo normal ...	69
Tabla 15. Estudio multivariante de los factores pronósticos seleccionados sobre la cohorte completa.....	69
Tabla 16. RMR-r con asociación significativa con grupos de pronóstico citogenéticos y genómicos	71
Tabla 17. Regiones LOH neutras detectadas en el estudio	74
Tabla 18. Información de los casos LMA con del(17).....	77
Tabla 19. Secuenciación de TP53 en LMA con del(17).	77

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la mielopoyesis	6
Figura 2. t(15;17)(q22;q21).....	14
Figura 3. Esquema de la translocación t(15;17).....	15
Figura 4. t(8;21)(q22;q22).....	16
Figura 5. inv(16)(p13;q22).....	16
Figura 6. Diagrama de acción de las translocaciones que actúan sobre el complejo CBF.....	17
Figura 7. Trisomía del cromosoma 8	18
Figura 8. Generación del molde específico de alelo.	39
Figura 9. Amplificación por PCR del molde específico y marcaje dependiente de polimorfismo.	40
Figura 10. Ejemplo de hibridación en la plataforma Illumina	41
Figura 11. Escaneo del array HumanHap300.....	42
Figura 12. Ejemplo de determinación de regiones mínimas en el cromosoma 16.....	45
Figura 13. Marcaje de ADN mediante desplazamiento de la mella.....	49
Figura 14. Frecuencia de alteraciones por caso y grupos de frecuencia.	64
Figura 15. Curvas de Kaplan-Meyer basadas en la supervivencia global a 5 años.....	67
Figura 16. Ejemplo de validación de RMR-r mediante FISH.....	72
Figura 17. Eventos complejos LOH encontrados en diferentes casos de LMA.....	75
Figura 18. Región común de delección en la citobanda 17q11.2.....	76
Figura 19. Mutaciones encontradas en el gen TP53 mediante la técnica de secuenciación genómica.	77
Figura 20. Estudio por FISH de un coágulo medular del estado del gen NF1.....	78
Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de la proteína neurofibromina (NF1).....	79

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematological disease that includes several neoplasias among the myeloid lineage. AML is a heterogeneous disease with variable clinical characteristics, treatment response and overall survival. The common disease pattern is the massive accumulation of myeloid precursors in bone marrow and the presence of these precursors in peripheral blood. Adult AML is a typical disease of patients above 55 years old, with unfavourable prognostic prediction in general terms (less than 50% of AML patients will survive five years after diagnosis assessment). Excepting an AML subtype, called acute promyelocytic leukemia, there is no specific treatment for the disease. Moreover, due to the lack of diagnostic tools, more than 70% of the patients have an unclear prognosis. Because of these features, several studies have been conducted to identify prognostic and genetic markers which could be used to help in the clinical management of the disease and could provide new insights in the search of more effective and molecular-based therapies. Within this context, we were intrigued about the genetic make up of AML and we took advantage of the availability of genomic approaches to study this disease and to gain a more complete genetic picture of the oncological development.

First, using a 100 *de novo* AML series, we carried on a genomic study in order to identify the genomic copy number variations among the series using arra-CGH technique. This study helped us to detect that copy number alterations are very frequent in AML (74% of the cases had at least one genomic aberration). Using this data, we were able to produce a genomic instability classification with prognostic value: cases with more unstable genomes showed worse five year overall survival features than cases with stable genomes. This classification system was independent from other clinical variables, such as age or conventional cytogenetic classification.

Secondly, we performed an array-SNP analysis in sixteen AML cases from the same consecutive series in order to look for another genetic mutational event known as loss of heterozygosity (LOH). We detected that LOH events are very frequent in AML, although we could not find recurrent LOH regions in our series. However, we were able to detect a very highly complex genomic event consisting of a LOH region

flanked by deletions. This complex event was fundamentally found in complex karyotype cases, and the function or meaning of them is yet to be elucidated.

When we analyzed in detailed the information of the genomic regions that were altered in our series, we detected that, in general, AML showed a very low recurrence. Only six aberrant regions with a recurrence rate higher than 5% were detected. Five of them were minimal deleted regions, with a size below 2Mb, that were located at 5q31.1, 7p11.2, 7q36.1, 17q11.2 and 20q13.12. The remaining region corresponded to trisomy 8 which was found in 15% of the cases (the most recurrent genetic aberration in our series). Additionally, when we studied the presence of minimal aberrant regions according to the prognostic groups and to the proposed genomic stability groups, we detected five regions, located in chromosomes 5, 16 (two regions), 17 and 18, that were significantly associated with the most aggressive leukemias. Even more, the presence of a single deletion affecting any of these regions was significantly associated with the shorter five year overall survival in our series. The complete absence of highly recurrent well defined genomic aberrations indicates that, rather than a genetic disease, AML may be considered as a **genomic** disease.

Among these significant deletions, we focussed in the one that was located in 17q11.2. This was the most recurrent deletion in the series, and it included NF1 gene. NF1 is a tumour suppressor gene related with several children myeloid disorders. The genomic alteration that was located along this region frequently included the TP53 gene. Using the combination of the genomic data we obtained (array-CGH and array-SNP), we explored which of the two candidates, NF1 or TP53, could be the main target of the chromosome 17 deletions in AML. Deletion and mutation studies pointed to NF1 as a better candidate. Moreover, NF1 deletion was not exclusively associated to complex karyotypes, contrary to what happened with TP53. We conducted a validation study using FISH on an AML tissue microarray which helped us to conclude that the NF1 deletion is a very common event, present in approximately 10% of the population. Further protein level analyses demonstrated that the NF1 deletion was associated to a NF1 cytoplasm protein level reduction.

These findings suggest that NF1 is a very interesting protein in AML, which can be detected using conventional techniques and may be therefore used in clinical

practise. The biological role of NF1 deletion in AML, through the activating effect on the RAS pathway is discussed.

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad hematológica que incluye varias neoplasias a lo largo del linaje mieloide. La LMA es muy heterogénea, con características clínicas, respuesta al tratamiento y supervivencia global muy variables. El patrón común de la enfermedad es la acumulación masiva de precursores mieloides en la médula ósea y la presencia de éstos en la sangre periférica. La LMA adulta es típica de pacientes por encima de los 55 años, con una predicción de pronóstico desfavorable en términos generales (menos del 50% de los pacientes de LMA adulta sobrevivirán cinco años después del diagnóstico). Exceptuando un subtipo de LMA, llamado leucemia promielocítica aguda, no hay un tratamiento específico para esta enfermedad. Es más, debido a la falta de herramientas diagnósticas, más del 70% de los pacientes tienen un pronóstico incierto. Debido a estos hechos, se han realizado varios estudios para identificar marcadores genéticos de pronóstico que pudieran ayudar en el tratamiento clínico de la enfermedad. En este contexto, pretendemos dilucidar el comportamiento de la LMA a nivel genético, para lo cual hemos utilizado las herramientas genómicas a nuestro alcance para estudiar esta enfermedad y conseguir una visión genética más completa del desarrollo tumoral.

Primero, usando una serie de 100 LMA *de novo*, realizamos un estudio genómico para identificar las variaciones de número de copia a lo largo de la serie mediante la técnica de array-CGH. Este estudio nos permitió detectar que alteraciones de número de copia son frecuentes en LMA (74% de los casos tenía al menos una alteración). Utilizando estos datos, fuimos capaces de producir una clasificación genómica con valor pronóstico: los casos con un genoma más inestable presentaron una peor supervivencia global a los cinco años que casos con genoma más estable. Este sistema de clasificación fue independiente de otras variables clínicas, tales como la edad o la clasificación citogenética convencional.

Segundo, realizamos un estudio utilizando array-SNP en dieciséis muestras de LMA de la misma serie consecutiva, con el objetivo de detectar regiones pérdida de heterocigosidad (LOH en inglés). Detectamos también que los eventos de LOH eran muy frecuentes en la leucemia mieloide aguda, aunque no fuimos capaces de detectar

ninguna recurrencia de LOH en esta serie. Sin embargo, logramos detectar un evento de daño genómico altamente complejo que consistía en una región de LOH flanqueada por deleciones. Este evento fue encontrado fundamentalmente en LMA de cariotipo complejo, y su función o significado está aún por descubrir.

Cuando analizamos en detalle la información de las regiones genómicas alteradas en nuestra serie, detectamos que, en general, la LMA presentaba una recurrencia muy baja. Solo se encontraron seis regiones aberrantes con una recurrencia superior al 5%. Cinco de ellas eran regiones mínimas delecionadas menores de 2Mb, localizadas en las citobandas 5q31.1, 7p11.2, 7q36.1, 17q11.2 y 20q13.12. La restante correspondía a la trisomía 8 que, con el 15% de recurrencia, constituyó el cambio genético más frecuente. Adicionalmente, cuando estudiamos la presencia de regiones mínimas aberrantes relacionadas con grupos de inestabilidad y pronóstico, detectamos cinco regiones de pérdida genómica, localizadas en los cromosomas 5, 16 (dos regiones), 17 y 18, que estaban asociadas significativamente con las leucemias más agresivas. La presencia de una deleción afectando una de esas regiones estaba asociada significativamente con una supervivencia global menor a los cinco años de estudio en nuestra serie. La ausencia de aberraciones genómicas altamente recurrentes indica que la LMA, más que una enfermedad genética (genes específicos), podría ser considerada una enfermedad **genómica**.

De entre todas estas regiones de interés, nos centramos en aquella situada en 17q11.2. Esta deleción era la más recurrente de nuestra serie e incluía el gen *NF1*. *NF1* es una proteína supresora de tumores relacionada con varios síndromes mieloides infantiles. La alteración genómica de 17q11.2 estaba con frecuencia asociada a una deleción concomitante del gen *TP53*. Usando la combinación de los datos genómicos a nuestro alcance (array-CGH y array-SNP), exploramos cuál de los dos candidatos, *NF1* o *TP53*, podría ser el objetivo principal en las deleciones del cromosoma 17 en LMA. Los estudios de deleción y mutación señalaron a *NF1* como un mejor candidato. De hecho, la deleción de *NF1* no estaba asociada exclusivamente a cariotipos complejos, al contrario de lo que sucedía con *TP53*. Realizamos un estudio de utilizando FISH en un tissue microarray de LMA que nos permitió confirmar la deleción de *NF1* como un evento genómico frecuente en LMA, delecionado en alrededor del 10% de la población. Análisis posteriores del nivel de

la proteína demostraron que la delección de *NF1* estaba asociada a una reducción del nivel de proteína citoplasmática de la neurofibromina (la proteína de *NF1*).

Estos hallazgos sugieren que *NF1* es una proteína de alto interés en la LMA, y que su alteración puede ser detectada por medio de técnicas convencionales, con lo que puede ser un marcador de interés en la práctica clínica. Se deduce un posible papel biológico de la delección de *NF1*, que desencadena una hiperactivación de la ruta de RAS, en la leucemia mieloide aguda.

INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER ES UNA ENFERMEDAD GENÉTICA.

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una división y crecimiento descontrolado de las células neoplásicas. Dichas células poseen la capacidad de invadir el órgano donde se originaron, de viajar por la sangre y el líquido linfático hasta otros órganos más alejados y crecer en ellos. La palabra cáncer es un término muy amplio que abarca varios cientos de tipos de enfermedades (llamados tumores malignos). Cada uno de ellos posee unas características particulares, que en algunos casos son completamente diferentes al resto de los otros cánceres, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico.

El cáncer es una enfermedad genética de origen celular. Todo apunta a que, sin embargo, no es una enfermedad monogénica sino que requiere la acumulación de defectos en varios genes esenciales para el desarrollo normal de la vida celular. Una célula se transforma en neoplásica cuando se acumula daño genético que afecte a varios genes. Ese daño genético puede encontrarse en forma de mutaciones puntuales, inserciones, pérdidas o ganancias de material genético o translocaciones. Las células sanas se transforman en células tumorales y progresan por la acumulación de estas mutaciones en los genes denominados guardianes (*gatekeepers*) y reparadores (*caretakers*). Los primeros son oncogenes o genes supresores de tumores implicados en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación o la apoptosis. Los genes reparadores son genes que no regulan directamente el crecimiento del tumor, sino que están implicados en el mantenimiento de la integridad genómica (Vogelstein and Kinzler 2004).

Los oncogenes favorecen la transformación celular cuando mutan de modo que el gen se activa constitutivamente o en condiciones en las que el alelo salvaje (o forma natural del gen) no lo haría. Esta activación puede ser el resultado de translocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas o mutaciones puntuales que afectan residuos cruciales que regulan la actividad del producto del gen. Generalmente, una sola mutación activadora en uno de los alelos es suficiente para que le confiera a la célula una ventaja en el crecimiento celular.

Por el contrario, las mutaciones en los genes supresores de tumores reducen la actividad del producto de ese gen. Esta inactivación es debida a mutaciones que afectan a residuos que son cruciales en su actividad, son mutaciones que pueden generar proteínas truncadas, o incluso deleciones o inserciones de tamaño variable. La inactivación también puede obedecer a un silenciamiento de su expresión debido a modificaciones epigenéticas. Se ha propuesto que para que esta inactivación sea efectiva ambos alelos deben estar alterados, sin embargo, estudios recientes ha sugerido que la inactivación de uno sólo de los alelos puede también conferir esa ventaja selectiva (haploinsuficiencia) (Santarosa and Ashworth 2004).

Los genes reparadores, que son los que mantienen la integridad celular, son genes que intervienen de una forma u otra en sistemas de reparación de errores de ADN producidos durante la replicación del ADN o por la exposición a agentes mutagénicos. Estos genes controlan la integridad del genoma y mantienen las alteraciones genéticas al mínimo. Cuando se inactivan, la tasa de mutación aumenta contribuyendo a la progresión tumoral (Friedberg 2003). Para tener un efecto patogénico, los genes reparadores tienen que mutarse bialélicamente. Las mutaciones heterocigotas de estos genes, en la línea germinal, se asocian a una predisposición al desarrollo de tumores. Durante el desarrollo tumoral estas mutaciones se hacen bialélicas o se asocian a un silenciamiento del alelo salvaje en las células tumorales. Lo mismo ocurre en el desarrollo de tumores esporádicos, que se asocia a mutaciones adquiridas que producen un silenciamiento de estos genes en células somáticas (Knudson 2002).

La proliferación descontrolada de las células tumorales favorece en la mayoría de las neoplasias el fenómeno de la inestabilidad cromosómica. La inestabilidad cromosómica es debida a ganancias y/o pérdidas de cromosomas enteros, o fragmentos largos de los cromosomas durante la división celular (Kops, et al. 2005), apareciendo un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidía) y una alta tasa de pérdida de heterocigosidad (LOH, de *loss of heterozygosity* en inglés).

Estos cambios en el contenido genómico facilitarían el desarrollo de un clon tumoral, por ejemplo, eliminando el alelo funcional de un supresor de tumores. Los mecanismos por los que aparece la inestabilidad son aún desconocidos, aunque se

han propuesto como candidatos múltiples genes y vías de señalización, como, por ejemplo, la de los genes que regulan el ciclo celular.

La contribución de la inestabilidad cromosómica a la generación del tumor es otro aspecto no definido hasta la fecha. Se ha hipotetizado que podría ser simplemente un fenómeno inespecífico que ocurre espontáneamente durante la progresión del tumor. No obstante, hay evidencias indirectas que sugieren que podría ser un evento iniciador que contribuye a la formación del tumor. Algunos de estos hallazgos son la existencia de aneuploidía en condiciones pre-neoplásicas, o la mayor frecuencia de inestabilidad genética en líneas celulares aneuploides y la presencia de mutaciones en genes que controlan los puntos de control de la mitosis, que sugieren que la aneuploidía juega un papel activo en la carcinogénesis (Kops, et al. 2005).

Todos estos hallazgos nos permiten definir el cáncer como una enfermedad genética en la que aparecen defectos genéticos específicos que determinan tanto la predisposición individual al desarrollo de tumores, como la génesis, progresión y desarrollo de metástasis de las neoplasias. La identificación precisa de estas alteraciones contribuye a la detección temprana, el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de las neoplasias.

2. LAS ENFERMEDADES MIELOIDES.

Las enfermedades de origen mieloide son patologías secundarias a mutaciones que inducen un bloqueo en la diferenciación o una ventaja en la proliferación de los progenitores hematopoyéticos mieloides, responsables del mantenimiento de la mielopoyesis.

La hematopoyesis o hemopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética pluripotencial. Las células madre, que en el adulto se encuentran en la médula ósea, son las responsables de formar todas las células y derivados celulares que circulan por la sangre. La hematopoyesis se divide en dos linajes principales, el linaje linfoide, que engloba los linfocitos T, B y NK, y el linaje mieloide, que origina los eritrocitos, los

granulocitos, los monocitos y las plaquetas. El desarrollo del linaje mieloide, o mielopoyesis, está esquematizado en la figura 1.

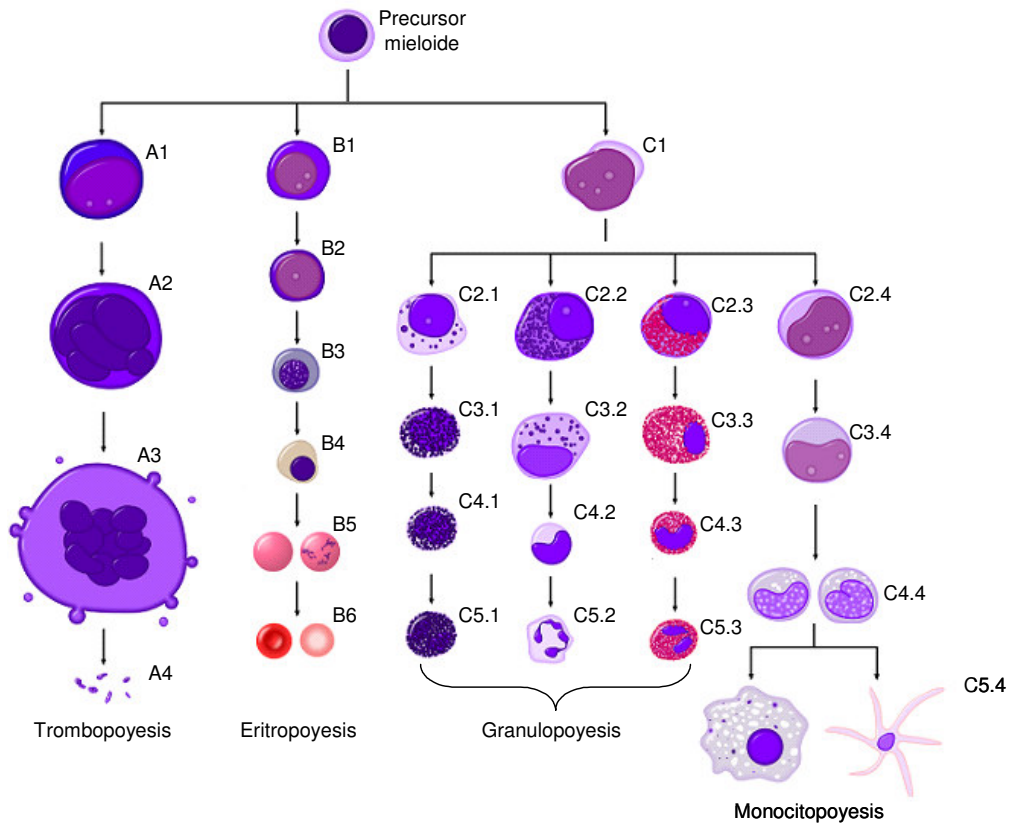


Figura 1. Esquema de la mielopoyesis. La mielopoyesis, o desarrollo de células mieloideas maduras, parte de un precursor mieloide común. **A.** Desarrollo de los fragmentos plaquetarios, o trombopoyesis: parte de una célula mononucleada (megacarioblasto, A1), al estadio polinuclear primitivo (promegacariocito, A2) y maduro (megacariocito, A3); el megacariocito se escinde en los fragmentos conocidos como plaquetas (A4). **B.** Desarrollo de los eritrocitos o eritropoyesis: comienza con el proeritroblasto (B1), que madura a diferentes etapas de eritroblasto: basófilo (B2), policromático (B3) y ortocromático (B4); el núcleo se pierde en la forma primitiva llamada reticulocito (B5); éste cambia a una forma bicóncava madura llamada eritrocito (B6). **C.** Granulopoyesis y monocitopoyesis. Todos los linajes parten de un precursor granulomonopoyético (CFC-GM, C1) común: la granulopoyesis contiene el desarrollo de tres tipos celulares con un mismo origen: neutrófilo, eosinófilo y basófilo a partir del CFC-GM que pasa al mieloblasto común. Los mieloblastos maduran al estadio de promielocito (basófilo, C2.1, neutrófilo, C2.2 y eosinófilo, C2.3), que pasa al estadio de mielocito (C3.1, C3.2 y C3.3) y éste al de metamielocito (C4.1, C4.2 y C4.3). La característica forma polinucleada no aparece hasta el estadio de granulocito maduro (C5.1, C5.2 y C5.3). La monocitopoyesis es el desarrollo de los monocitos. El CFC-GM (C1) se transforma en un estado más diferenciado conocido como monoblasto (C2.4), éste en un promonocito, o forma semimadura (C3.4), que madurará definitivamente en la forma del monocito (C4.4). De este linaje también forman parte las formas tisulares, conocidas como macrófagos y células dendríticas mieloideas (C5.4).

2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES MIELOIDES

En la actualidad, la clasificación de las patologías de origen mieloide más extendida es la desarrollada por la *Asociación Europea de Patología* y la *Sociedad de Hematopatología* para la Organización Mundial de la Salud (OMS, resumida en la tabla 1) (Harris et al., 2000). Esta clasificación se basa en criterios morfológicos, genéticos, clínicos e inmunofenotípicos. En esta clasificación se incluyen cuatro grupos de patologías, los síndromes mieloproliferativos, los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos, los síndromes mielodisplásicos y las leucemias agudas mieloides.

Tabla 1: Clasificación de enfermedades mieloides según la OMS

Enfermedades Mieloproliferativas Leucemia mieloide crónica, positiva para el cromosoma Filadelfia, t(9;22) Leucemia neutrofílica crónica Leucemia eosinofílica crónica / síndrome de hipereosinofilia Mielofibrosis idiopática crónica Policitemia vera Trombocitemia esencial
Síndromes mielodisplásicos / mieloproliferativos Leucemia mielomonocítica crónica Leucemia mielomonocítica juvenil
Síndromes mielodisplásicos Anemia refractaria Con sideroblastos anillados Sin sideroblastos anillados Citopenia refractaria con displasia multilineaje Anemia refractaria con exceso de blastos Síndrome 5q- Síndrome mielodisplásico inclasificable
Leucemia mieloide aguda (LMA)

3. LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

La leucemia aguda es una forma de cáncer que se caracteriza por una proliferación clonal de progenitores hematopoyéticos inmaduros (llamados mieloblastos) que pierden su capacidad de diferenciación y de respuesta a reguladores de proliferación. La ocupación de la médula ósea por los mieloblastos produce un bloqueo en la producción de las células sanguíneas, lo que resulta en una deficiencia de glóbulos rojos (anemia), plaquetas (trombocitopenia) y de glóbulos blancos (especialmente neutrófilos, es decir, neutropenia) (Estey and Dohner 2006). La leucemia Mieloide Aguda (LMA) tiene una incidencia es de 1,5 casos por 100.000 habitantes/año. Su

frecuencia aumenta con la edad. Comprende el 80% de las leucemias agudas en adultos y el 15-20% de las pediátricas, siendo la leucemia más frecuente en neonatos. A nivel de evolución clínica, la LMA adulta es una enfermedad propia de pacientes añosos, con una mediana cercana a los 55 años. Es una enfermedad especialmente agresiva, con una tasa de supervivencia a los cinco años que no supera el 40% de los casos a pesar del tratamiento. Los sistemas de clasificación actuales se basan fundamentalmente en criterios morfológicos, fenotípicos y citogenéticos que predicen solo parcialmente el curso de la enfermedad, si bien es necesario el desarrollo de nuevas herramientas que predigan eficazmente el pronóstico de la enfermedad al diagnóstico.

3.1. SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN DE LA LMA.

Existen dos sistemas de clasificación de la leucemia mieloide aguda. El primero de ellos fue propuesto por el grupo cooperativo francés-americano-inglés, o FAB (de *French-American-British cooperative group*) en el año 1976 (Bennett, et al. 1976). Dicha clasificación fue revisada por el mismo grupo en 1985 (Bennett, et al. 1985). Esta clasificación se basa fundamentalmente en criterios morfológicos e inmunohistoquímicos (tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de la LMA según el consorcio FAB y alteraciones genéticas asociadas

Subtipo	Morfología (%)	Tinción			Alteraciones genéticas asociadas (%)
		Mieloperoxidasa	Negro Sudán	Esterasa Inespecífica	
M0	LMA no diferenciada (3%)	-	-	_*	inv(3q26) y t(3;3) (1%)
M1	LMA sin maduración (15-20%)	+	+	-	
M2	LMA con maduración (25-30%)	+	+	-	t(8;21) (40%) t(6;9) (1%)
M3	Leucemia promielocítica aguda (5-10%)	+	+	-	t(15;17) (98%) t(11;17) (1%) t(5;17) (1%)
M4	Leucemia mielomonocítica aguda (20%)	+	+	+	11q23 (20%) inv(3q26) t(6;9)
M4EO	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia (5-10%)	+	+	+	inv(16), t(16;16) (80%)
M5	Leucemia monocítica aguda (2-10%)	-	-	+	11q23 (20%) t(8;16) (2%)
M6	Eritroleucemia (3-5%)	+	+	-	
M7	Leucemia megacariocítica aguda (3-12%)	-	-	+*	t(1;22) (5%)

* Se diagnostican típicamente por inmunofenotipo

El segundo sistema de clasificación de la leucemia mieloide aguda fue desarrollado dentro de la propuesta de la OMS (Harris et al., 2000; Harris, et al. 1999). Tiene grandes similitudes con el sistema del grupo FAB, diferenciándose principalmente en que separa varios grupos de leucemias basándose principalmente en cambios citogenéticos, aunque sigue agrupando a una gran cantidad de leucemias (cerca de la mitad) en un grupo heterogéneo, imposible de clasificar por criterios citogenéticos, a la que diferenciaba fundamentalmente por criterios morfológicos (Bacher, et al. 2005). Además, la OMS añade un nuevo grupo, el de LMA con patrones relacionados con SMD, en el que engloba las leucemias secundarias a la transformación de un síndrome mielodisplásico (SMD), y a aquellas LMA donde se observa displasia en la hematopoyesis residual no leucémica (tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de la LMA según la OMS

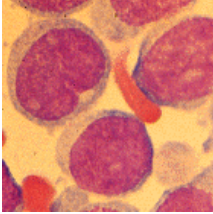
Categoría	Morfología	Incidencia (%)
LMA con translocaciones recurrentes	LMA con t(8;21)	5-12
	LMA con t(15;17)	10-15
	LMA con inv(16)	5
	LMA con patrón 11q23	3-5
LMA con patrones relacionados con SMD	LMA con displasia multilineal	10-15
	LMA post-SMD	
LMA inespecífica	LMA no diferenciada (M0)	40-50
	LMA inmadura (M1)	
	LMA madura (M2)	
	Leucemia mielomonocítica aguda (M4)	
	Leucemia monocítica (M5)	
	Leucemia eritrocítica aguda (M6)	
	Leucemia megacariocítica aguda (M7)	

3.1.1. LMA MÍNIMAMENTE O NO DIFERENCIADA (M0).

La leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación constituye aproximadamente un 3% de todos los casos de LMA. Morfológicamente, es el grupo más difícil de diferenciar de la variante L2 de la LLA. Los marcadores linfoides son generalmente negativos excepto para CD7, que se expresa asociado a otros marcadores de inmadurez celular, tales como CD34, TdT y HLA-DR (Villamor, et al. 1998). CD13 y CD33 se expresan en aproximadamente el 70% de los casos de LMA M0. Es frecuente encontrar leucemias de este grupo con expresión de otros marcadores mieloides, pero su positividad es menos útil a la hora de establecer el diagnóstico. La leucemia no diferenciada tiene una alta incidencia de cariotipos complejos, teniendo

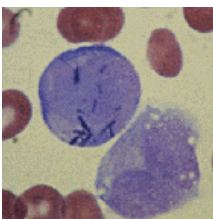
alteraciones frecuentemente en los cromosomas 5, 7, 8 y 13 (Cuneo, et al. 1996; Venditti, et al. 1996).

3.1.2. LMA SIN MADURACIÓN (M1).



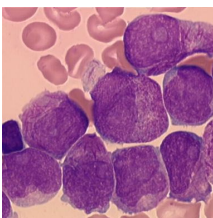
La leucemia mieloide aguda sin maduración constituye aproximadamente un 15-20% de todos los casos de LMA. La médula ósea se infiltra con blastos poco diferenciados, con escasos gránulos azurofílicos. Marcadores típicos de expresión son CD13, CD33, CD117 y, en menor medida, CD34 y HLA-DR (Hoffman, et al. 2005; Lowenberg, et al. 1999).

3.1.3. LMA CON MADURACIÓN (M2).



La leucemia mieloide aguda con maduración tiene como característica principal la evidencia de maduración al estadio de promielocito y estadios posteriores. Los bastones de Auer son típicos de esta leucemia (Stass, et al. 1984), y los blastos contienen gránulos azurófilos prominentes (Hoffman, et al. 2005). Los marcadores de expresión que caracterizan a este grupo son CD13, CD15 (marcador que refleja la maduración de los blastos), CD19, CD33, CD34 y CD117.

3.1.4. LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (M3).

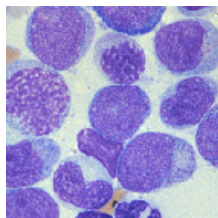


La leucemia aguda promielocítica se caracteriza por la presencia de promielocitos leucémicos, de mayor tamaño que sus homónimos no malignos, son identificables por un citoplasma lleno de gránulos rosados o púrpuras, bastones de Auer y tinción positiva para negro Sudán y peroxidasa (Cassinat and Chomienne 2001). El fenotipo inmunohistoquímico refleja la maduración de los blastos leucémicos, que son CD34⁻, CD14⁻, CD11b⁻, HLA-DR⁻ y CD33⁺.

Existe una variante de leucemia promielocítica, llamada M3v, o variante microgranular. Esta variante aparece en el 20% de los casos y se caracteriza por presentar un alto número de leucocitos en sangre (excediendo los 100000 por mm³) y

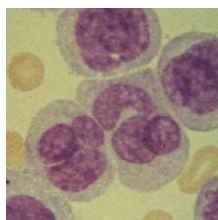
por tener una granulación mínima y falta de bastones de Auer, teniendo semejanzas con la leucemia monocítica a nivel morfológico.

3.1.5. LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA AGUDA (M4).



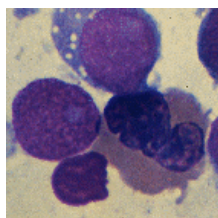
En la leucemia mielomonocítica, las células tienen características diferenciadas de neutrófilos y monocitos. Los pacientes presentan infiltración extramedular, más frecuentemente que en los subtipos anteriores (M0 a M2). A nivel de marcadores, comparten marcadores de precursores monocíticos y neutrofílicos (Hoffman, et al. 2005).

3.1.6. LEUCEMIA MONOCÍTICA AGUDA (M5).



Existen dos variantes M5: leucemia monoblástica pobremente diferenciada (M5a) y leucemia monocítica diferenciada (M5b). A nivel inmunofenotípico, las leucemias M5 expresan CD64, CD68, CD11b y CD14. Los pacientes con la variante M5a son más jóvenes, presentan un recuento blástico más alto en sangre periférica y médula ósea y tienen una supervivencia global más adversa que los pacientes con M5b (Haferlach, et al. 2002). La LMA del subtipo M5 tiene muy mala respuesta al tratamiento. A pesar de que la tasa de remisión completa es similar al resto de LMA, la supervivencia global es significativamente menor que en subtipos como la M2 (Fung, et al. 1995).

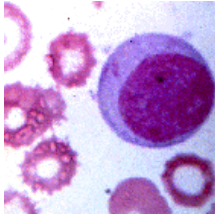
3.1.7. LEUCEMIA ERITROCÍTICA AGUDA O ERITROLEUCEMIA (M6).



La leucemia eritroide aguda representa un 3-5% de todos los casos de LMA. Es una enfermedad muy heterogénea, lo que dificulta en gran medida su diagnóstico. Existen varios marcadores positivos en la M6, como CD36 (puede aparecer positivo en M5 y M7), o glicoporina A (exclusiva de los neutrófilos). Existen dos subtipos de eritroleucemia: eritroleucemia con mezcla de blastos granulocíticos (>20% de los mieloblastos) y células eritroblástica, y leucemia eritroide pura, con un 80% o más de componentes eritroblásticos (Cigudosa, et al. 2003). Los eritroblastos suelen ser anormales, con núcleos multilobulados y

múltiples nucleolos. En el subtipo con fracción mieloblástica es frecuente la observación de bastones de Auer. Los pacientes con eritroleucemia suelen responder peor a la terapia, con períodos de remisión muy cortos (Park, et al. 2002).

3.1.8. LEUCEMIA MEGACARIOCÍTICA AGUDA (M7).



La LMA M7 representa un 3-5% de todas las leucemias. Se caracteriza por la presencia de unos blastos del linaje megacariocítico. Una característica de esta variante de LMA es la frecuente fibrosis medular asociada, que dificulta la extracción de la médula ósea, por lo que con relativa frecuencia se obtiene un aspirado seco en la extracción de médula ósea. Los sistemas de clasificación señalan la dificultad de clasificar esta enfermedad usando morfología y citoquímica clásicas, por lo que se recomienda el uso de criterios inmunofenotípicos, como la expresión de CD42b o CD61.

A nivel clínico, el subtipo M7 tiene muy mala respuesta a tratamientos convencionales, presentando períodos muy cortos de remisión y muy baja supervivencia global (Athale, et al. 2001).

3.2. LA CITOGENÉTICA EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

La citogenética al diagnóstico, además de permitir la adecuada clasificación de esta enfermedad es el factor pronóstico más importante. La identificación de las alteraciones citogenéticas permite la estratificación de estos pacientes en grupos de riesgo.

La LMA es una enfermedad muy heterogénea, no solo morfológicamente (como se ha comprobado en los sistemas de la FAB y la OMS), sino citogenéticamente. Cerca de un 50% de los casos no presenta alteraciones citogenéticas al diagnóstico, y la recurrencia más alta de cambio citogenético es la trisomía del cromosoma 8, con un porcentaje cercano al 10% de los casos totales (tabla 4) (Mrozek, et al. 2004). Estos datos son muy lejanos de, por ejemplo, la leucemia mieloide crónica, donde casi el 100% de los casos presenta t(9;22), lo que es una muestra de la heterogeneidad de la enfermedad.

Tabla 4: Alteraciones más frecuentes en LMA adulta

Alteración Citogenética	%
Cariotipo Normal	44
+8	9
-7/7q-	7
t(15;17)(q22;q21)	7
-5/5q-	7
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	7
t(8;21)(q22;q22)	6

La citogenética al diagnóstico es la herramienta más importante para predecir el pronóstico del paciente. De hecho, la clasificación de la OMS utiliza la citogenética como base para discernir grupos de leucemia. Históricamente, tres grandes estudios cooperativos han puesto de relieve la importancia de la citogenética para establecer grupos de riesgo que permitan predecir el pronóstico de los pacientes al diagnóstico. Estos estudios son, en orden cronológico, el estudio MRC AML 10 (Medical Research Council) en el año 1998 (Grimwade, et al. 1998), el estudio cooperativo SWOG/ECOG (Southwest Oncology Group, Eastern Cooperative Oncology Group) en el año 2000 (Slovak, et al. 2000), y finalmente el estudio CALGB 8461 (Cancer and leukemia group B) en el año 2002 (Byrd, et al. 2002). En esencia, los tres estudios intentan determinar el efecto de lesiones citogenéticas al diagnóstico en el pronóstico de la enfermedad, produciendo tres grupos de pronóstico: favorable, intermedio y adverso. Adicionalmente, el sistema SWOG/ECOG estableció un grupo de pronóstico desconocido (todas las demás alteraciones no consideradas en el grupo intermedio). Dentro de cada grupo, se englobaban los diferentes hallazgos citogenéticos (tabla 5).

A pesar de algunas diferencias, los tres estudios establecían como favorables los casos con t(8;21), inv(16) y t(15;17) y como adversos los casos complejos (3 o más alteraciones cromosómicas en SWOG y en CALGB y 5 o más en MRC), t(6;9), del(5q) y alteraciones en el cromosoma 7, fundamentalmente. El grupo de riesgo intermedio, llamado así por tener un pronóstico indeterminado entre los otros dos, era el grupo mayoritario. Este grupo englobaba casos con cariotipo normal o casos con trisomía del cromosoma 8, entre otras alteraciones. Dado que en esencia los tres estudios establecen grupos de riesgo similares, nos hemos centrado en la utilizada por la CALGB .

3.2.1. GRUPO DE RIESGO FAVORABLE.

El grupo de riesgo favorable forma aproximadamente el 14% de todas las LMA *de novo*. Son leucemias caracterizadas por tener buena respuesta a tratamiento y un pronóstico general muy favorable (con una supervivencia global a los cinco años del 55%). Estas leucemias se caracterizan por tener una translocación equilibrada. En este grupo favorable se incluyen la LMA promielocítica con la t(15;17)(q22;q21) y dos de las LMA con translocaciones que afectan a genes del *core binding factor* (CBF).

3.2.1.1. LMA con t(15;17)(q22;q21): leucemia promielocítica aguda (LPA).

Este grupo corresponde a la M3 de la FAB. Aparece habitualmente en la edad adulta (la más baja de todos los subtipos), Clínicamente, puede aparecer asociada a fenómenos de coagulopatía intravascular diseminada (CID) (Puccetti and Ruthardt 2004).

A nivel citogenético, esta enfermedad está caracterizada por la presencia de una translocación equilibrada t(15;17)(q22;q21) (figura 2) que produce una proteína de fusión PML-RAR α . RAR α , receptor del ácido retinoico, resulta modificado en esta translocación, lo que conlleva a una falta de respuesta celular al ácido retinoico, necesario para la diferenciación de los promielocitos (Grignani, et al. 1998; Melnick and Licht 1999) (figura 3). De hecho, la presencia de la translocación es el criterio diagnóstico más importante (esta translocación es detectable tanto por técnicas moleculares como por citogenética).

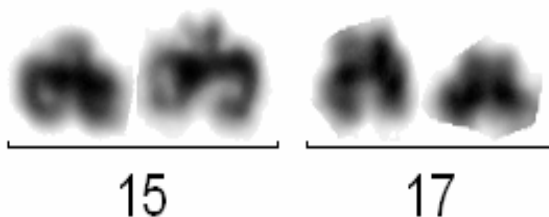


Figura 2. t(15;17)(q22;21). La translocación t(15;17)(q22;q21) produce dos cromosomas derivados, der(15), de mayor tamaño que un 15 sano, y der(17) más pequeño que el 17 normal. En la imagen se aprecian los cromosomas sanos (izquierda en 15 y 17) frente a los cromosomas derivados (derecha)

La buena respuesta al tratamiento de esta entidad se debe fundamentalmente a que se utiliza un tratamiento específico diferente al resto de las LMAs, que consiste en la incorporación al tratamiento dosis suprafisiológicas de ácido retinoico) (Puccetti and Ruthardt 2004), lo que permite una inducción de la diferenciación bloqueada en presencia de la translocación (figura 3).

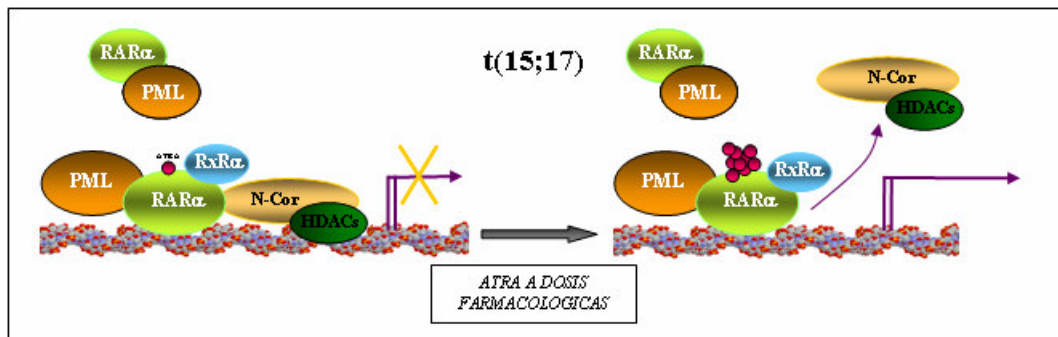


Figura 3. Esquema de la translocación $t(15;17)(q22;q21)$. La translocación $t(15;17)$ da lugar a la proteína de fusión PML/RAR α y, en un número significativo de pacientes, al transcrito recíproco RAR α / PML. La proteína de fusión interacciona con moléculas correpressoras que no se liberan a concentraciones fisiológicas de AR lo que resulta en una inhibición de la transcripción. Sin embargo, en presencia de concentraciones farmacológicas de AR, como las obtenidas al administrar ATRA, se liberan las moléculas correpressoras, re-estableciéndose la transcripción.

3.2.1.2. LMA con $t(8;21)(q22;q22)$.

Las leucemias con $t(8;21)(q22;q22)$ (figura 4) han sido clasificadas tradicionalmente como LMA del grupo M2 según la FAB (constituyendo el 40% de este grupo) (Bennett, et al. 1985). Sin embargo, la OMS decidió (debido a las diferencias de pronóstico y la facilidad de ser diagnosticada con técnicas citogenéticas y moleculares) situarla en un grupo aparte como leucemia con alteración conocida (Harris, et al. 1999). A nivel biológico, la translocación $t(8;21)(q22;q22)$ implica los genes *AML1* y *ETO* (Miyoshi, et al. 1991). La proteína de fusión obtenida, llamada AML1-ETO, si bien es capaz de unirse a la proteína CBF β , al que normalmente se une AML1 para formar el core binding factor (CBF) (figura 6). El CBF es el responsable de la activación de múltiples genes necesarios para la mielopoiesis normal. En presencia de la proteína de fusión el CBF, pierde su capacidad para reclutar coactivadores, y a través de ETO recluta correpresores actuando la proteína de fusión como un factor de transcripción que reprime genes esenciales para la diferenciación hematopoyética, habitualmente regulados por la forma natural de AML1 (Licht 2001).

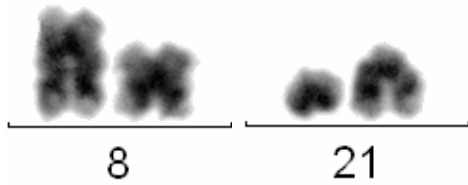


Figura 4. t(8;21)(q22;q22). Se puede observar en la imagen los dos cromosomas normales (izquierda) y los derivados (derecha) de la translocación. La fusión *AML1-ETO* permanece en el der(21).

3.2.1.3- LMA con inv(16)(p13;q22): leucemia mielomonocítica con eosinofilia.

Las LMA con inv(16)(p13;q22) (figura 5), a pesar de formar un grupo independiente en la clasificación de la OMS (Harris, et al. 1999), han sido tradicionalmente diagnosticadas dentro del subtipo M4 de la clasificación FAB debido a que presentaba caracteres claramente mielomonocíticos típicos de la enfermedad M4. Sin embargo, debido a su principal característica, la eosinofilia, se las cataloga como LMA M4EO (M4 con eosinofilia) (Bennett, et al. 1985).



Figura 5. inv(16)(p13;q22). Se observa un cromosoma 16 normal (izquierda) y la inversión, que produce un cromosoma casi metacéntrico (derecha).

La inv(16)(p13;q22) produce un gen de fusión *CBFB-MYH11* que es un represor de la señal transcripcional activadora de AML1. . Esta proteína de fusión produce un secuestro del cofactor CBF β en el citoplasma, impidiendo su paso al núcleo, lo que impide la formación del CBF, necesario para activar genes esenciales en la diferenciación mieloide (figura 6)

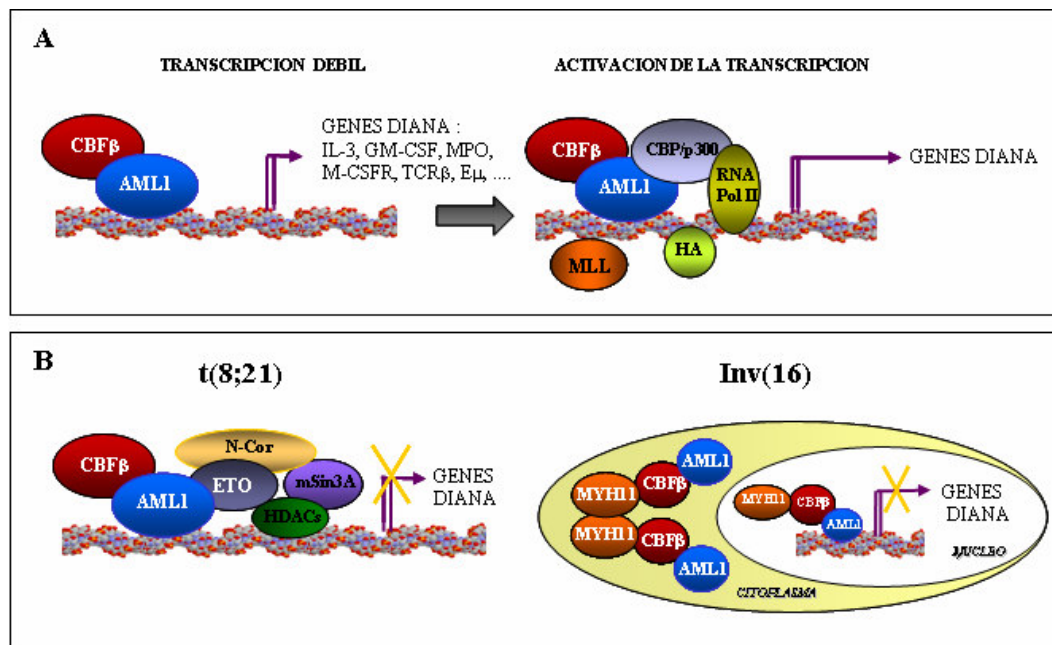


Figura 6. Diagrama de acción de las translocaciones que actúan sobre el complejo CBF. A. El complejo transcripcional CBF, formado por el heterodímero AML1/CBFβ se une al ADN a través de secuencias específicas localizadas en las regiones reguladoras de los genes cuya activación depende de este complejo transcripcional. La unión de estos factores al ADN es facilitada y mantenida por proteínas como MLL. Una vez unido el CBF, para producir una mayor activación de la transcripción, recluta proteínas co-activadoras como CBP/p300 que, además de asociarse a una actividad histona acetilasa (HA), interaccionan con la maquinaria transcripcional (RNA pol II). B. La fusión AML1/ETO inhibe la transcripción a través del reclutamiento de moléculas co-represoras como N-CoR y mSin3A, capaces de reclutar HDACs (Histonas deacetilasas). La fusión CBFβ/MYH11 se une a AML1 generándose dímeros e incluso oligómeros que atrapan el complejo transcripcional CBF en el citoplasma. Algunas moléculas híbridas son sin embargo capaces de llegar a unirse al ADN, pero su capacidad para activar la transcripción esta inhibida por la presencia de un dominio represor presente sólo en la proteína de fusión.

3.2.2. GRUPO DE RIESGO INTERMEDIO.

El grupo de riesgo intermedio es el más abundante en LMA. Representa aproximadamente el 75% de todas las leucemias, y se caracteriza una supervivencia global a los 5 años 24% de los pacientes. Sin embargo este grupo es muy heterogéneo que incluye tanto pacientes con supervivencias similares a las del grupo favorable, como casos con mala respuesta al tratamiento y supervivencias muy reducidas. Sin embargo no se han identificado alteraciones citogenéticas que los separen.

3.2.2.1. LMA con cariotipo normal (CN).

Las leucemias con cariotipo normal son las más numerosas de todas las leucemias *de novo*, y representan aproximadamente el 45% de todas ellas. Debido a que existe una gran cantidad de LMA sin patrones citogenéticos apreciables, se investigado otras aproximaciones a nivel molecular (detalle que se discute más adelante), tales como mutaciones génicas o modificaciones epigenéticas, para explicar las diferencias en la evolución y en la respuesta al tratamiento observadas en este grupo. Así mismo, una teoría con predicamento en los citogenetistas es que estas LMA con CN presentan alteraciones crípticas, por debajo del nivel de resolución del cariotipo, con lo que técnicas con mayor poder resolutivo podrían identificar nuevas anomalías.

3.2.2.2 LMA con trisomía 8.

La trisomía del cromosoma 8 es la alteración cromosómica más frecuente en leucemia mieloide aguda. Esta aneuploidía no es exclusiva de las LMA, sino que también se observa en los síndromes mielodisplásicos (Paulsson, et al. 2001). Es por tanto probable que su aparición tanto en estadíos preleucémicos como en LMAs dificulte su asociación con un determinado pronóstico. Así, dependiendo del grupo cooperativo elegido, la trisomía del cromosoma 8, por sí sola, confiere un pronóstico pobre (Byrd, et al. 2002; Jaff, et al. 2007) o no confiere pronóstico adicional al de un cariotipo normal (Grimwade, et al. 1998; Slovak, et al. 2000).

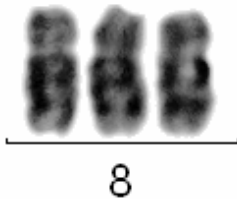


Figura 7. Trisomía del cromosoma 8. La trisomía del cromosoma 8 es la aberración más frecuente en la leucemia mieloide aguda.

3.2.3. GRUPO DE RIESGO ADVERSO

3.2.3.1- LMA con reordenamientos que implican el gen MLL.

MLL (*mixed lineage leukemia*, o leucemia de linaje mixto) es un gen que se ha demostrado implicado en el desarrollo de leucemias, tanto de tipo linfóide como mieloide. El gen *MLL* situado en la citobanda 11q23, es el homólogo al gen *tritorax*

de la especie *Drosophila melanogaster*, actuando directamente en el mantenimiento de la expresión de los genes *homeobox (HOX)* (Popovic and Zeleznik-Le 2005). A nivel patológico, los genes con los que MLL se transloca son muy numerosos, habiéndose detectado más de 50 diferentes translocaciones. Las proteínas de fusión generadas las cuales afectan la regulación de los genes *HOX*, llevando a una desregulación del clon leucémico (Daser and Rabbitts 2004). El nombre del gen *MLL* viene dado debido a que sus translocaciones pueden producir tanto leucemia mieloide aguda (adulta e infantil) como linfocítica aguda (infantil) (Slany 2005). En la LMA adulta, la translocación más frecuente de *MLL* es la t(9;11)(p22;q23), involucrando el gen *AF9* (Li, et al. 2005).

3.2.3.2 LMA con Cariotipo Complejo.

Con el nombre de LMA con cariotipo complejo se recoge un heterogéneo grupo de leucemias cuyo único denominador común es la presencia de un número mínimo de alteraciones en el cariotipo. Este número es diferente según el grupo cooperativo de referencia, aunque nosotros elegimos fundamentalmente los preceptos CALGB de tres alteraciones mínimas (Byrd, et al. 2002). Las leucemias de cariotipo complejo son las leucemias con peor pronóstico clínico de toda la enfermedad, representando aproximadamente un 10% de todas las leucemias mieloides agudas *de novo* (Alvarez and Cigudosa 2005). Además, la edad de los pacientes es singularmente más alta en este grupo que en el resto de las LMA. Existen algunas alteraciones cromosómicas observadas recurrentemente en este grupo de leucemias, como del(5q), del(7q) o del(17p).

3.2.4. EFECTO DE ALTERACIONES ADICIONALES EN LMA CON ALTERACIONES PRONÓSTICAS.

El efecto de las alteraciones adicionales en la leucemia mieloide aguda está por dilucidar. Los ensayos clásicos señalan claramente que leucemias con algunas alteraciones específicas que marcan un pronóstico (*PML-RARA*, *MLL*, etc.) no ven modificada esa expectativa por la aparición de una o varias alteraciones adicionales a la pronóstica. Por ejemplo, un cariotipo con inv(16)(p13;q22) y un número de alteraciones adicionales que le hacen ser un cariotipo complejo sería incluido *a priori* en el grupo favorable por presentar un marcador de riesgo favorable (Byrd, et al.

2002). Sin embargo existen excepciones a esta regla porque, según estudios de la SWOG, la supervivencia de las LMA con +8 como única aberración es superior al de las LMA con +8 y otras alteraciones. Este comportamiento no incluye LMA +8 con t(15;17)(q22;q21), donde el pronóstico es favorable(Wolman, et al. 2002). En definitiva, el efecto de alteraciones adicionales es cuestionable y no se sabe realmente si tienen una influencia clara.

Tabla 5: Pronóstico asignado por los tres principales estudios colaborativos en AML adulta

Aberración	MRC	SWOG/ECOG	CALGB
t(8;21)(q22;q22)	Favorable	Favorable	Favorable
inv(16)(p13q22)	Favorable	Favorable	Favorable
t(16;16)(p13q22)	Favorable	Favorable	Favorable
t(15;17)(q22;q21)	Favorable	Favorable	*
del(9q)	Intermedio	Adverso	Intermedio
Cariotipo normal	Intermedio	Intermedio	Intermedio
-Y	*	Intermedio	Intermedio
-5	Adverso	Adverso	*
del(5q)	Adverso	Adverso	Intermedio
-7	Adverso	Adverso	Adverso
del(7q)	*	Desconocido	Intermedio
t(9;11)(p22;q23)	Intermedio	Adverso	Intermedio
+11	*	Desconocido	Intermedio
del(11q)	*	Adverso	Intermedio
+13	*	Desconocido	Intermedio
del(20q)	*	Adverso	Intermedio
abn(12p)	*	Intermedio	Intermedio
+21	Intermedio	Desconocido	Intermedio
+8	Intermedio	Intermedio	Intermedio/Adverso
+8 más 1 abn	Intermedio	Intermedio	Intermedio/Adverso
t(6;9)(p23;q34)	*	Adverso	Adverso
t(6;11)(q27;q23)	Intermedio	Adverso	Adverso
t(11;19)(q23;p13,1)	Intermedio	Adverso	Adverso
t(9;22)(q34;11)	*	Adverso	*
inv(3)/t(3;3)	Adverso	Adverso	Adverso
Complejo (3+ abn)	**	Adverso	Adverso
Complejo (5+ abn)	Adverso	Adverso	Adverso

* No incluido en el estudio.

** El estudio MRC establece como complejo un caso con al menos 5 aberraciones.

3.3. LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

Debido a las limitaciones presentadas por la citogenética convencional, se han realizado diversos estudios buscando más marcadores genéticos que permitan una predicción de la enfermedad en aquellos casos sin pronóstico definido debido a presentar un cariotipo normal. Actualmente, la mutación de la kinasa *FLT3* en las leucemias mieloides, específicamente la duplicación en tándem interna de *FLT3* (*FLT3*-ITD), es considerada un marcador de pronóstico adverso en leucemias con cariotipo normal (Yanada, et al. 2005). Existen publicaciones que indican que la longitud de la duplicación es también un marcador pronóstico (Stirewalt, et al. 2006), pero hay una gran controversia en este aspecto puesto que otros grupos han observado lo contrario (Ponziani, et al. 2006). Aparte de esta mutación mayoritaria, existe otra mutación en *FLT3*, la mutación en el codon D835, cuyo efecto también parece adverso (Frohling, et al. 2002; Whitman, et al. 2007). Otras mutaciones genéticas están siendo estudiadas actualmente en el marco de la clínica. Se han asociado a buen pronóstico en el contexto de un cariotipo normal las mutaciones en *NPM1* (nucleofosmina), en ausencia de mutaciones de *FLT3* (Dohner, et al. 2005; Schnittger, et al. 2005) o las mutaciones del gen *CEBPA* (Frohling, et al. 2004). Otras aproximaciones han sido a través de la cuantificación de la expresión de genes como *BAALC*, cuya sobreexpresión esta asociada a un peor pronóstico (Baldu, et al. 2006).

Por otra parte, la genética molecular se está estableciendo como herramientas de preferencia y referencia en la detección y cuantificación de transcritos de genes de fusión, tales como *PML-RARA*, *AML1-ETO* o *CBFB-MYH11*, de una manera independiente y más sensible que la citogenética convencional, pudiéndose utilizar esta tecnología no solo en el diagnóstico sino también en el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) (Mrozek, et al. 2001)

3.4. LA GENÓMICA EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

La tecnología de micromatrices (comúnmente denominada como microarrays), que se basa fundamentalmente en la hibridación competitiva de dos grupos de ácidos nucleicos marcados diferencialmente sobre una matriz de puntos que representan

varias secuencia conocidas, ha sido utilizada para abordar diversas cuestiones. A comienzo del desarrollo del presente proyecto de tesis, existían tres aproximaciones basadas en herramientas genómicas: el análisis de expresión de ARNm (utilizando el array de ADN complementario), el análisis del cambio de número de copia en ADN (usando la herramienta inicial, la CGH, y su evolución, el microarray de CGH), y el análisis de regiones de pérdida de heterocigosidad (utilizando el microarray de SNP). Todas ellas han sido aplicadas con diverso éxito en la leucemia mieloide aguda.

El análisis de expresión a nivel de ARNm, realizado usando arrays de ADN complementario, comúnmente llamados arrays de expresión, se ha utilizado ampliamente en el estudio de la leucemia mieloide aguda (Golub, et al. 1999). Inicialmente estas plataformas permitieron establecer patrones de expresión específicos para subgrupos de LMA con determinadas alteraciones genéticas (Haferlach, et al. 2005b; Valk, et al. 2004). Sin embargo, la identificación de firmas de expresión dentro de subgrupos de LMA sin un marcador citogenético común ha resultado más difícil. Uno de los más amplios y rigurosos estudios realizados en esta línea permitió segregar dos poblaciones de LMA de cariotipo normal con diferente riesgo potencial basándose en su huella de expresión (Bullinger, et al. 2004). Esa información sobre las LMA de cariotipo normal fue completada por otros estudios, como por ejemplo el descubrimiento de un subgrupo de LMA CN con patrones de expresión similares a los de leucemias con translocaciones recurrentes de buen pronóstico (Vey, et al. 2004). Otros estudios incluyeron, por ejemplo, el grupo de cariotipos complejos (Schoch, et al. 2005), leucemia promielocítica aguda (Haferlach, et al. 2005a) o leucemias con trisomía del cromosoma 8 (Schoch, et al. 2006), observándose patrones de expresión diferenciales en función del marcador genético previamente identificado. Así pues estos trabajos no mejoran en la práctica clínica la estratificación pronóstica establecida en función de la citogenética al diagnóstico.

El análisis de cambio de número de copia es un procedimiento cuya base es la CGH (del inglés *comparative genomic hybridization*, o hibridación genómica comparada), una hibridación comparativa que se utiliza para medir cambios de número de copia de una muestra frente a un control, utilizando como molde de la hibridación una metafase sana (Kallioniemi, et al. 1992). Utilizando esta técnica, se realizaron varios

estudios en síndromes mielodisplásicos y LMA, incluyendo información de casos individuales. Las alteraciones más frecuentes observadas en LMA son las deleciones de 5q y 7q, seguidas de otras como 17p (Casas, et al. 2004; Castuma, et al. 2000; Kim, et al. 2001). Las amplificaciones no son comunes, si bien esporádicamente se han descrito amplificaciones de *MYC*, *MLL* (Casas, et al. 2004; Kim, et al. 2001) o *AML1* (Andersen, et al. 2005; Kirschnerova, et al. 2006). Tras el estudio utilizando CGH convencional, se produjo un nuevo sistema: el array-CGH, basado en la misma técnica comparativa, pero utilizando como molde un array donde estaban imprimidas las secuencias genómicas en cuestión. Esto suponía una mejora técnica en cuanto al análisis (se utilizaba un escáner que asociaba cada punto de hibridación a una información digital de su localización) y un incremento de la resolución (pasando de una citobanda en la CGH a escasas kilobases en el arrayCGH) (Pinkel, et al. 1998).

Los microarrays de CGH (denominados en esta memoria como array-CGH) han sido recientemente utilizados en el estudio de la LMA, pero ninguno de los estudios publicados ha permitido mejorar o establecer una nueva clasificación de grupos de riesgo dado que la mayoría de los estudios fueron realizados en series que sólo involucraban un grupo de LMA con marcadores citogenéticos específicos. Estos estudios se han centrado en el análisis de líneas celulares (Horsley, et al. 2006; Rucker, et al. 2006b), LMAs de cariotipos complejos (Rucker, et al. 2006a), LMAs con trisomía 8 (Paulsson, et al. 2006b), o en la caracterización de una sola muestra (Tchinda, et al. 2004; Tyybakinoja, et al. 2006).

La técnica de array-CGH también puede ser empleada para el análisis de regiones donde se haya producido pérdida de heterocigosidad (LOH). Para ellos se desarrollaron arrays en los que se fijaron secuencias diseñadas para detectar las variantes de polimorfismo de nucleótido simple (SNP en inglés), que denominaremos por analogía array-SNP. Se basa en una hibridación diferencial utilizando como oligos las diferentes variantes de una serie de SNP dispuestos sobre un array (Hacia, et al. 1999). Entre sus diversas utilidades, uno de los usos más interesantes del array-SNP es la obtención de datos de pérdida de heterocigosidad debidas a disomía uniparental (Teh, et al. 2005). La disomía uniparental implica una lesión genética inicial, produciendo la pérdida de un fragmento genómico, y su reparación mediante el patrón de la copia restante. El resultado de esta reparación es la obtención de dos

copias del mismo alelo, lo que puede tener gran importancia en mutaciones (se pierde el alelo salvaje y se repara con la copia mutada) o en la huella genética de un progenitor específico (Mascari, et al. 1992). A fecha del comienzo de este estudio, un grupo había publicado un artículo sobre regiones de pérdida de heterocigosidad en LMA. Utilizando fundamentalmente LMA de cariotipo normal, observaron una frecuente pérdida de heterocigosidad (aproximadamente 20% de las LMA estudiadas) debido a recombinación somática (Raghavan, et al. 2005). Actualmente, la cobertura de los array SNP se ha visto multiplicada, llegando a superar los cientos de miles de SNP para un solo individuo (Peiffer, et al. 2006).

A pesar de los avances tecnológicos desarrollados durante los últimos años que han permitido importantes mejoras en la caracterización de algunos tumores, en el caso de las LMA los estudios realizados no han mejorado la capacidad pronóstica de la citogenética convencional. Por ello, esta tecnología no se ha trasladado de un modo eficaz a la práctica clínica. Es por tanto necesario el estudio de series de pacientes clínica, citogenética y molecularmente bien caracterizados, para establecer nuevos sistemas de estratificación de riesgo.

OBJETIVOS

1. Caracterizar, mediante el empleo de array-CGH, la naturaleza y la frecuencia de las alteraciones genómicas (variaciones en el número de copia de ADN) presentes en una serie consecutiva de leucemia mieloide aguda *de novo*.
2. Analizar los patrones genómicos observados, su relación con otras variables genéticas y clínicas.
3. Comparar los sistemas de clasificación de riesgo citogénico con los patrones genómicos observados.
4. Llevar a cabo un estudio combinado de la integridad genómica de la leucemia mieloide aguda utilizando herramientas de análisis de número de copia y de pérdida de heterocigosidad.
5. Mediante ese análisis combinado, identificar nuevas regiones genómicas cuyo contenido pudiera ser de interés para la leucemia mieloide aguda, tanto por su empleo como herramienta de ayuda en el diagnóstico como por su posible valor terapéutico. En concreto:
 - 5.1. Identificación de genes candidatos contenidos en esas regiones.
 - 5.2 Validación de las regiones de interés utilizando series independientes con FISH e inmunohistoquímica

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL Y TÉCNICAS BÁSICAS.

1.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.

1.1.1. MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO MEDIANTE ARRAY-CGH.

Se recogieron retrospectivamente 140 aspirados medulares de pacientes adultos diagnosticados de leucemia mieloide aguda (LMA), que habían sido preservadas al diagnóstico en el departamento de Genética de la Universidad de Navarra. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. El modelo de selección de los pacientes se hizo en base a un estudio consecutivo, en un intento de ajustar la muestra de estudio a la incidencia de la enfermedad, cubriendo todos los grupos de riesgo citogenético.

Tras recoger las muestras, se procedió a la selección de las muestras, excluyéndose aquellas con reordenamientos *PML/RARA* (propios de leucemia promielocítica aguda), baja cantidad y/o calidad de ADN, o información clínica de mielodisplasia previa, exposición previa a drogas citotóxicas o radiación, o sin seguimiento clínico. De los 140 casos iniciales, 100 casos fueron utilizados para el estudio. Todos los pacientes habían sido tratados uniformemente de acuerdo al protocolo PETHEMA LAM99 (Suarez, et al. 2005). De los 100 casos, 14 pertenecían al grupo favorable, 76 al grupo intermedio y 12 al grupo adverso en la escala CALGB de riesgo citogenético. Aparte de los datos citogenéticos, se recogieron las siguientes variables clínicas: edad, recuento leucocitario en sangre periférica, niveles de lactato deshidrogenasa en sangre (LDH), presencia de infiltrados extramedulares, índice ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group Index*), presencia de mutaciones en *FLT3* (sólo para casos con cariotipo normal) y subtipo según la clasificación de la OMS.

Como control de la hibridación comparada se preparó un pool con ADN de 15 mujeres sanas para minimizar la detección de polimorfismos individuales.

1.1.2. MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO MEDIANTE ARRAY-SNP.

Se analizaron 16 muestras de ADN del total de 100 casos de LMA utilizados para el estudio previo, seleccionadas en función del grupo de riesgo al que se asociaban. Cuatro casos pertenecían al grupo de riesgo favorable, siete al grupo de riesgo intermedio y cinco al grupo de riesgo adverso.

1.1.3. MUESTRAS INCLUIDAS EN EL TISSUE MICROARRAY (TMA).

Se seleccionaron un total de 76 pacientes de LMA *de novo* para producir un tissue microarray que representara todos los grupos de la OMS relativos a la enfermedad. Nueve de ellos pertenecían al subtipo M0, 20 al M1, 10 al M2, 8 al M4, 11 al M5, 5 al M6 y 2 al M7. Se incluyeron casos con translocaciones específicas: 3 casos con t(8;21)(q22;q22), dos con inv(16)(p13;q22) y 6 con t(15;17)(q22;q21). Se dispuso de la historia clínica de todos ellos, incluyendo los datos de supervivencia. Además, se recogieron 20 controles medulares para ser utilizados como controles.

1.2. EXTRACCIÓN DE ADN.

La extracción de ADN se realizó utilizando *Qiagen Tissue DNA extraction Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído, la concentración y calidad del ADN fue medida utilizando un espectrofotómetro modelo Nanodrop. Además, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para comprobar la integridad del ADN.

1.3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CITOGÉNÉTICAS.

Para los estudios de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se obtuvieron suspensiones citogenéticas de casos con deleciones en regiones de interés. Brevemente, tras 24 horas de cultivo de 0.5 ml de médula ósea en 5 ml de medio RPMI+10%FBS, se detuvo la mitosis añadiendo colchicina al medio de cultivo (0.1 µg/ml, 1.5 horas, 37°C; GIBCO, Strachclyde, UK) para obtener un número elevado de células cuyo ciclo celular está detenido en metafase. Posteriormente, las células se sometieron a un choque hipotónico con KCl 75 mM, (30 min., 37°C) y finalmente se fijaron con metanol/acético (3:1) antes de hacer las extensiones sobre los portas.

1.4. PRODUCCIÓN DE TISSUE MICROARRAYS.

A partir de los pacientes seleccionados, se recogieron aspirados medulares de los mismos conservados en el fijador B5. Tras un estudio de hematoxilina-eosina, se extrajo de cada aspirado un cilindro de 1mm que incluyera un coágulo medular utilizable para FISH e inmunohistoquímica. Finalmente, se dispusieron 70 cilindros de LMA y 20 controles para producir el tissue microarray definitivo. Éste se cortó en secciones de 3 µm adheridas a cristal para ser utilizadas (Palacios, et al. 2003).

2. HERRAMIENTAS DE ARRAYS GENÓMICOS.

2. 1. ARRAY-CGH DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

El ADN de los pacientes de LMA fue hibridado en la plataforma comercial: *Agilent Human Genome CGH Microarray 44K* (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA). Esta plataforma contiene 44000 oligonucleótidos de 60 pb específicamente diseñados para array-CGH de alta resolución. Las oligonucleótidos están diseñados tanto en secuencias codificantes (exones) como no-codificantes (intrones y regiones intergénicas), pero evitando secuencias repetitivas. La resolución espacial tiene una mediana de 75 kb. Sin embargo, el array está centrado en el estudio de genes relacionados con cáncer, por ello hay al menos una sonda en los genes conocidos y hay tres sondas en los genes relacionados con cáncer. El protocolo de estos arrays está estandarizado por el fabricante (Barrett, et al. 2004).

2. 1. 1. DIGESTIÓN DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

El objetivo de la digestión enzimática es la obtención de fragmentos de ADN pequeños que permitan optimizar la reacción de marcaje con fluoróforos. Brevemente, se digirieron entre 0.5 y 2 µg de ADN genómico con las enzimas de restricción AluI y RsaI (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania) durante dos horas a 37°C. El ADN digerido se purificó con *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. A continuación se comprobó el estado del ADN digerido mediante gel de agarosa al 1%, cuantificando y midiendo su calidad utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop,

Wilmington, DE, USA), para comprobar si se conservó ADN en el proceso de purificación y si éste fue correctamente digerido.

2.1.2. MARCAJE MEDIANTE CEBADO ALEATORIO.

El marcaje se realizó con *Bioprime® Array-CGH Genomic Labeling System* (Invitrogen). Partiendo del paso anterior, se evaporó el ADN digerido para justar a un volumen final de 21 μ l. Éste se mezcló con 20 μ l de *2.5X Random Primer Mix* y se desnaturalizó a 95°C durante 5 min. A continuación, se introdujo la mezcla en hielo durante otros 5 min. Se añadieron 5 μ l de 10X DUTP mix, 3 μ l Cy3-dUTP (referencia) o Cy5- dUTP (muestras) y 1 μ l de enzima Exo-Klenow. La reacción se incubó tres horas a 37°C, y se detuvo tras ese tiempo usando una solución STOP incluida en el kit de marcaje (5 μ l de EDTA 0.5 M, pH 8).

El ADN marcado se purificó utilizando columnas microcon YM-30 (Millipore, Billerica, MA, USA). Para ello, se añadieron 450 μ l de TE 0.1% (Tris 10mM, EDTA 1mM), pH 8 a cada reacción de marcaje, se colocó la muestra en la columna y se centrifugó 8 min. a 9000 rpm, a temperatura ambiente. A continuación se invirtió la columna y se liberó el ADN centrifugando de nuevo 1 min 9000 rpm. La concentración de ADN y la incorporación de los fluorocromos se midieron con Nanodrop. Tras medir la calidad del marcaje, se mezclaron la muestra y la referencia en un tubo, utilizando los datos de marcaje para incorporar aproximadamente una dilución 1:1 de ADN muestra:referencia. Se añadieron 400 μ l de TE 0.1% y se concentraron en un nuevo Microcon YM-30, liberando el ADN en un microtubo (igual que el paso anterior). El ADN final se ajustó a un volumen de 150 μ l con TE.

2.1.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN.

Para la preparación de la solución de hibridación se utilizó el *Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit* (Agilent Technologies, Inc.). A la mezcla de ADN anterior se le añadieron 50 μ l de ADN Cot-1 humano (Invitrogen), 50 μ l de *Agilent Blocking Agent* y 250 μ l de tampón de hibridación 2x de Agilent. Esta solución de hibridación se desnaturalizó a 95°C durante 5 min. y se atemperó media hora a 37°C. Después se centrifugó 1 min. a velocidad máxima, para concentrar el líquido en el fondo del tubo.

2.1.4. HIBRIDACIÓN.

Se colocó el *gasket slide* (cristal sellado con una goma) en la cámara de hibridación. En ese *gasket* se aplicaron los 490 μ l de la sonda. A continuación colocó encima del *gasket* el array con el lado impreso hacia abajo, para que estuviera en contacto con la sonda. Se cerró la cámara de hibridación y se metió en el horno a 65°C y a 20 rpm durante 40 horas.

2.1.5. LAVADO DEL ARRAY HIBRIDADO.

Los tampones de lavado se produjeron con una mezcla de SSPE (0.5x para el tampón 1 y 0.1x para el 2) y N-lauroilsarcosina (0.005% para ambos). El día anterior a los lavados se prepararon los tampones de lavado: 2 litros de tampón 1 y 1 litro de tampón 2. El tampón 2 se precalentó en una estufa a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se sacaron las cámaras del horno, extrayendo el sándwich formado por *gasket* y array de la cámara de hibridación. Ese sándwich se sumergió en una cubeta con tampón 1 y se abrió con ayuda de unas pinzas, eliminando el *gasket*. El array se colocó en una gradilla sumergida en tampón 1 y se lavó con agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se pasó la gradilla a una cubeta con tampón 2 a 37°C y se lavó durante 1 min con agitación magnética. Se extrajo lentamente la gradilla de la solución 2 y se pasó a una cubeta con acetonitrilo puro (Romil, Cambridge, UK), donde se agitó manualmente durante 30 segundos. Por último, se extrajo lentamente la gradilla del acetonitrilo para eliminar todo el líquido posible de los cristales gracias a la tensión superficial.

El escaneo de los arrays se realizó en un escáner confocal, *Agilent Array Scanner* (Agilent Technologies Inc), obteniendo la emisión de fluorescencia de los dos fluoróforos.

2.1.6. TRATAMIENTO DE LAS IMÁGENES.

Las imágenes de los arrays se transformaron a intensidades de fluorescencia con el programa Feature Extraction, versión 9.1 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Para la normalización de los datos se utilizó una normalización lineal. Los datos del array se obtuvieron en formato \log_{10} del ratio de fluorescencia entre el Cy5 (rojo)/Cy3 (verde).

2.2. ARRAY DE SNP.

La plataforma de elección, el array HumanHap300, es un array basado en el sistema Illumina Infinium Beadchip (Illumina, San Diego, CA, USA). HumanHap300 es un sistema de genotipado que cubre todo el genoma, mapeando el mismo con más de 317000 sondas que reconocen polimorfismos de un único nucleótido (o *single nucleotide polymorphisms*, SNPs). En nuestro laboratorio, el objetivo de esta técnica consiste en la detección de cambios de número de copias y el de patrones de pérdida de heterocigosidad (LOH). El protocolo está automatizado con el uso de robots de pipeteo Tecan (Tecan, Männedorf, Suiza). Existen varias partes del protocolo: amplificación de la muestra, hibridación en la plataforma Beadchip, y lectura del array. Este protocolo se ha realizado íntegramente en el grupo de Genotipado del CNIO.

El protocolo Infinium precisa 250-750 ng de material genómico de partida, el cual se requiere que sea de alta calidad, ya que el ADN degradado (menor de 1kb) se amplifica menos eficientemente. Por ello, antes de la amplificación, se comprobó la calidad del ADN mediante gel de electroforesis. Para la amplificación se utilizó el kit Illumina de amplificación WGA (*whole genome amplification*, o amplificación genómica global), durante 20 horas a 37°C. Después de la amplificación, se realizó un protocolo de fragmentación para reducir el tamaño de los fragmentos a 200–300 pb, mejorando con ello la resuspensión del ADN y la eficiencia de la hibridación.

La detección del polimorfismo específico mediante array-SNP se hace utilizando cebadores específicos, que amplifican una señal con un fluoróforo determinado que depende de la base polimórfica que posea el ADN de partida. Para ello, existen 2 cebadores específicos del alelo de interés. Estos cebadores constan de un extremo 3' complementario a la secuencia próxima al polimorfismo y se diferencian entre sí exclusivamente en la última base (correspondiente al SNP), y de un extremo 5' que incorpora una secuencia para la unión de cebadores universales (P1 y P2, cada una ellas asociada a un distinto alelo) (figura 8). Además, existe un tercer cebador específico del locus, que desde el extremo 5' al 3' consta de: una secuencia específica de locus, una región que actúa como “secuencia señal” al ser

complementaria a la existente en cada uno de los diferentes puntos de genotipado y una secuencia para el anillamiento de cebadores universales (P3) (figura 8).

Una vez anillados estos oligonucleótidos a su correspondiente región, se inició mediante una ADN polimerasa la extensión a partir del extremo 3' de los oligonucleótidos específicos de alelos y la consiguiente ligación al cebador específico de locus. De esta forma, durante el proceso de extensión y ligación se generaron de forma simultánea unos moldes para todos los SNP del array.

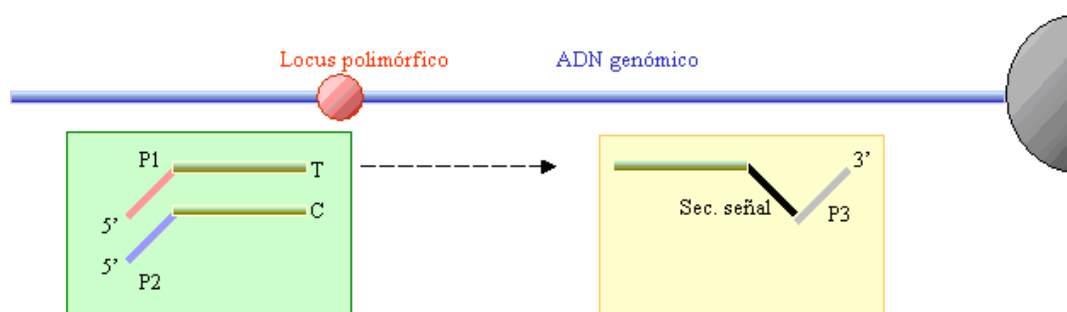


Figura 8. Generación del molde específico de alelo. Después de haber fijado el ADN genómico a un soporte sólido, y utilizando dos cebadores específicos de alelo (dentro del recuadro verde), un cebador específico de locus (dentro del recuadro amarillo) y una enzima polimerasa, se produce una extensión y ligación que produce un molde sintético. Este paso se realizó a 45° C durante 15 minutos.

Tras producirse los moldes, éstos se amplificaron utilizando tres cebadores específicos (figura 9): dos cebadores marcados cada uno de ellos con un fluorocromo (Cy3 y Cy5) complementarios a la zona P1 y P2 de los oligonucleótidos específicos de alelo respectivamente (figura 8) y un tercer cebador complementario a la zona P3 del cebador específico de locus.

Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial (37° C-10 minutos y 95°C-3 minutos), 35 ciclos de anillamiento (95°C 35 segundos), elongación (56°C 35 segundos) y extensión (72°C 2 minutos) y un paso final de elongación de 72°C durante 10 minutos.

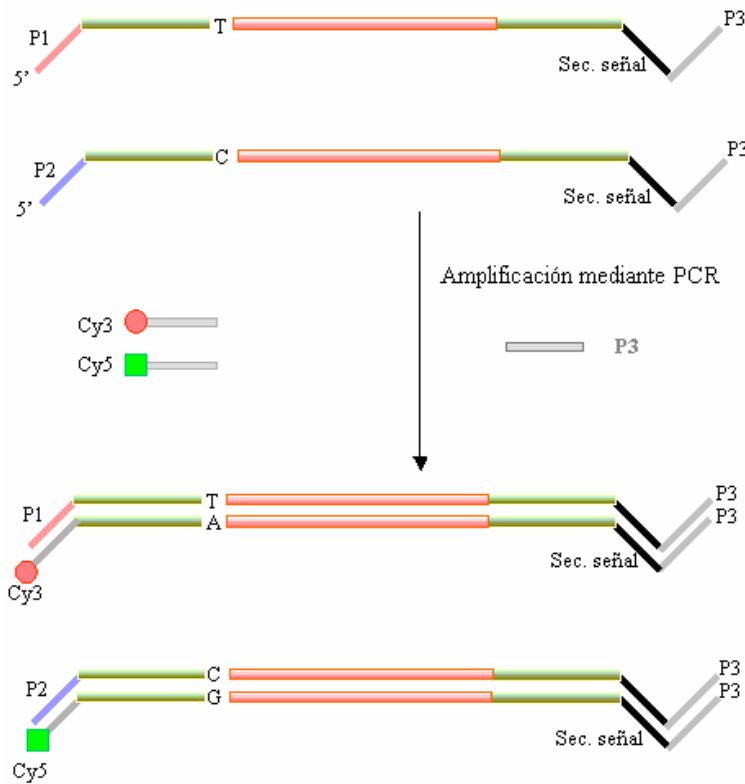


Figura 9. Amplificación por PCR del molde específico y marcaje dependiente de polimorfismo. En este caso, el locus que está siendo estudiado representaría a una muestra heterocigota, puesto que partimos de los dos posibles alelos (T y C). De esta forma, al utilizar los dos oligonucleótidos marcados con Cy3 y Cy5 y el oligonucleótido P3, se generan productos amplificados de ambos moldes.

Una vez realizada la PCR, se procedió a desnaturalizar los fragmentos amplificados y a retener las hebras que portan los fluorocromos. Estas últimas se hibridaron con las secuencias complementarias a la secuencia señal, localizadas en los distintos puntos del array. Dependiendo del genotipo de una muestra para un determinado polimorfismo, la razón entre la señal generada por el fluorocromo Cy3 y la generada por el fluorocromo Cy5 será distinta. A modo de ejemplo (figura 10), en el caso de estar genotipando muestras homocigotas AA únicamente se obtendría señal del fluorocromo Cy3, en muestras homocigotas GG obtendríamos señal sólo del fluorocromo Cy5 y por último en muestras heterocigotas la señal existiría señal de ambos fluorocromos.

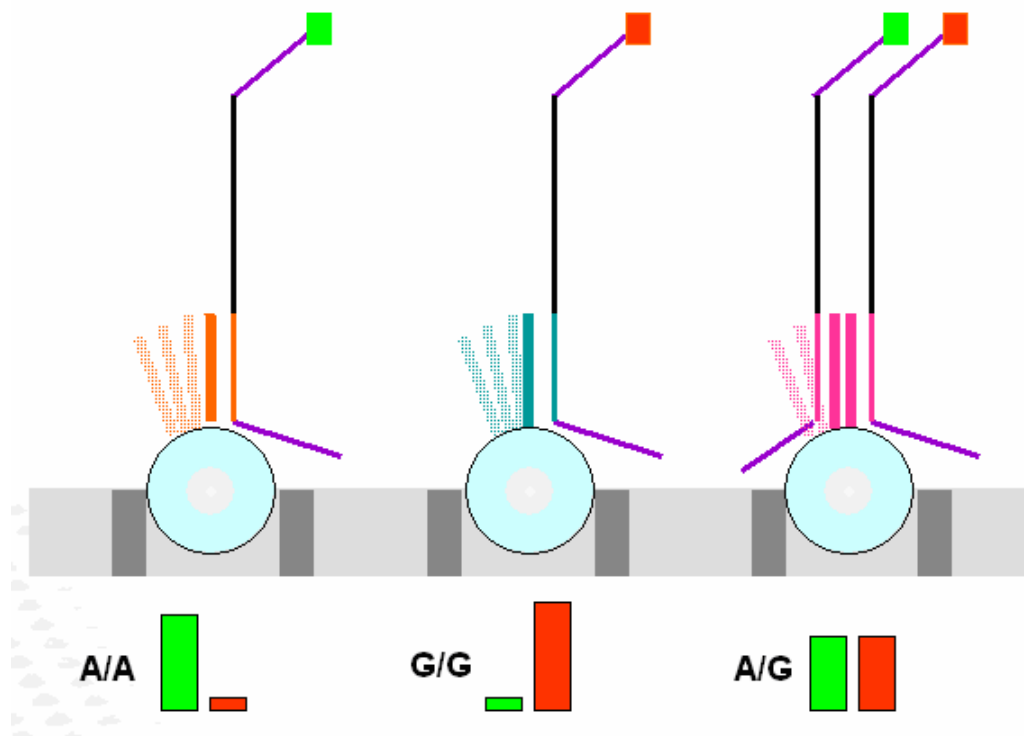


Figura 10. Ejemplo de hibridación en la plataforma Illumina. Durante la amplificación de los moldes se utilizan cebadores que al estar marcados fluorescentemente sirven para clasificar las muestras dentro de un determinado genotipo. A partir de las muestras homocigotas únicamente se han generado amplificados que llevan uno u otro fluorocromo, por lo que los homocigotos AA solo generan marcaje procedente de Cy5 y los homocigotos GG solo producen marcaje Cy3. Por otra parte, los heterocigotos presentan un equilibrio entre el marcaje de ambos fluorocromos.

Los Beadchips se escanearon utilizando un lector de BeadArray (figura 11), obteniendo las imágenes digitalizadas de los dos fluorocromos utilizados en el array. A continuación se realizó un cálculo de la intensidad de cada SNP utilizando las 30 réplicas situadas en el array para generar una mezcla del SNP A y el B. Los datos obtenidos son la información del SNP (cromosoma y localización), así como una estimación del número de copia, basada en la fluorescencia total de cada sonda relativa al conjunto completo del array analizado y una estimación de la pérdida de heterocigosidad, basada en la fluorescencia de un fluoróforo contra el otro.

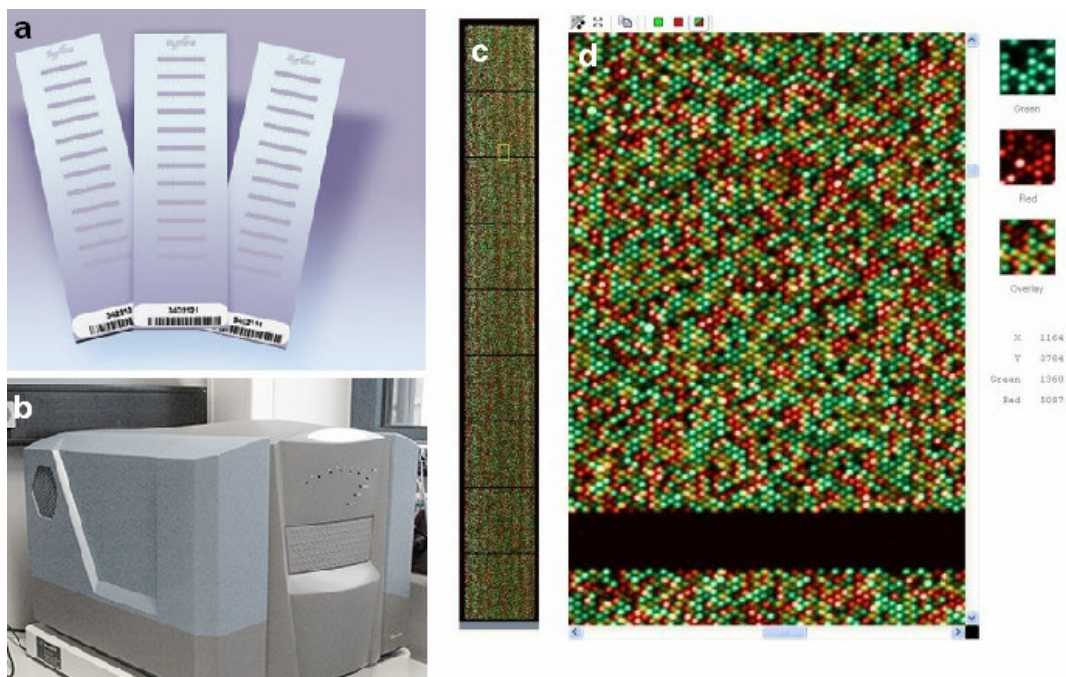


Figura 11. Escaneo del array HumanHap300. El array HumanHap hibridado (a), se escanea en un módulo Beadarray de Illumina (b). el escaneo se divide en cada una de las subsecciones del array (c). Cada uno de los puntos del detalle (d) se refiere a una sonda relativa a un SNP. Un exceso de rojo o verde indica predominancia de una de las variantes polimórficas.

2.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

2.3.1. ANÁLISIS DE CALIDAD Y VISUALIZACIÓN DE LOS ARRAYS DE CGH.

Los datos se visualizaron inicialmente utilizando el programa *Agilent CGH Analytics 3.2.25*. Este programa calcula la calidad de los arrays usando el algoritmo DLR Spread (*Derivative Log Ratio Spread*). El DLR Spread estima la dispersión del ruido del log ratio, calculando la dispersión que hay entre los diferenciales de log ratio entre dos clones consecutivos a lo largo de todo el cromosoma. Cuando el valor de DLR Spread es menor de 0.3 unidades, se considera que la hibridación es de buena calidad. Todas las hibridaciones con valores superiores a 0.3 fueron descartas del estudio. A continuación, se utilizó el CGH Analytics para visualizar los arrays con un visor de media corrida de 0.5Mb, obteniendo una imagen genómica de todos los resultados.

2.3.2. ANÁLISIS DE CALIDAD Y VISUALIZACIÓN DE LOS ARRAYS DE SNP.

Para este paso se utilizó el paquete informático Illumina Beadstudio versión 3 (Illumina, San Diego, CA, USA). La calidad se establecía previamente a la visualización con el mismo programa, calculando los porcentajes de fallo en el SNP y la desviación típica de la media de logaritmo del ratio relativa (al trabajar con un solo color, el logaritmo del ratio es artificial, ya que no se comparan dos colores sino que se realiza una medida sintética comparativa entre todos los puntos. Para la visualización de los arrays se utilizó también el Beadstudio, utilizando un visor de media corrida del array de 0.5Mb.

2.3.3. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS (VNC) Y DETERMINACIÓN DE LAS REGIONES.

Para ambas plataformas se utilizó un sistema estadístico para estimar las regiones de cambio de número de copia en nuestros casos del paquete informático GEPAS Suite (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) (Montaner, et al. 2006), que incluye el programa Insilico Array-CGH (Conde, et al. 2007). Este programa posee un algoritmo de estimación conocido como *Smoothing* (Jong, et al. 2004), que calcula el valor de número de copia de una región cuyos puntos están estadísticamente situados en el mismo umbral de valor de logratio. Esto permite obtener una tabla de datos que apantalla el ruido del array, y transforma los valores de hibridación individuales a un cálculo de regiones genómicas. Debido a que utilizamos arrays de CGH cuyos resultados se obtenían en logaritmo en base 10, decidimos establecer como umbral de región ganada el valor de VNC 0.10 (en \log_{10} , una relación muestra:control 1.25, o ganancia, es 0.097) y -0.10 para pérdida (aproximadamente relación muestra:control de 0.75). Una vez establecidos los umbrales, categorizamos los valores de los puntos del array a valores absolutos (ganancia como 1, pérdida como -1 y diploidía como 0 para cada clon). Los valores para los cromosomas sexuales fueron excluidos del análisis.

Para minimizar el número de datos en el estudio, se agruparon todos los puntos consecutivos con el mismo valor absoluto como una única región.

2.3.4. ELIMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE CAMBIO DE NÚMERO DE COPIA CONOCIDOS.

Con la aparición de técnicas genómicas más sensibles, se pudo realizar un mapa de regiones que pueden aparecer ganadas o perdidas en donantes sanos. Esas regiones fueron susceptibles de ser consideradas variantes genómicas, o polimorfismos de cambio número de copia. La página web *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>), del departamento de genética y biología genómica del centro MaRS (Toronto, Canadá) incluye la más actualizada base de datos sobre estos polimorfismos (Iafrate, et al. 2004). El procedimiento de filtrado de nuestra serie en base a las regiones descritas por la base de datos se realizó de tal manera que consideramos como región polimórfica (y por tanto eliminada del estudio) a toda región que tuviera un solapamiento mínimo del 80% con un polimorfismo descrito (sin importar el número de copia). Se utilizó una aproximación del constructo genómico 34 del NCBI (actualizada en diciembre de 2006) para los arrays de CGH y del 35 (actualizada en abril de 2007) para los array-SNP Illumina (debido a que las plataformas utilizaron esos respectivos constructos).

2.3.5. CÁLCULO DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH).

Para el cálculo de LOH en los arrays de SNPs de Illumina, utilizamos el software Beadstudio. El cálculo de las regiones con pérdida de heterocigosidad se realizó utilizando el algoritmo *LOH score* incluido en el software. Para el cálculo de las regiones se ajustó el algoritmo LOH para una ventana de 5 megabases, aceptando como positivas aquellas regiones con una media de *LOH score* mayor a 10 y con un contenido de 20 SNPs o más (y un mínimo de 500 kb de extensión). Los resultados positivos de LOH fueron validados utilizando el valor de la frecuencia alélica (*B Allele Frequency*) para cada SNP. Los cromosomas sexuales fueron excluidos del estudio de LOH.

2.3.6. ESTUDIO DE REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD (LOH NO PRODUCIDAS POR ENFERMEDAD) EN DONANTES SANOS.

Debido a la ausencia de bases de datos y de muestras parejas (sangre del paciente u otras muestras no tumorales) en los casos de LMA, nos vimos forzados a hibridar

200 casos de donantes sanos para eliminar polimorfismos de homocigosidad en el estudio de array-SNP. Se trabajo de igual manera que con los polimorfismos de número de copia.

2.3.7. DETERMINACIÓN DE LAS REGIONES MÍNIMAS RECURRENTES (RMR) DEL ESTUDIO (NÚMERO DE COPIA Y LOH).

Una vez se hubieron eliminado los polimorfismos presentes en la serie, se procedió a determinar las regiones mínimas del estudio. Cada región mínima representa una región alterada recurrente cuyos límites se definen con el número mínimo de clones consecutivos y alterados que están presentes en al menos dos casos. Es decir, que una RMR se determina con el número de clones que representan la región común más recurrente (que aparece en el mayor número de casos), como se muestra en la figura 12.

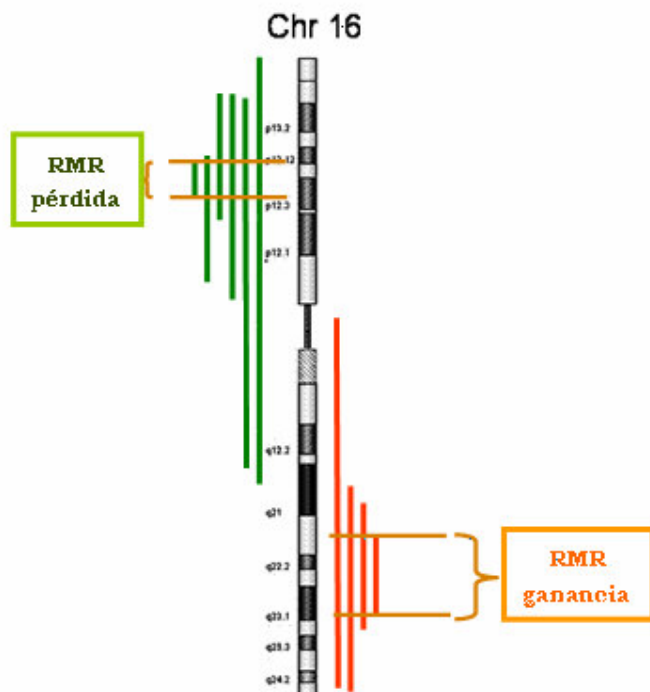


Figura 12. Ejemplo de determinación de regiones mínimas en el cromosoma 16. Las regiones mínimas (RMR) son aquellas aberraciones que representan a la mayoría de los casos, con el menor número de clones alterados. En el ejemplo, una RMR de pérdida genómica y una RMR de ganancia.

2.3.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DE AGRUPAMIENTO Y SELECCIÓN DE REGIONES CANDIDATAS EN ARRAY-CGH Y ARRAY-SNP.

Para los análisis bioinformáticas de agrupamiento (*clustering*) se utilizó el programa POMELO incluido en el paquete informático ASTERIAS, del CNIO (Díaz-Uriarte, et al. 2007). Esta herramienta permitió la identificación de regiones asociadas a grupos determinados en base a un parámetro de agrupamiento, como por ejemplo el diagnóstico citogenética o la estabilidad genómica. El estadístico utilizado, debido a que se trabajó con muestras absolutas (0, como ausencia de aberración en la región, 1 como presencia) fue el test exacto de Fisher. Se consideró una región como representativa de un grupo de una manera significativa cuando la *p* ajustada era inferior a 0.05 y el FDR (*false discovery rate*) era inferior a 0.10. Los genes candidatos en las regiones de interés fueron revisados usando las herramientas de la página del NCBI, en orden de conocer su función y su relación con el cáncer.

3. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH).

La hibridación *in situ* fluorescente permite la localización de secuencias de ADN específicas sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y tejidos congelados o parafinados. Esta técnica se basa en la hibridación de un fragmento de ADN marcado con un fluorocromo (sonda) sobre su secuencia complementaria del genoma de la muestra. Existen tres tipos de sondas:

1. Sondas centroméricas: hibridan con las regiones centroméricas de los cromosomas. Estas sondas permiten detectar alteraciones numéricas (ganancias o pérdidas de cromosomas enteros).
2. Sondas de pintado cromosómico: son aquellas que hibridan a lo largo de todo un cromosoma y permiten detectar alteraciones numéricas y estructurales sobre metafases.
3. Sondas de secuencia única: estas sondas hibridan con una región específica del cromosoma, que puede ser un gen u otra región.

Las sondas empleadas pueden ser comerciales para la detección de alteraciones típicas en el diagnóstico y sondas obtenidas a partir de cromosomas artificiales (BACs generalmente) que son marcados fluorescentemente mediante el método desplazamiento de la mella (*Nick translation*).

3.1. OBTENCIÓN DE SONDAS PARA FISH.

3.1.1. DISEÑO DE LAS SONDAS.

A partir de la secuenciación del genoma humano se ha generado una gran cantidad de información sobre librerías de clones, tanto localizados como secuenciados que son de gran utilidad en la citogenética molecular. Actualmente se puede obtener información de las regiones cromosómicas en distintas bases de datos: *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), *Nacional Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el buscador genómico de la Universidad de Santa Cruz de California (UCSC) (<http://www.genome.cse.ucsc.edu/index.html>). Estos buscadores permiten la localización de clones que cubran las regiones de interés, ya que muestran la posición relativa de los genes y los distintos BACs (cromosomas artificiales derivados de bacterias) y PACs (cromosomas artificiales derivados de P1). Los BACs son los más utilizados. Estos clones permiten el aislamiento de fragmentos de ADN plasmídico de entre 100-200 Kb que son lo suficientemente grandes para utilizarlos en estudios de FISH. Estos cromosomas artificiales se pueden adquirir fácilmente en *Children Hospital Oakland Research Institute* (<http://www.chori.org/bacpac/>).

3.1.2. CULTIVO DE LOS CLONES BACTERIANOS.

Los clones se suministran en LB sólido e inestable que limita su viabilidad. A partir de estos clones bacterianos se realizó un cultivo en medio sólido para el aislamiento de colonias, mediante una siembra por agotamiento de asa, a 37°C toda la noche. El medio utilizado fue LB (Luria Bertani, 10 g/l *Bacto-tryptone*, 7.5 g/l *Bacto Yeast Extract* y 10 g/l NaCl a pH 7.5) suplementado con cloranfenicol 20 µg/ml o kanamicina 25 µg/ml, dependiendo del tipo de clon utilizado. Para obtener una cantidad suficiente de ADN se seleccionó una de las colonias y se cultivó en 10 ml de LB líquido suplementado con antibiótico, durante toda la noche, a 37°C con agitación (250 rpm).

Para preservar los clones se congelaron dos viales de cada clon con 800 µl del cultivo líquido y 200 µl de glicerol estéril. Los sucesivos cultivos, con la intención de obtener más sonda, se realizaron a partir de estos reservorios.

3.1.3. EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.

La extracción de ADN plasmídico se realizó con el método de lisis alcalina. Brevemente, las bacterias se sometieron a una lisis de la membrana bacteriana. Después se solubilizaron las proteínas con un detergente y las membranas se precipitaron con isopropanol. Finalmente los plásmidos se precipitaron con acetato sódico y etanol absoluto. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se centrifugó el medio con las bacterias durante 10 min. a 4000 rpm. Tras ello, se descartó el sobrenadante.
2. Se resuspendió el pellet con 300 μ l de GTE (Glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH=8, EDTA 10 mM), transfiriendo la suspensión celular a un tubo limpio y a la que se añadió 600 μ l de solución alcalina (0.2 N NaOH, 1% SDS) recién hecha. Se mezcló por inversión varias veces y se incubó 5 min. en hielo.
3. Para separar las proteínas y el ADN bacteriano de los plásmidos, se añadieron 500 μ l de acetato amónico 7.5 M, mezclando por inversión inmediatamente y dejando la solución en hielo durante 10 min.
4. Se eliminó el precipitado formado centrifugando a 13000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se pasó un tubo limpio y se repitió este paso de nuevo.
5. El ADN plasmídico se precipitó añadiendo 700 μ l de isopropanol. El pellet de ADN se resuspendió en 100 μ l de agua y se trató con 1 μ l de ARNasa (10 mg/ml) durante media hora a 37°C para eliminar el ARN bacteriano que hubiera precipitado.
6. Tras la digestión de ARN contaminante, se volvió a precipitar los BACs con 1/10 volúmenes acetato sódico (3 M y pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto e incubando la solución a -80°C durante 20 min. Para obtener el ADN precipitado se centrifugó 15 min. a 14000 rpm y lavó con etanol 70%.
7. Finalmente, el ADN extraído y purificado se resuspendió en agua estéril (100 μ l). La concentración se midió en NanoDrop y se comprobó la calidad del extracto cargando 5 μ l en un gel de agarosa (1% m/v).

3.1.4. MARCAJE DE LA SONDA.

Una vez extraídos los ADN de interés, se procedió al marcaje mediante el método de desplazamiento de la mella (*nick translation*). Este marcaje es posible gracias a la acción de dos enzimas, ADNasa I y ADN polimerasa I de *Escherichia coli*. La ADNasa I tiene actividad endonucleasa, es capaz de producir mellas al azar en el ADN. Estas roturas permiten la adición de nuevos nucleótidos, que pueden estar conjugados con fluorocromos, mediado por la actividad polimerasa 5'→3' de la ADN polimerasa I. Al mismo tiempo se eliminan los nucleótidos adyacentes mediante la actividad 5'→3' exonucleasa de la polimerasa. De este modo la mella se va desplazando en sentido 5'→3' (Figura 13). Cuando se encuentran cortes en las dos hebras, el ADN se fragmenta. Como los fragmentos se producen al azar, el ADN se marca uniformemente.

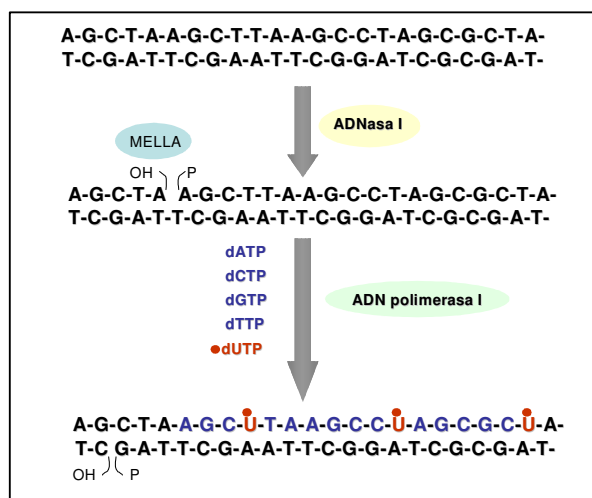


Figura 13. Marcaje de ADN mediante desplazamiento de la mella. La ADNasa I introduce mellas al eliminar el enlace fosfodiéster entre las bases; se genera un extremo 3'OH y un 5' con un fosfato libre. La ADN polimerasa incorpora los nuevos nucleótidos en sentido 5'→3' mientras va desplazando la mella eliminando nucleótidos a partir del extremo 5' libre.

El marcaje se realizó con *CGH Nick Translation Kit* (Vysis, Downers Grove, USA). Este kit incluye las enzimas ADNasa I y ADN polimerasa I, el tampón de reacción 10X y los dNTPs sin conjugar. Brevemente el protocolo es el siguiente:

1. Se preparó la mezcla de dNTPs 0.1 mM mezclando 10 µl de dATP 0.3 mM, 10 µl dGTP 0.3 mM y 10 µl dCTP 0.3 mM. También se preparó una solución de dTTP 0.1 mM diluyendo tres veces los dTTPs 0.3 mM con agua. Por último, se preparó el SpectrumGreen (SG) o SpectrumRed (SR) dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) 0.2mM. Se mezclaron los ingredientes como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6: Reacción de cebado aleatorio

ADN	X μ L
Tampón 10x	5 μ l
dNTPs 0.1mM	5 μ l
dTTP 0.1mM	5 μ l
SR/ SG dUTP 0.2mM	2 μ l
Enzimas	10 μ l
H ₂ O.	Y μ l
Volumen final	50 μ l

2. La mezcla se incubó durante 2 horas a 15°C. Después se cargó un gel de agarosa 1% (m/v) para comprobar que los fragmentos se encontraban 250 pb-1000 pb. En caso contrario, se incubaron 15 minutos adicionales y se volvió a analizar el estado de la mezcla.

3. Cuando los fragmentos se encontraron en el tamaño adecuado la mezcla se incubó a 70°C durante 10 min. para inactivar la enzima.

4. Después, el ADN se purificó con *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El ADN marcado se eluyó con 100 μ l de agua estéril a 65°C.

5. Finalmente, se precipitó la sonda junto con 20 μ l de Human Cot-1 ADN (1 μ g/ μ l) (Invitrogen), con etanol absoluto y acetato sódico (3 M, pH 5), se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 10 μ l de agua estéril.

3.2. PROTOCOLO DE FISH.

Los estudios de FISH fueron de dos tipos. Por una parte, la validación de las regiones representativas del estudio de array-CGH se realizó sobre suspensiones citogenéticas obtenidas de las médulas óseas de los pacientes. Por otra parte, se realizó un estudio independiente de la delección del gen NF1 en un tissue microarray (TMA) de coágulos leucémicos utilizando la técnica DakoFish (Dako, Glostrup, Dinamarca). Ambos procesos son similares y difieren únicamente en la preparación de la muestra para la FISH.

3.2.1. PREPARACIÓN DE LA SONDA.

Un μl de cada sonda se diluyó con 7 μl de tampón de hibridación LSI/WCP (Vysis Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA), que contiene dextrán sulfato, formamida y SSC pH 7, y 2 μl de agua. La mezcla de hibridación se incubó a 37°C durante una media hora para el pre-anillamiento.

3.2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

3.2.2.1. Envejecimiento de las suspensiones citogenéticas.

Las extensiones se envejecieron en una placa térmica a 90°C durante 10 min. Después se deshidrataron, pasando los portas por una serie de alcoholes de gradación creciente (70%, 80% y 100%) durante 3 min. en cada uno. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.2.2.2. Preparación tissue-microarrays utilizando el protocolo DAKO FISH kit modificado.

1. Fase de desparafinado: los cortes parafinados se introdujeron en Xilol 10 minutos a 65°C. Se sumergen otra vez en Xilol, 5 minutos a temperatura ambiente. Se hidrata la muestra pasando la misma por alcoholes 96%, 96%, 70% y 70% 2 minutos cada uno. Finalmente, se mantienen en Wash Buffer (suministrado por el kit) 2 minutos.

2. Tratamiento térmico: se introdujeron los cortes en un contenedor con solución de pretratamiento (suministrada por el kit) y se hirvieron en microondas durante 10 minutos (utilizar el programa 6° sentido). A continuación se dejó enfriar el contenedor sin tapa 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron dos veces en Wash Buffer 3 minutos cada uno.

3. Tratamiento con pepsina: se añadió la pepsina (suministrada por el kit) cubriendo el tejido y se colocó el porta en el hibridizador durante 12 minutos a 37°C. Tras ello, se lavó dos veces en Wash Buffer 3 minutos cada uno.

4. Deshidratación de la muestra: se pasó la muestra por un lavado de alcoholes en frío de concentración creciente: 70%, 85% y 96% 2 minutos cada uno. Dejar secar el portaobjetos 20 minutos como mínimo.

3.2.3. HIBRIDACIÓN, DESNATURALIZACIÓN E INCUBACIÓN.

La mezcla de hibridación previamente preparada se añadió sobre el portaobjetos, se colocó un cubreobjetos cuyo tamaño depende de la extensión del área de hibridación y se desnaturalizó en un solo paso tanto la sonda como la muestra, calentando los cristales a 75°C durante 1min. El portaobjetos hibridado se incubó toda la noche en una estufa a 37°C dentro de una cámara húmeda.

3.2.4. LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN.

En los experimentos de hibridación se producen uniones inespecíficas que se deben eliminar para que no interfieran de modo negativo en el análisis. La restricción de un lavado depende de la concentración de sales, la concentración de detergente y la temperatura. Un lavado será más restrictivo cuanto menor sea la concentración salina, mayor la de detergente y cuanta más alta sea la temperatura.

El primer lavado consistió en una solución de 0.4XSSC con 0.3% de NP-40 a 75°C durante dos minutos. Después se introdujo en otro coplin que contenía una solución de 2XSSC con 0.1% de NP.40 a T.A., 5 min. en agitación. Finalmente, se lavaron en tampón PWB1 (*Post Wash Buffer 1*, Kreatech Biotechnology) a T.A. Se dejó escurrir el exceso de PWB1.

Como tinción de contraste se utilizó una mezcla 1:1 de DAPI (Vysis Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA) y solución antidecaimiento o *antifade* (Qbiogene, Heidelberg, Alemania). El DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol) se intercala en el ADN y permite su visualización de color azul cuando se excita con una longitud de onda determinada.

3.2.5. CAPTURA Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES.

Para la captura de imágenes se utilizó un microscopio epifluorescente (Olympus AX60) acoplado a una cámara digital (Sensys). La captura y posterior análisis de las imágenes se realizó con el programa *CytoVision Image Analysis System software* (Applied Imaging, Newcastle, UK). Se analizaron entre 100 y 200 núcleos.

3.2.6. DESCRIPCIÓN DE LAS SONDAS UTILIZADAS.

La técnica FISH fue utilizada para la validación del resultado de número de copia en casos con delección detectada mediante array de CGH. Para realizar esta técnica, se utilizaron varias sondas comerciales: CEP17 (centrómero del 17, marcado en verde) y LSI TP53 (naranja) (todas las sondas fueron adquiridas en Vysis Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA). El resto de sondas fueron realizadas con el protocolo anterior. Los BACs utilizados y el fluoróforo utilizado están indicados en la tabla 7.

Tabla 7: BACs empleados para FISH

BAC	Citobanda	Marcaje
RP11-620I22	5q31.1	Verde ^a
RP11-215J02	5q31.1	Verde ^a
RP11-397H14	5q31.1	Verde ^a
RP11-518B17	17q11.2	Verde ^a /Rojo ^b
RP11-848P1	17q11.2	Rojo ^b
RP11-592F3	17q11.2	Rojo ^b
RP11-45H13	17q11.2	Rojo ^b
RP11-785C15	17q11.2	Rojo ^b

a Utilizado para suspensiones citogenéticas. b Utilizado para TMA.

4. SECUENCIACIÓN GENÓMICA

La secuenciación genómica es una técnica molecular que permite obtener con exactitud la información genética de una secuencia determinada, a nivel de número, posición y tipo de nucleótido (Sanger, et al. 1973).

La técnica se basa en una amplificación inicial mediante la técnica de la PCR para producir un amplicón que represente la secuencia nucleotídica del gen de elección. En concreto, nosotros utilizamos esta técnica para secuenciar el gen *TP53*, escogieron los exones 4-9 (tabla 8).

Tabla 8: Cebadores utilizados en la secuenciación del gen *TP53*

Exón	Cebador 5'	Cebador 3'	Amplicón (pb)
4	cctggtcctctgactgctct	tcacccttggcttctctgc	427
5	gtttctttgctgccgtcttc	tctgattcctactgattgctc	344
6	ctgctcagatagc gatggg	taaccccatgagatgtgcaa	340
7	ctgggcctgtgttatctcc	tccacctctcatcacatccc	260
8	aaatgggacaggtaggac	tgcaattatgcctcagat	259
9	aagcaagcaggacaagaagc	gcagtgatgcctcaaagaca	294

Las condiciones de la PCR fueron estándar para todos los exones, tanto en el cebador 5' como en el 3'. Los ciclos vienen indicados en la tabla 9:

Tabla 9: Protocolo de la PCR

Etapa	Nº Ciclos	Nombre	Temperatura	Tiempo
1	1	Desnaturalización	94	5 minutos
2	5	Desnaturalización	94	30 segundos
		Anillamiento	60	30 segundos
		Extensión	72	30 segundos
3	5	Desnaturalización	94	30 segundos
		Anillamiento	58	30 segundos
		Extensión	72	30 segundos
4	22	Desnaturalización	94	30 segundos
		Anillamiento	56	30 segundos
		Extensión	72	30 segundos
5	1	Fin de PCR	15	20 minutos

Una vez se obtuvo el amplicón, se comprobó mediante gel de agarosa al 1% que se obtiene una única banda que se ajusta al tamaño estimado del amplicón. Tras ello, se utilizó el ADN amplificado para ser secuenciado utilizando un secuenciador modelo Abiprism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La secuenciación fue realizada por el servicio de genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa Chromas 2.3 (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australia). Este programa transforma los datos de secuencia (imágenes de la fluorescencia de cada nucleótido que forma parte de la secuencia) en su respectivo nucleótido. Se compararon las secuencias de cada exón y caso, utilizando tanto el cebador 5' como el 3', con muestras sanas con ausencia de mutación. Al encontrar alguna discrepancia caso-control, se remitió la información a diferentes bases de datos de mutaciones de p53 y polimorfismos. Sólo se asumió una mutación siempre que alguna base de datos la indicara como una mutación recurrente de p53, o cuando producía un cambio de aminoácido que pudiera revertir en una proteína aberrante o con menor afinidad.

5. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Se recogieron coágulos de aspirados medulares conservados en el fijador B5. Tras el análisis del grumo medular mediante hematoxilina-eosina, se extrajo de cada aspirado un cilindro de 1mm. Se incluyeron 70 cilindros de LMA y 20 controles para producir el tissue microarray definitivo. Éste se cortó en secciones de 3 μ m. (Palacios, et al. 2003).

Los protocolos de inmunohistoquímica sobre el Tissue array de LMAs y sobre muestras de coágulos aisladas se realizaron en el grupo de histología e inmunohistoquímica. Tras desparafinar el corte a analizar sumergiéndolo dos veces en xilol durante 10 minutos, se sometió el mismo a concentraciones decrecientes de etanol (5 minutos etanol absoluto, 5 minutos en etanol al 95% y 5 minutos a 70%), para su deshidratación, introduciéndose finalmente en agua destilada.

A continuación, se realizó el bloqueo de peroxidasa endógena, incubando con peróxido de hidrógeno al 3% 5 minutos a temperatura ambiente, lavando la solución de bloqueo con PBS. Tras el bloqueo de peroxidasa endógena se bloquearon las proteínas endógenas incubando con albúmina 5-10 minutos a temperatura ambiente, lavando de nuevo con PBS.

Esa preparación preliminar fue sucedida por la adición del anticuerpo primario. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón diseñado para reconocer la zona amino terminal de la proteína neurofibromina humana (NF1); el anticuerpo, llamado MnNFn27b (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), se utilizó a una dilución 1:175 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavando el marcaje con PBS.

El anticuerpo secundario utilizado fue el polímero marcado con peroxidasa de rábano (HRP) del protocolo EnVision (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se realizó una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se lavó con PBS. Finalmente, se añadió la solución de substrato cromógeno DAB, dejándola incubar durante 10 minutos aproximadamente y lavando a continuación con agua destilada. Una vez teñido, se contratiñó la muestra con hematoxilina DAKO, dejando incubar

2-5 minutos y lavando de nuevo con agua destilada. Las preparaciones se montaron finalmente tras deshidratar la muestra con etanol y xilol.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para realizar los análisis estadísticos pertinentes, se utilizó el paquete comercial SPSS v13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Se realizaron tablas de contingencia utilizando el estadístico χ^2 para analizar las diferencias entre grupos en base a variables cualitativas, y los estadísticos U de Mann-Whitney y K de Kruskal-Wallis para las cualitativas. Para estudiar el efecto de los factores con potencial pronóstico en nuestra serie se realizó un análisis univariante de supervivencia (y una curva gráfica de Kaplan-Meyer). Los factores con una $p < 0.1$ en el univariante y los factores descritos previamente como marcadores de pronóstico (estado *FLT3* y recuento de leucocitos en sangre) se incluyeron en un modelo de regresión de Cox multivariante para hacer un estudio de supervivencia multifactorial. Todos los estudios de supervivencia se realizaron a un máximo de cinco años de seguimiento.

RESULTADOS

1. ESTUDIO GENÓMICO DE UNA SERIE DE LMA DE NOVO UTILIZANDO ARRAY-CGH.

1.1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LA SERIE.

Se analizaron las muestras al diagnóstico de 100 pacientes LMA *de novo* para el estudio. Los datos clínicos están representados en la tabla 10. La edad media se situó en torno a los 64 años, con un rango entre 20 y 86 años, indicando que más de la mitad de los pacientes eran mayores de 65 años. En cuanto al número de leucocitos sanguíneos, la mayoría de las muestras presentaban leucocitosis, con una mediana en torno a 16000 células por mililitro. Los datos de LDH fueron acordes a los números de leucocitos en sangre. Sólo ocho pacientes presentaron infiltrado extramedular. En cuanto a la calidad de vida de los pacientes (escala ECOG), más de la mitad presentaron índices bajos de incapacidad (0 o 1).

Tabla 10: Descripción clínica de la serie

		Subtipo OMS		n
Mediana (Rango)		t(8;21)(q22;q22)		4
		inv(16)(p13;q22)		10
		Alteración en 11q23 (MLL)		1
Edad (años)	64 (20-86)	M0		6
NLS(cels/10 ⁶ L)	15980 (1000-440000)	M1		19
LDH (UI/L)	780 (202-16764)	M2		17
		M4		12
Infiltrado Extramedular		M5		25
	Sí	8 (10)		
	No	75 (90)		
	Total Casos ⁽¹⁾	83 (100)		100
		M6		6
		Total Casos		100
ECOG		Clasificación citogenética₍₂₎		n (%)
	0	20 (25)	Favorable	14
	1	33 (41)	t(8;21)	4 (29)
	2	17 (21)	inv(16)	7 (50)
	3	8 (10)	inv(16) + otras aberraciones	3 (21)
	4	2 (3)	Intermedio	74
	Total Casos ⁽¹⁾	80 (100)	Cariotipo Normal	45 (61)
			Una trisomía	16 (21)
			Dos trisomias	3 (4)
			Otros	10 (14)
FLT3				n
	ITD		Adverso	12
	Sin mutación	79	Cariotipo complejo	8 (70)
	Total Casos	100	Otros	4 (30)

1) El número total de casos se restringe a aquellos con información específica sobre la variable clínica en cuestión

2) La clasificación ha sido realizada siguiendo los criterios de la CALGB

Como se puede comprobar en la tabla, la serie de 100 leucemias es una serie que representa los diferentes subtipos conocidos de esta enfermedad. La información clínica de los 100 casos seleccionados aparece en la tabla suplementaria 1.

1.2. DESCRIPCIÓN GENÓMICA DE LA SERIE.

La serie completa fue analizada para detectar alteraciones genéticas que suponen la pérdida o ganancia de fragmentos o regiones genómicas. Para ello, utilizamos una herramienta de análisis genómico, el array-CGH, compuesta de aproximadamente 44000 sondas. Esta densidad nos proporciona una mediana de resolución del genoma de 75 kb (descripción completa en material y métodos página 35). Es decir, con esta herramienta genómica pretendíamos tanto identificar pequeños cambios (deleciones, ganancias, amplificaciones) que no son visibles usando cariotipo (que tiene una resolución máxima de 5 megabases, unas 100 veces menor), como refinar alteraciones ya visibles a nivel cromosómico pero que, debido a su complejidad, escaparan a las técnicas citogenéticas clásicas.

Observamos alteraciones genómicas en más del 90% de los casos analizados. La mayoría de los cambios detectados tenían menos de 3Mb de tamaño, lo que las hacía indetectables usando técnicas convencionales de cariotipado. En el genoma humano aparecen, de forma natural, cambios genómicos (deleciones, ganancias, amplificaciones) de naturaleza polimórfica. Para determinar si los cambios que observamos correspondían a polimorfismos ya conocidos, realizamos un filtrado de los resultados con la base de datos *Database of Genomic Variants*, donde se recogen los polimorfismos de número de copia identificados a fecha de Diciembre de 2006. Identificamos 47 regiones polimórficas en nuestra serie (tabla suplementaria 2).

En 74 de las muestras analizadas observamos al menos una alteración genómica que originaba una variación en el número de copias (VNC), con una mediana de dos cambios por caso. Estos cambios se presentaban en todos los grupos citogenéticos, y en todos ellos se identificaron casos con alteraciones adicionales a las descritas utilizando la citogenética convencional (tabla suplementaria 3). En el grupo de riesgo favorable, el 80% de los casos presentaba alguna alteración adicional a las descritas en el cariotipo al diagnóstico (tabla 11). La mediana de número de cambios por caso en ese grupo era de 2, presentando un rango muy amplio: algunos casos no

presentaban ningún VNC, pero otros (como en un caso con inv(16)(p13;q22)) presentaban una gran cantidad de alteraciones (hasta 20 alteraciones genómicas), lo que sugiere un cariotipo de alta complejidad.

Los casos del grupo de riesgo intermedio fueron los que presentaron menor número de VNC de la serie. Un 60% de todos los casos del grupo de riesgo intermedio presentaba alguna alteración adicional, incluyendo el 59% de los casos (27 de 46) que presentaban un cariotipo normal al diagnóstico). El grupo más estable dentro de los casos del grupo de riesgo intermedio era el de la trisomía simple, un grupo que aglutinaba a todos los casos con una única alteración numérica, habitualmente una trisomía 8, si bien, el 56% de estos casos presentaban cambios adicionales. Además se estableció un tercer grupo que se denominó de “doble trisomía”, donde se incluyeron tres casos con dos trisomías cromosómicas (por ejemplo, +6 y +8). Estos casos resultaron ser muy inestables, observándose en todos cambios adicionales. Por último, el resto de los casos intermedios con alteraciones citogenéticas poco recurrentes en la serie a estudio fueron agrupados observándose en un 80% de los casos VNC no detectadas mediante citogenética convencional..

Tabla 11. Información genómica de la serie dentro de los grupos de riesgo de la CALGB

Clasificación Citogenética	n	Casos con cambios adicionales (%)	Mediana de cambios por caso (rango)
Favorable	14	11 (79)	2
	inv(16)	8 (80)	3 (0-20)
	t(8;21)	3 (75)	2 (0-3)
Intermedio	74	44 (60)	1
	Cariotipo Normal	27 (59)	1 (0-16)
	Trisomía	9 (56)	2 (1-5)
	Doble Trisomía	3 (100)	3 (3-7)
	Otros	7 (78)	3 (0-5)
Adverso	12	10 (83)	7.5
	Complejo	7 (88)	11 (4-35)
	Otros	3 (75)	2.5 (1-10)

Entre los casos incluidos en el grupo de pronóstico adverso se observó el mayor porcentaje de VNC. En las LMA de cariotipo complejo, un 90% de las mismas presentó cambios adicionales a los observados mediante citogenética convencional. Además, el array-CGH permitió clarificar esos cambios, observando patrones de complejidad aún mayores al aumentar la resolución.

1.3. DESARROLLO DE LA CLASIFICACIÓN GENÓMICA.

Dada la baja recurrencia en cuanto a regiones alteradas, y la presencia en todos los grupos citogenéticos de VNC, se decidió distribuir los casos de acuerdo al número de alteraciones genómicas (un gran número de casos tenía un número pequeño de alteraciones, y a medida que éstas aumentaban por caso, la frecuencia disminuía). Para segregar la serie se adoptó un criterio estadístico: se separaron grupos en función de la mediana de número de alteraciones por caso (figura 14). Como la mediana era 2, se separaron dos grupos, un grupo de 0-1 aberraciones (46 casos) y otro de 2 o más aberraciones (54). Como este segundo grupo seguía siendo muy heterogéneo, se subdividió usando como corte la mediana del mismo relativa al número de cambios por caso (en este caso era 4). Así, se estableció un grupo de 0-1 aberraciones que se denominó grupo estable, y un segundo de 2 o más, el cuál se subdividió en un primer subgrupo de 2-3 aberraciones por caso (30 casos) denominado grupo inestable y un segundo subgrupo, mucho más complejo, de 4 o más aberraciones por caso (24 casos) denominado grupo de alta inestabilidad.

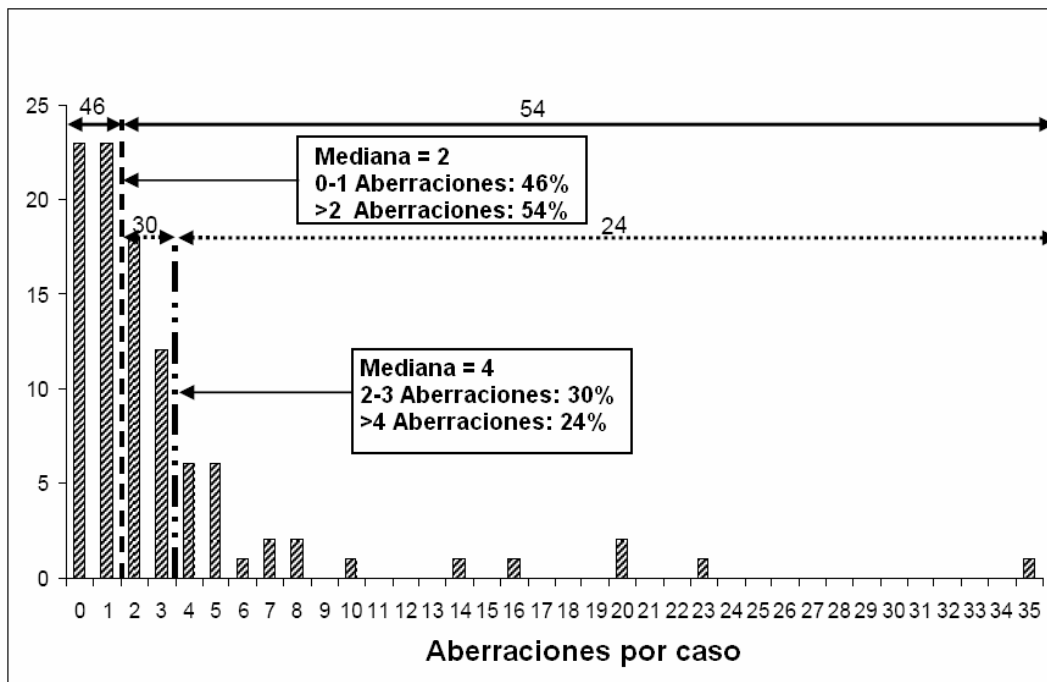


Figura 14. Frecuencia de alteraciones por caso y grupos de frecuencia

1.4. COMPARACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN GENÓMICA CON LA CITOGENÉTICA.

Una vez establecida la clasificación basada en el número de alteraciones por caso, obteniendo tres grupos diferenciados por patrones estadísticos, decidimos realizar una comparación de esta clasificación con la previa clasificación citogenética, con el objetivo de comprobar si existía una predisposición de determinados grupos citogenéticos a ser más o menos estables (tabla 12). Al comparar en detalle las dos clasificaciones, comprobamos que el 70% de los casos clasificados en la CALGB como casos de riesgo favorable estaban incluidos en los grupos genómicos con un alto número de VNC. Dentro de ese grupo había 5 casos incluidos en el subgrupo de alta inestabilidad. Estos casos previamente incluidos en el grupo de riesgo favorable presentaban un número de alteraciones tan elevado como el observado en los casos del grupo de cariotipos complejos. En relación al grupo de pronóstico intermedio, observamos que un 55% de los casos presentaba un genoma estable. Sin embargo, se observó en el 30% de los casos del subgrupo citogenético de cariotipos normales un genoma inestable.

Estas observaciones nos permitieron concluir que la clasificación genómica distribuía los casos de LMA analizados de una manera diferente a la distribución realizada en función de las alteraciones citogenéticas. El grupo genómicamente estable incluía casos del grupo de riesgo favorable, y del intermedio. Esta redistribución supuso que el grupo genómicamente estable triplicara en número la serie del grupo favorable.

Tabla 112: Relación entre la clasificación citogenética y los grupos de inestabilidad

Clasificación Citogenética	n	Estables (%)	Moderadamente inestables (%)	Alta inestabilidad (%)
Favorable	14	4 (28)	5 (36)	5 (36)
inv(16)	10	3	2	5
t(8;21)	4	1	3	0
Intermedio	74	41 (55)	23 (31)	10 (14)
Cariotipo Normal	46	32	11	3
Trisomía	16	7	7	2
Doble Trisomía	3	0	2	1
Otros	9	2	3	4
Adverso	12	1 (8)	2 (17)	9 (75)
Complejo	8	0	0	8
Otros	4	1	2	1
TOTAL	100	46	30	24

1.5. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN LMA.

1.5.1. IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y GENÓMICAS EN LA SUPERVIVENCIA UTILIZANDO EL TEST UNIVARIANTE DE LOG-RANK.

1.5.1.1. Estudio de las variables clínicas y genómicas sobre la cohorte completa.

Para establecer el valor en la estimación del pronóstico de la clasificación genómica, y estudiar si esta clasificación era independiente de la clasificación citogenética convencional, estimamos la asociación entre la supervivencia a cinco años con una serie de factores que tenían potencial pronóstico en nuestra serie para estimar su potencial predictivo (tabla 13). Se realizaron análisis univariantes de supervivencia utilizando el test log-rank y curvas de Kaplan-Meyer. Se confirmó la conocida asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la citogenética y de la edad al diagnóstico, con la supervivencia global en la serie analizada.

Tabla 13: Estudio univariante de los factores pronóstico sobre la cohorte completa

Factor pronóstico	n	%SG	Mediana	95% IC	p
Edad al diagnóstico					0.017
<60 años	34	44.1	12.8	0-26.4	
>60 años	57	22.8	6.1	3.2-9.0	
Género					0.513
Masculino	49	28.6	6.1	1.1-11.0	
Femenino	42	33.3	11	5.9-17.3	
Nº de leuc. en sangre ($\times 10^9/L$)					0.284
<30	54	33.3	11.6	5.9-17.3	
>30	33	27.3	4.6	0.1-9.1	
LDH (UI/L)					0.436
<380	36	36.1	12.1	4.8-19.5	
>380	43	27.9	7.4	4.7-10.1	
FLT3 (sólo cariotipo normal)					0.292
No mutación	28	44.4	12.8	0-26.5	
Duplicación Interna en Tándem	14	21.4	7.1	0.9-13.4	
Citogenética					0.026
Favorable	12	41.7	36.7	0-89.5	
Intermedio	68	32.4	8.4	4-12.9	
Adverso	11	9.1	6.8	0-13.8	
Estabilidad (dos grupos)					0.007
0-1 Aberraciones	43	44.2	12.7	0-25.6	
2+ Aberraciones	48	18.2	4.8	3.5-8.4	
Estabilidad (tres grupos)					0.002
0-1 Aberraciones	43	44.2	12.7	0-25.6	
2-3 Aberraciones	26	23.7	7.1	0-18.1	
4+ Aberraciones	22	13.6	4.8	1.5-8.1	

El primer factor positivo, la edad al diagnóstico, mostraba que un paciente más mayor tenía un peor curso en la enfermedad a cinco años (figura 15a). En el caso de la clasificación citogenética, comprobamos que los tres grupos generales, llamados favorable, intermedio y adverso, se comportaban de acuerdo a estudios previos tanto en el porcentaje como en la predicción de la supervivencia global (figura 15b).

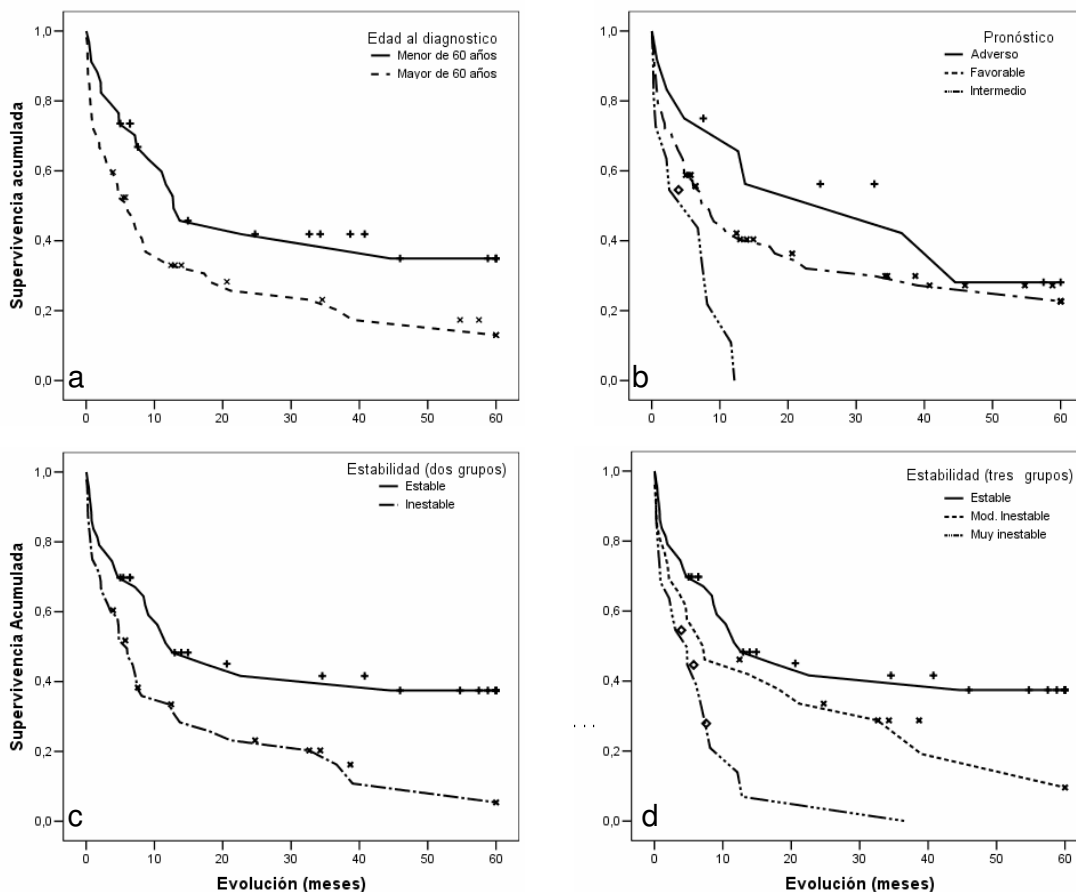


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meyer basadas en la supervivencia global a 5 años. Los datos censurados se muestran como “+” y equis (para dos grupos) y diamantes (para tres grupos). La información del test log-rank para cada uno de los factores indicados viene incluida en la tabla 13.

Para estudiar el efecto de la estabilidad genómica en la supervivencia global realizamos dos tipos de segregación de pacientes. En primer lugar, dividimos nuestros pacientes en dos grupos según la mediana general del número de alteraciones (2 cambios por caso): grupo de genoma estable (0-1 cambio) e inestable (más de 2 cambios). El análisis de nuestra clasificación genómica en dos grupos, mostró una asociación significativa con diferencias en el pronóstico a cinco años ($p=0.015$): los casos con un genoma más aberrante tenían peor pronóstico a cinco

años que los casos con un cariotipo más estable (figura 15c). Además, el grupo de mejor pronóstico triplicaba el tamaño del grupo citogenético de riesgo favorable manteniendo el mismo porcentaje de supervivencia global que este (43 frente a 12).

En segundo lugar, al dividir el grupo más inestable en dos (clasificación genómica de tres grupos) y trabajar con los tres grupos de estabilidad (0-1 cambio, grupo estable; 2-3 cambios, grupo inestable; 4 o más cambios, grupo de alta inestabilidad) obtuvimos resultados de supervivencia similares a los tres grupos citogenéticos (figura 15d). Sin embargo, es muy importante señalar que el tamaño de los grupos se había modificado de forma sustancial: el grupo de 2-3 alteraciones genómicas, similar en supervivencia al grupo citogenético de riesgo intermedio, constaba de 26 casos (frente a los 68 del grupo intermedio), y el grupo altamente inestable (más de 3 aberraciones) duplicaba el tamaño del grupo citogenético de pronóstico adverso.

1.5.1.2. Estudio de las variables clínicas y genómicas sobre el grupo de LMA de cariotipo normal.

Se seleccionaron todos los casos cuyo cariotipo no mostraba alteraciones (cariotipo normal). De todos ellos (46), se seleccionaron aquellos con información clínica relativa la supervivencia y se realizaron test univariantes para los mismos factores potenciales que en el estudio sobre la cohorte completa (exceptuando la clasificación genómica de tres grupos, debido a que el número de casos con más de tres aberraciones era inferior a cinco). En este estudio, solamente la clasificación genómica de dos grupos era un factor estadísticamente significativo (tabla 14), observando que, al igual que en la cohorte completa, una mayor inestabilidad genómica conlleva a un peor pronóstico a cinco años.

Tabla 14: Estudio univariante de los factores pronósticos sobre los casos con cariotipo normal

Factor pronóstico	n	%SG	Mediana	95% IC	p
Edad al diagnóstico					0.124
<60 años	15	53.3	22.6	5.0-39.9	
>60 años	27	25.9	7.1	1.1-13	
Género					0.973
Masculino	24	37.5	10.4	2.8-18.0	
Femenino	18	33.3	8.4	0-32.1	
Nº de leuc. en sangre (x10 ⁹ /L)					0.520
<30	21	42.9	17.3	9.2-25.4	
>30	19	31.6	7.1	0.5-13.6	
LDH (UI/L)					0.109
<380	17	52.9	60	0-142.1	
>380	22	27.3	8.4	3.9-12.9	
FLT3					0.294
No mutación	28	42.9	12.8	0-26.5	
Duplicación Interna en Tándem	14	21.4	7.1	0.9-13.4	
Estabilidad (dos grupos)					0.045
0-1 Aberraciones	30	46.7	11.0	0-23.71	
2+ Aberraciones	12	8.3	4.6	0-12.5	

1.5.2. INDEPENDENCIA DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y GENÓMICAS EN LA SUPERVIVENCIA UTILIZANDO EL TEST MULTIVARIANTE DE COX.

Utilizando la misma información clínica de la cohorte completa, se realizó un test multivariante de Cox para asegurar la independencia de las variables significativas en los test univariantes. Se utilizaron los factores cuyo test univariante era significativo (edad, citogenética y estabilidad genómica) y aquellos factores que, pese a no ser significativos, tienen valor pronóstico en estudios previos (número de leucocitos en sangre y mutaciones en *FLT3*). Se realizaron tres test de Cox: uno en ausencia del factor pronóstico estabilidad, otro incluyendo la clasificación de estabilidad de dos grupos y un tercero incluyendo la clasificación de estabilidad de tres grupos (tabla 15).

Tabla 15: Estudio multivariante de los factores pronóstico seleccionados sobre la cohorte completa

Variable	Tipo de clasificación de estabilidad								
	Sin Estabilidad			Dos grupos			Tres grupos		
	B	Exp B	p-value	B	Exp B	p-value	B	Exp B	p-value
NLS (10 ⁹ /L)	0.450	1.569	.115	0.661	1.937	.029	0.653	1.921	.031
Edad	0.548	1.732	.059	0.456	1.578	.131	0.565	1.760	.067
FLT3-ITD	0.015	0.758	.403	0.148	1.159	.675	0.200	1.222	.570
Citogenética	0.646	1.908	.033	0.627	1.873	.030	0.382	1.46	.181
Estabilidad	-	-	-	0.887	2.428	.003	0.638	1.892	.001

NLS: número de leucocitos en sangre

En ausencia de la clasificación basada en la estabilidad, se observó que la clasificación citogenética era, para nuestra serie, el único factor independiente en este estudio multifactorial. Al incluir la clasificación basada en la estabilidad, aparecieron como factores independientes el número de leucocitos en sangre, la clasificación citogenética y la estabilidad. Es decir, que un genoma más inestable es sinónimo de un peor pronóstico, pero de manera independiente con respecto a los sistemas de clasificación previos, como el citogenético. Este evento se observó tanto en la clasificación de dos grupos como en la de tres. El incremento del riesgo relativo al tener un cariotipo más inestable era de 2.43 veces (en la clasificación de dos grupos) y de 1.892 (en la de tres grupos).

1.6. DEFINICIÓN DE LAS REGIONES MÍNIMAS RECURRENTES (RMR).

El análisis de las regiones alteradas en nuestra serie mostró que las regiones de ganancia o pérdida genómica se distribuían de forma muy dispersa, cubriendo todos los cromosomas (menos los sexuales, que fueron eliminados del estudio). Identificamos 92 regiones mínimas recurrentes, que incluían 62 pérdidas y 30 ganancias. La frecuencia de las RMR tenía un rango de 2 a 15%. Se encontraron seis regiones aberrantes con un porcentaje de recurrencia superior al 5%. De ellas, cinco se correspondían a regiones mínimas delecionadas menores de 2Mb, localizadas en los cromosomas 5q31.1, 7p11.2 7q36.1, 17q11.2 y 20q13.12. La única ganancia se correspondía a la trisomía del cromosoma 8, y representaba el cambio más recurrente (15%). La mediana de tamaño de las RMR era de 243Kb para las ganancias y de 364Kb para las pérdidas. La descripción de todas las RMR analizadas está incluida en la tabla suplementaria 4.

Una vez identificadas las RMR, evaluamos si existía un patrón de regiones mínimas relacionado con la inestabilidad genómica antes definida en grupos. Tras realizar un análisis supervisado, pudimos identificar cinco regiones de interés (RMR-representativas, o RMR-r), que diferenciaban claramente a los casos con cuatro o más aberraciones de manera significativa ($p < 0.05$) (tabla 16). Estas RMR-r se correspondían a deleciones, y se localizaron en los cromosomas 5, 16 (dos regiones), 17 y 18. Dos de estas regiones (5 y 17) fueron validadas por técnicas de FISH (figura

16). El tamaño de las deleciones era variable oscilando desde unas pocas kilobases (16q24) a 6 megabases (en la región 18p11.2). A pesar de la escasa recurrencia encontrada en la muestra de LMA, 38% de los casos (9 de 24) con alta inestabilidad (4 aberraciones o más) tenían deleción en alguna de las RMR-r.

Por último, quisimos comprobar el efecto pronóstico de las regiones mínimas representativas que caracterizaban el grupo de alta inestabilidad genómica. Para ello elaboramos un análisis de presencia de deleción en cualquiera de las 5 RMR-r frente a la ausencia de ella, y utilizamos este criterio como factor en un test univariante. Los casos que mostraron deleción en alguna de esas regiones mostraron un comportamiento más agresivo que el resto de casos, presentando un peor pronóstico a cinco años. En efecto, la supervivencia de este grupo (10 pacientes) era sólo del 10%, tres veces menor que la del resto de la serie, en la que se observaba una supervivencia a los 5 años del 33% (81 pacientes). Estos resultados nos permiten afirmar que las deleciones en las que afectan a cualquiera de las 5 RMRs identificadas son un factor de mal pronóstico.

Tabla 16: RMR-r con asociación significativa con grupos de pronóstico citogenéticos y genómicos

RMR-r	Inicio (pb)	Tam	Frecuencia	Casos	Genes
5q31.1	133526865	735 kb	6% casos totales 42% grupo adverso* 21% casos \geq 4 AG*	23, 53, 59, 90, 82, 86	<i>PPP2CA, UBE2B, CDKL3, SKP1A, PHF15, SARA2, SEC24A, CAMLG, DDX46</i>
16q23.1	73304503	269 kb	4% casos totales 25% grupo adverso* 17% casos \geq 4 AG*	23, 72, 80, 86	<i>FA2H, WDR59</i>
16q24.2	87305787	32 kb	4% casos totales 25% grupo adverso* 17% casos \geq 4 AG*	23, 72, 82, 86	<i>LOC348180, FAM38A</i>
17q11.2	25747113	1.5 Mb	7% casos totales 42% grupo adverso* 30% casos \geq 4 AG*	5, 23, 72, 80, 82, 86, 99	<i>CPD, GOSR1, SUZI2P, CRLF3, CENTA2, NF1, RAB11FIP4, HCA66</i>
18p11.2	7428812	6.4 Mb	4% casos totales 25% grupo adverso 17% casos \geq 4 AG*	12, 23, 72, 80	<i>PTPRM, NDUFV2, TWSG1, RALBP1, PPP4R1, RAB31, VAPA, APCDD1, NAPG, GNAL, CHMP1B, IMPA2, CIDEA, AFG3L2, SPIRE1, TNFSF5IP1, PTPN2, SEH1L, C18orf1, RNMT, MC5R</i>

RMR-r: región mínima recurrente representativa.

Tam (tamaño)

Las cinco regiones son pérdidas.

* Asociación estadística significativa

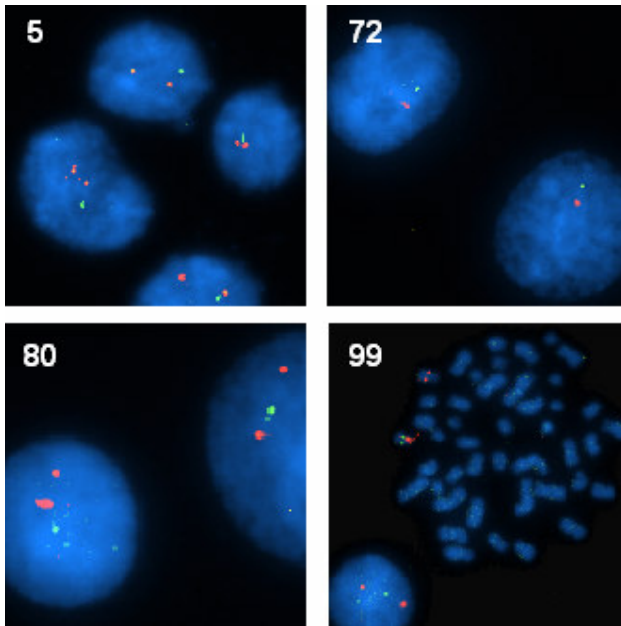


Figura 16. Ejemplo de validación de RMR-r mediante FISH. Las regiones recurrentes de interés fueron validadas utilizando FISH. En el ejemplo, deleción recurrente situada en la citobanda 17q11.2 (en verde). Como control se utilizó una sonda comercial de *TP53*, situada en la citobanda 17p13.1 (rojo). En blanco se indica el número de caso correspondiente.

2. ESTUDIO GENÓMICO DE LMA *DE NOVO* UTILIZANDO ARRAY-SNP

2.1. ANÁLISIS DE REGIONES LOH NEUTRAS EN LMA.

Se escogieron dieciséis muestras del estudio de 100 LMA previo en array-CGH para observar el estado de heterocigosidad en las mismas. Se escogieron cinco casos del grupo de riesgo favorable, siete casos del grupo de riesgo intermedio y cinco del grupo de riesgo adverso. Para nuestro análisis de LOH la plataforma de elección fue el array HumanHap300, un array basado en el sistema Illumina Infinium Beadchip (Illumina, San Diego, CA, USA). HumanHap300 es un sistema de genotipado que cubre todo el genoma, mapeando el mismo con más de 317000 sondas otros tantos SNPs.

De la misma manera que las VNC también ocurren de forma natural y polimórfica, en la población general también es posible encontrar en ésta regiones polimórficas afectadas por LOH. Por ello, para llevar a cabo nuestro análisis de LOH en LMA, de manera previa disponíamos de los resultados de este tipo de análisis en una población control de 200 individuos sanos. Los datos de LOH observados en la población control sana se utilizaron para filtrar los datos de LOH observados en nuestros casos de LMA. En total detectamos que once de las dieciséis muestras analizadas (69%) estaban afectadas por eventos de LOH. Se observaron un total de 49 regiones de LOH, ninguna de las cuales se encontró en donantes sanos (no eran polimórficas). De ellas, 28 eran deleciones genómicas (al sólo haber una copia, el array-SNP las identifica como regiones homocigotas). De las restantes 21 regiones (tabla 17), 18 fueron identificadas como LOH neutras (no asociadas a variaciones en el número de copias). Estas regiones presentaban una mediana de tamaño de 4.56 Mb (rango de 500kb a 87 Mb).

Las LOH neutras han sido clásicamente subdivididas en LOH neutras teloméricas, cuando la LOH termina a nivel del telómero y en LOH neutras intersticiales, aquellas producidas por dos reordenamientos dentro del mismo brazo cromosómico. En nuestro estudio detectamos un mayor número de LOH intersticiales frente a las LOH

teloméricas (15 frente a tres, respectivamente), que se distribuían de un modo similar en los tres grupos citogenéticos.

No se observó en nuestra serie ninguna recurrencia en las regiones de LOH neutrales, si bien en algunos casos se identificaron posibles genes diana de estas LOH neutrales. Así en el caso 26, con una mutación activadora del gen *FLT3*, se observó LOH del cromosoma 13 completo, y en el caso 43, la LOH neutral del cromosoma 20 incluía el gen de la familia polycomb *LT3MBTL*, cuyo silenciamiento ha sido previamente implicado en neoplasias mieloides.

Tabla 17: Regiones LOH neutras detectadas en el estudio

Pronóstico	Caso	Cariotipo	Región LOH				Alteraciones numéricas		
			Tipo LOH	Chr	Inicio (pb)	Tamaño (Mb)	Ploidía	Inicio	Tamaño
Favorable	5	inv(16)	N/IL	3	79068495	28.3	-	-	-
			N/IL	11	38454177	20.4	-	-	-
			N/IL	16	72456853	4.7	-	-	-
Favorable	10	inv(16)	-	-	-	-	-	-	
Favorable	86	inv(16)	N/IL	2	140813260	7.3	-	-	-
			C/IL	8	14126601	19.6	1n	20388180	11.6
							>2n	31979736	1.3
							1n	33298381	0.5
			N/IL	18	42005991	4.6	-	-	-
N/IL	20	11799	5.1	-	-	-			
Favorable	87	inv(16)	N/IL	2	88389214	2.6	-	-	-
Intermedio	12	-18	N/IL	6	28033346	0.8	-	-	-
			N/IL	14	43576901	41.6	-	-	-
Intermedio	20	+19	N/IL	2	58387567	2.8	-	-	-
Intermedio	43	+8	N/IL	3	113653472	17.0	-	-	-
			N/IL	9	128451226	1.3	-	-	-
			N/IL	20	34875713	7.0	-	-	-
Intermedio	24	NK	-	-	-	-	-	-	
Intermedio	26	NK	N/IL	5	151372673	1.8	-	-	-
			N/TL	13	27338007	86.8	-	-	-
Intermedio	46	NK	N/TL	12	131872351	0.5	-	-	-
Intermedio	93	NK	-	-	-	-	-	-	
Adverso	23	Complejo	C/TL	17	51088	22.1	1n	15495286	6.7
Adverso	72	Complejo	C/TL	17	51088	78.6	1n	51088	47.0
Adverso	80	Complejo	-	-	-	-	-	-	-
Adverso	99	Complejo	-	-	-	-	-	-	-
Adverso	73	MLL	N/IL	6	121445811	1.5	-	-	-
			N/TL	16	37354	0.5	-	-	-

N: normal, C: compleja, IL: intersticial, TL: telomérica

2.2. DETECCIÓN DE PATRONES COMPLEJOS DE NÚMERO COPIA Y LOH.

Como se ha explicado anteriormente, al analizar el valor de VNC y los datos de LOH, muchas de las regiones con evidencia de LOH presentaban esa pérdida debido a la existencia de deleciones genómicas. De las 21 regiones de LOH observadas no debidas exclusivamente a deleción, 18 de ellas eran LOH diploides (es decir, LOH neutras). Sin embargo, las tres regiones restantes estaban caracterizadas por presentar un gran tamaño y contener dentro de sus límites tanto regiones de LOH neutras como fragmentos delecionados. Este fenómeno hacía que no pudieran ser consideradas LOH neutras o VNC estrictamente. Como estas regiones tenían una alta complejidad, las denominamos LOH complejas. Las tres regiones complejas analizadas se trataban de regiones compuestas por una región LOH neutra flanqueada por deleciones (figura 17). Estos eventos fueron detectados exclusivamente en los cromosomas 8 y 17; las regiones eran muy grandes en tamaño, desde 19.6 Mb (observada en el cromosoma 8 del caso 86) hasta un cromosoma entero (monosomía virtual del cromosoma 17, incluyendo una LOH neutral de 32Mb en el caso 72). A pesar de ser poco frecuentes en la muestra, los eventos LOH complejos fueron observados únicamente en LMA con un genoma muy alterado (dos casos eran complejos y el tercero era un caso favorable con alta inestabilidad).

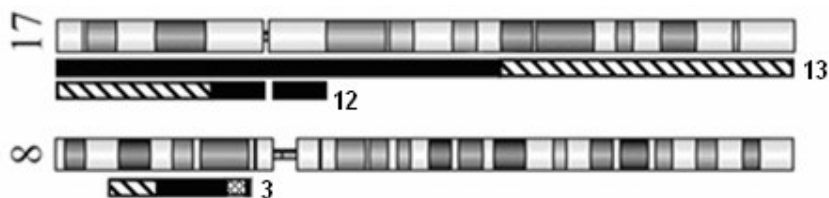


Figura 17. Eventos complejos LOH encontrados en diferentes casos de LMA. Cada evento de LOH complejo está representado por una barra debajo de cada cromosoma. El número del caso en el estudio de LOH se muestra al lado de la barra. Los colores definen el tipo de alteración a lo largo de la LOH compleja (negro = pérdida de material genómico, rayado = LOH diploide, en cruz = LOH poliploide).

2.3. COMBINACIÓN DE HERRAMIENTAS GENÓMICAS EN LA BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS EN LMA.

2.3.1 GENES CANDIDATOS EN EL CROMOSOMA 17.

Entre todas las regiones recurrentes de interés, observamos que las deleciones del cromosoma 17 aparecían de forma evidente como las alteraciones más recurrentes. En total, 7 casos presentaron aberraciones afectando este cromosoma. Al compilar todos los datos de deleciones y UPD (figuras 16 y 17) para analizar si la región mínima indicaba algún gen como posible candidato, identificamos una región común en todos los casos de 1.5Mb, situada en 17q11.2 (figura 18).

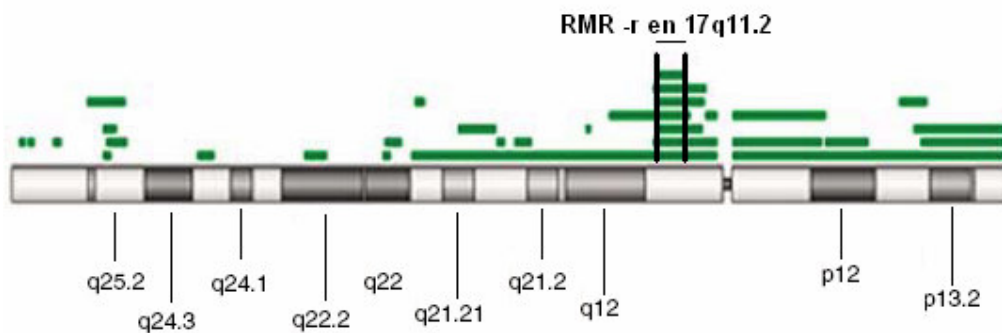


Figura 18. Región común de deleción en la citobanda 17q11.2. Las barras verdes indican regiones de deleción a lo largo del cromosoma 17. Las barras que están en la misma línea horizontal corresponden al mismo caso. La región señalada se corresponde con la región común en 17q11.2.

Esta región contiene 8 genes, dentro de los cuales destacaba el gen *NFI* como el candidato más atractivo de la región, al ser un conocido supresor de tumores y estar relacionado con desórdenes hematológicos. Debido a que las regiones afectadas en el cromosoma 17 con frecuencia incluyeron el locus del gen *TP53*, decidimos estudiar el estado mutacional de ambos genes en nuestros casos de LMA. Respecto a las deleciones, *TP53*, localizado aproximadamente a 19Mb de *NFI*, sólo apareció delecionado en el 3% de los casos. Así mismo, la deleción de *TP53* siempre se observó asociada a la deleción de *NFI*. Una vez se comprobó la mayor recurrencia de la deleción de la citobanda 17q11.2 (incluyendo el gen *NFI*) frente a la citobanda 17p12.1, utilizamos la tecnología del array-SNP para analizar la aparición de LOH que involucrara al gen *TP53* en las 7 muestras con alteraciones en el cromosoma 17.

Dicho análisis permitió identificar tan solo una muestra con LOH en la región de *TP53* (ver tabla 18).

Tabla 18: Información de los casos LMA con del(17)

Nº paciente	Cariotipo	NF1	TP53	LOH
5	inv(16)	1n	2n	-
23	complejo	1n	2n	+
72	complejo	1n	1n	-
80	complejo	1n	3n	-
82	complejo	1n	1n	-
86	inv(16)	1n	2n	-
99	complejo	1n	2n	-

Dado que mutaciones en *TP53* han sido previamente implicadas en la leucemogénesis, analizamos los resultados de secuenciación para los exones 4-9 del gen *TP53* en busca de mutaciones en los casos con alteraciones en el cromosoma 17. En 2 casos se detectaron mutaciones en este gen (ver tabla 19).

Tabla 19: Secuenciación de *TP53* en LMA con del(17)

Paciente/Exones	4	5	6	7	8	9
5	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	R280G	-
80	-	-	-	-	-	1245gdelc
82	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-

Estas mutaciones se localizaban en el exón 8 (en el caso 72), observándose una sustitución R280G (se producía un cambio de base en la tercera base del codon 280, pasando de GGA a GGG, y en el exón 9 (en el caso 80) debida a una deleción en una base (posición 1242, en el exón 9). Esta deleción contribuía a una proteína truncada al producir un codon STOP en el codon 344 (figura 19).

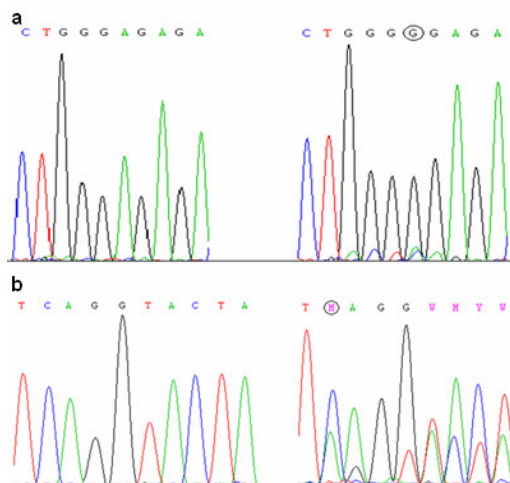


Figura 19. Mutaciones encontradas en el gen *TP53* mediante la técnica de secuenciación genómica. Se observan a la izquierda la secuenciación de un control sin mutación y a la derecha el caso con mutación. Se señala con un círculo el nucleótido mutado. **a.** Mutación R280G por sustitución GGA a GGG en el caso 72. **b.** Mutación 1245gdelc en el caso 80.

La presencia de mutación del gen *TP53* junto a una delección del gen salvaje en estos casos explicaría el mal pronóstico de los pacientes con esta alteración. Sin embargo, la falta de alteraciones en este gen en más del 70% de los casos con alteraciones en el cromosoma 17 hace necesario el estudio de otros posibles candidatos en esta localización genómica.

2.3.2. VALIDACIÓN INDEPENDIENTE MEDIANTE FISH DE LA DELECCIÓN *NF1*.

Para estimar el porcentaje de casos con pérdida del gen candidato *NF1* de una forma independiente empleamos una nueva serie de casos de LMA organizados en un tissue micro array de coágulos medulares que incluía muestras de 70 pacientes de LMA al diagnóstico. Sólo 39 coágulos pudieron ser valorados para el estudio de FISH de *NF1*, probablemente debido a la fijación con B5 utilizada en estas muestras. Aproximadamente un diez por ciento de los casos (4 de 39) presentó delección en la región de *NF1* (figura 19). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos mediante los arrays de CGH, donde se observaba una delección de *NF1* en el 7% de los casos.

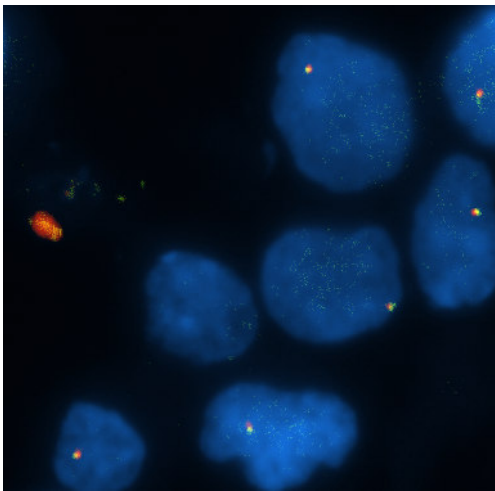


Figura 20. Estudio por FISH de un coágulo medular del estado del gen *NF1*. Se observan varios núcleos de mieloblastos con una copia de una sonda verde (*NF1*) y una sonda roja (*TP53*). Esto indica delección, tanto de *NF1*, como de *TP53* para ese caso.

2.3.3. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS NIVELES DE NEUROFIBROMINA TRAS LA DELECCIÓN DE *NF1*.

Para identificar el efecto a nivel de la proteína neurofibromina de la delección de *NF1* en los casos de LMA previamente identificados, analizamos estas muestras mediante

IHQ para la presencia de dicha proteína. Los cuatro casos analizados mostraron un menor número de blastos positivos que la observada en los casos sin delección de *NF1* (figura 21).

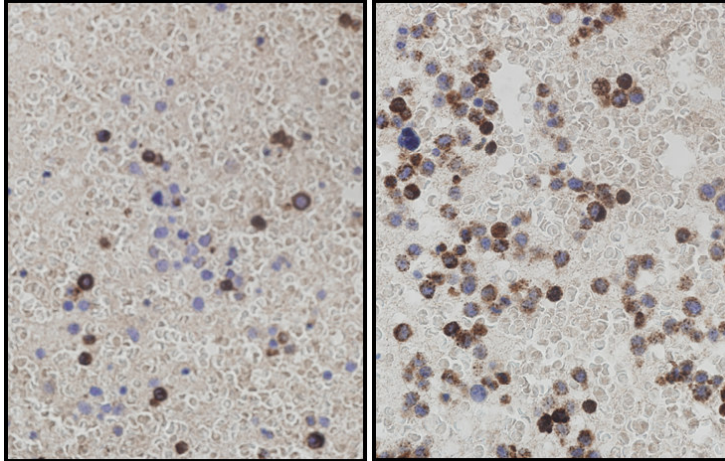


Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de la proteína neurofibromina (NF1). A la izquierda se observa un caso con delección de una copia de *NF1*, presentando una menor tinción de proteína citoplasmática, comparado con un caso sin delección (se observa claramente un patrón de tinción más oscura en su citoplasma).

DISCUSIÓN

La citogenética convencional ha demostrado ser una herramienta eficaz para establecer el pronóstico de los pacientes con LMA al diagnóstico. La presencia o ausencia, y el tipo de alteración citogenética observada permiten estimar la probabilidad de supervivencia a los 5 años de un determinado paciente. Esta estimación clasifica a los pacientes en tres grupos de riesgo (favorable, intermedio o desfavorable) y permite decidir el tratamiento más adecuado a su riesgo. Sin embargo, esta estimación basada solo en el cariotipo, no permite identificar pacientes cuya evolución no corresponde a la esperada en función de la alteración citogenética observada (Farag, et al. 2006). Esto hace necesario el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico capaces de predecir con un mayor rango de seguridad el riesgo de un determinado paciente.

Durante los últimos años el desarrollo de la citogenética molecular ha permitido la caracterización de alteraciones crípticas implicadas en la leucemogénesis. Así, el empleo de técnicas como el FISH (Cerveira, et al. 2006; Paulsson, et al. 2006a), el SKY (*spectral karyotyping*) (Martinez-Ramirez, et al. 2004; Trost, et al. 2006) o el uso de microarrays de CGH (Martinez-Ramirez, et al. 2005), han facilitado la identificación de alteraciones no visibles mediante citogenética convencional.

Otras técnicas como los arrays de expresión han demostrado la necesidad de caracterizar los eventos moleculares asociados a las alteraciones citogenéticas conocidas, para entender la variabilidad clínica observada. El estudio de los diferentes subgrupos de LMAs utilizando arrays de expresión ha puesto de relieve dentro del grupo de pronóstico favorable que existen patrones de expresión con diferencias estadísticamente significativas en la probabilidad de supervivencia de los pacientes (Bullinger, et al. 2004; Wilson, et al. 2006). Estas diferencias podrían ser debidas a eventos epigenéticos o mutaciones que explicarían la variabilidad de esta enfermedad (Avivi and Rowe 2005; Galm and Herman 2005).

Estos trabajos ponen de relieve la necesidad de caracterizar a nivel genómico los diferentes subgrupos de LMAs, para poder desarrollar nuevos sistemas pronósticos

1. FRECUENCIA DE ALTERACIONES GENÓMICAS DETECTADAS UTILIZANDO ARRAY-CGH.

En nuestro estudio, con el objetivo de caracterizar los cambios en el número de copias en los diferentes subgrupos de LMA, hemos utilizado un array genómico comercial que contiene más de 40000 sondas, con una resolución a nivel de la mediana de 75kb, y con una composición enfocada fundamentalmente a regiones de alto contenido en genes. Utilizando esta tecnología, hemos analizado 100 muestras de LMAs “*de novo*”; consecutivas y homogéneamente tratadas. Esta aproximación nos ha permitido una visión global de las variaciones genómicas características de esta enfermedad.

Durante los últimos años se han publicado otros trabajos utilizando herramientas genómicas similares para el estudio de enfermedades de origen mielóide. Sin embargo, su diseño en la selección de pacientes era sesgada y no cubrían todos los grupos de riesgo citogenéticos. Destaca el estudio realizado por Paulsson y colaboradores en el que analizan una serie de 10 casos de LMA y mielodisplasia con trisomía 8 (Paulsson, et al. 2006b), observando cambios adicionales en el 40% de las muestras analizadas. Otro trabajo de interés, como el de Rucker y colaboradores, centraba su estudio en LMAs de cariotipo complejo (Rucker, et al. 2006a).

Por el contrario nuestro diseño correspondió a una serie consecutiva de LMA por lo que no introdujo sesgo en los grupos y, como consecuencia, todos los grupos de riesgo citogenético estaban representados. Por ello, hemos sido capaces de demostrar que la LMA es una enfermedad muy heterogénea también a nivel genómico y que está caracterizada por una alta incidencia de pequeñas alteraciones en el número de copias de ADN. Sin embargo, esas alteraciones presentan una baja recurrencia en cuanto a la especificidad de las regiones alteradas. Esto está en concordancia con estudios previos realizados en grandes series, usando herramientas de citogenética convencional (Byrd, et al. 2002), donde la trisomía del cromosoma 8, se ha descrito como el cambio genómico más recurrente en la LMA (con una frecuencia superior al 5%)(Alvarez and Cigudosa 2005; Mitelman F; Sanderson, et al. 2006). En nuestra serie, esta aneuploidía ha sido la única alteración observada en más de un 10% de los casos.

En general, los cambios en el número de copias identificados mediante citogenética convencional y los observados con el array genómico mostraron un alto nivel de concordancia, probablemente debido a que ambas técnicas están basadas en los mismos eventos causales (errores genéticos). La mayoría de las alteraciones genómicas recurrentes descritas se detectaron en casos con cariotipo complejo, como era previsible. Sin embargo en una proporción sustancial de los casos clasificados en los grupos favorable e intermedio también se identificaron alteraciones genómicas cuya presencia no había sido detectada mediante la caracterización citogenética de estas muestras. En el grupo de pronóstico favorable detectamos la presencia de alteraciones en el 72 % de los casos analizados (10 de 14 casos), de los cuales 5 presentaban más de cuatro alteraciones genómicas (un genoma altamente inestable). Este resultado explicaría la variabilidad en el curso clínico incluso en presencia de alteraciones genómicas conocidas y asociadas a un buen pronóstico.

También detectamos que el 60% de los casos con cariotipo normal presentaban cambios adicionales. Estos hallazgos contrastan con estudios previos, que situaban el porcentaje de cambios en el número de copias en estos grupos de pacientes en menos del 20% (Gorletta, et al. 2005; Raghavan, et al. 2005). Estas diferencias pueden explicarse debido a las diferencias en resolución y sensibilidad de las plataformas de análisis utilizadas. El arrayCGH utilizado en nuestro estudio tiene una resolución cuatro veces superior que la plataforma utilizada en los dos estudios mencionados donde emplearon un array-SNP de 10000 sondas (frente a las 40000 incluidas en nuestra plataforma.), el cual, además, tiene una menor sensibilidad que el array-CGH para detectar cambios de número de copia. Nuestros resultados tampoco coincidían con los obtenidos por Tyybakinoja y colaboradores quienes, utilizando la misma plataforma que nosotros empleamos, tan solo detectaron alteraciones genómicas adicionales en un 15% de casos con cariotipo normal (Tyybakinoja, et al. 2007). En este caso la diferencia con nuestro estudio residía en el tipo de análisis bioinformático. Nuestra aproximación bioinformática, basada en una segmentación de mejor calidad, nos permitió obtener información de regiones pequeñas de menos de 100Kb, 4 veces más pequeñas que las identificadas por el grupo finés, donde la región más pequeña detectada era de 0.4Mb. Finalmente, nuestros resultados fueron corroborados por otro estudio paralelo que analizó 23 muestras de LMA con cariotipo normal obteniendo un porcentaje del 60% de casos con alteraciones

genómicas (Yamashita, et al. 2007). En conclusión, todos estos estudios, unidos al nuestro, sugieren que la leucemia mieloide aguda no presenta regiones recurrentes de pérdida o ganancia de ADN en las fases tempranas de la enfermedad sino una inestabilidad genómica dispersa y generalizada que afecta a todo el genoma. Además, en el caso concreto del grupo de LMA con cariotipo normal (una de las cuestiones más frecuentes en este ámbito de la investigación genética y hematológica), más de la mitad de los casos presentan alteraciones genómicas, pero éstas no tienen consistencia o recurrencia en las regiones afectadas.

2. CLASIFICACIÓN GENÓMICA Y SUPERVIVENCIA USANDO ARRAY-CGH.

La identificación del número de eventos genómicos (pérdidas o ganancias) en cada una de las muestras analizadas y la baja recurrencia de alteraciones específicas, nos ha llevado a analizar nuestra serie de LMAs en términos de patrones de inestabilidad genómica.

La inestabilidad genómica se ha propuesto como una unidad de medida de la predicción de pronóstico clínico en otros estudios de cáncer (Blaveri, et al. 2005; Fridlyand, et al. 2006). Estudios recientes han demostrado que polimorfismos en algunos genes de reparación podrían ser usados como marcadores de mal pronóstico en LMA (Monzo, et al. 2006), indicando que los genes de reparación de ADN son cruciales para el control de la estabilidad genómica.

Utilizando el número de alteraciones observadas en cada muestra hemos elaborado un sistema de clasificación. Los tres grupos de pacientes obtenidos en función del número de alteraciones mostraban probabilidades de supervivencia significativamente distintas a 5 años. Además, esta asociación se demostró independiente de otros parámetros clínicos y genéticos, tales como la edad, el número de leucocitos en sangre o la clasificación citogenética.

La clasificación que hemos desarrollado propone que la presencia de una mayor inestabilidad genómica al diagnóstico, se asocia a un curso clínico más agresivo. En nuestra serie, la capacidad de establecer el riesgo de un determinado paciente utilizando esta clasificación, es independiente de otros factores como la citogenética

previa. Es importante remarcar este hallazgo, dado que en el momento actual la identificación de alteraciones citogenéticas asociadas a determinados reordenamientos que determinan la asignación de un paciente a un grupo de riesgo determinado no implican una predicción de supervivencia independientemente (Byrd, et al. 2002; Mrozek, et al. 2004). Por ejemplo, la presencia de una alteración numérica o estructural asociada a una translocación de buen pronóstico como la t(8;21)(q22;q22) o la inv(16)(p13;q22) no modifica la inclusión del paciente en el grupo favorable. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que cuando estos cambios adicionales se identifican usando array-CGH (la mayoría de ellos invisibles a la citogenética convencional) aquellos casos con pronóstico favorable pero con un genoma inestable presentan una supervivencia global más baja que aquellos casos de pronóstico favorable con un genoma estable.

La presencia de mutaciones en el gen *FLT3*, en forma de duplicaciones en tándem, se han asociado, a un peor pronóstico en la población de LMA de cariotipo normal (Bienz, et al. 2005; Whitman, et al. 2001) Para determinar el efecto de mutaciones *FLT3*-ITD en nuestra serie se analizó por separado el grupo de LMAs con cariotipo normal, sin obtenerse una asociación significativa con la supervivencia, probablemente debido al tamaño muestral del estudio. Sin embargo, si se observaron asociaciones significativas entre supervivencia e inestabilidad genómica en este subgrupo de LMAs. Así, en los casos de cariotipo normal con inestabilidad genómica se observó un curso clínico más agresivo que en los casos con menos de dos alteraciones genómicas (8% frente a 46% de supervivencia a 5 años). Estos resultados, ponen de relieve la necesidad de incluir los array-CGH en próximos ensayos clínicos de pacientes con cariotipo normal y homogéneamente tratados, para conseguir una mejor estratificación en función del riesgo.

3. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD EN LMA.

La pérdida de heterocigosidad (LOH) es un evento genético que produce la eliminación de una copia alélica, quedando solamente uno de los dos alelos disponibles. Este evento puede ser debido a una pérdida alélica (Fong, et al. 1992) o ser producido sin pérdida de dosis génica (Pfeifer, et al. 2007). Así, el primer evento es conocido comúnmente como delección, y el segundo evento como LOH neutral. La

LOH neutral puede producirse por varias vías, pero la más frecuente es la disomía uniparental (DUP), causada por la delección de una de las copias parentales en una célula, y la consecuente duplicación de la copia restante (obteniendo un alelo diploide, pero homocigoto) (Engel 2006).

Hemos analizado, utilizando un array-SNP, 16 muestras de LMA para identificar regiones de LOH, tanto debidas a delecciones como a LOH neutrales. En este estudio observamos que once de las dieciséis muestras (69%) presentaban fenómenos de LOH neutrales. Este porcentaje es marcadamente superior al observado por otros grupos en estudios previos (Gorletta, et al. 2005; Raghavan, et al. 2005), donde sólo se identificó esta alteración en un 20% de casos. Esta variabilidad es probablemente debida a la diferencia en la densidad de sondas de las plataformas utilizadas, dado que en nuestro estudio, el número de sondas por ensayo, es treinta veces superior al utilizado en trabajos previos (300000 sondas frente a 10000 en los dos estudios previos).

El análisis de las muestras de LMAs que presentaban alteraciones citogenéticas numéricas o estructurales al diagnóstico, demostró la presencia de LOHs en 58% de los casos (7 de 12 casos). Estos cambios se distribuían homogéneamente a través de los tres grupos citogenéticos de riesgo.

La caracterización de las 18 LOH neutrales detectadas, se realizó de acuerdo con la división genética clásica que diferencia la LOH que termina en los telómeros (LOH neutral telomérica) y aquella que esta limitada por dos reordenamientos dentro del mismo cromosoma (LOH neutral intersticial). En estudios previos se ha descrito una alta frecuencia (10-20% de los casos) de LMAs con LOH neutrales teloméricas; Sin embargo, en nuestra serie, las LOHs intersticiales resultaron ser más frecuentes que los eventos teloméricos (15 frente a tres, respectivamente). Estas diferencias, de nuevo podrían ser debidas a la resolución de la plataforma utilizada.

Las tres regiones LOH no incluidas como neutrales exclusivas fueron estudiadas como un fenómeno aparte, debido a que tenían un carácter de complejidad que las hacía diferentes del resto, al estar asociadas a variaciones de número de copia. Esas regiones, a denominadas LOH complejas, estaban compuestas por un evento de LOH neutral flanqueado por delecciones. Estas alteraciones fueron encontradas en los

cromosomas 8 y 17. En el momento actual se desconocen los mecanismos moleculares que están detrás de estas regiones complejas. Basándonos en su frecuencia, hipotetizamos que una LOH compleja podría formarse inicialmente por un evento de LOH neutral, seguido de deleciones secundarias a sus alrededores. Sin embargo, el tamaño y los límites de las regiones implicadas sugieren la hipótesis contraria. En cualquier caso, las regiones de LOH, tanto las simples como las complejas, son marcadores de interés en la inestabilidad genómica, y podrían contener genes fundamentales para el desarrollo del proceso leucemogénico.

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES RECURRENTEMENTE ALTERADAS MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE ARRAY-CGH Y ARRAY-SNP.

La identificación de las regiones recurrentemente alteradas para la identificación de posibles oncogenes o genes supresores es un apartado básico de los estudios de array-CGH. En ausencia de un software adecuado que nos permitiera realizar un análisis automatizado de estas regiones, definimos las mismas compilando toda la información de las alteraciones genómicas para cada caso a lo largo de todo el genoma, siguiendo el mismo modelo que el utilizado en trabajos previamente publicados recientemente (Carrasco, et al. 2006).

El análisis conjunto de los cambios en el número de copias en las 100 muestras de LMA *de novo* estudiadas, nos permitió identificar regiones recurrentemente alteradas en muestra serie. Por interés biológico y clínico, nuestro estudio de regiones significativas se ha centrado en el análisis de aquellas regiones mínimas significativamente asociadas al grupo de mal pronóstico y alta inestabilidad (RMR-r). Estas regiones fueron todas deleciones, y se situaron en los cromosomas 5, 16, 17 y 18. Además, al combinar los resultados de array-CGH y array-SNP, observamos la aparición de una nueva región recurrente en el brazo largo del cromosoma 20. La caracterización de estas regiones recurrentemente alteradas sugiere que estas regiones contienen genes potencialmente implicados en el desarrollo neoplásico.

4.1. Eventos genómicos en el cromosoma 5.

La deleción en 5q ha sido exhaustivamente caracterizada tanto en casos de LMA como en síndromes mielodisplásicos (Horrigan, et al. 1996; Santana-Davila, et al. 2008). Esta alteración se presenta tanto como un evento aislado en SMDs, asociándose a una evolución clínica relativamente benigna, como en LMAs en el contexto de cariotipos complejos, asociándose por tanto a un curso clínico agresivo. En nuestro estudio la región mínima, delecionada en el 6% de los casos, presentaba un tamaño de 735 kilobases y se localizaba en la citobanda 5q31.1. Esta región es la más pequeña descrita en estudios de deleción del cromosoma 5 en LMA (la región más pequeña descrita en una serie es de 1.5Mb, situada en 5q31, a 3Mb de la nuestra región propuesta) (Lai, et al. 2001). En esta región se localizan una gran variedad de genes de interés. Seleccionamos como genes de especial interés *PPP2CA*, *SKP1A*, *UBE2B* y *CDKL3*, debido a sus funciones biológicas. *PPP2CA*, isoforma alfa de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2, tiene un papel crucial en la vía de reparación del ADN. *PPP2CA* defosforila γ -H2AX, facilitando la reparación de las roturas de doble hebra. La ausencia de esta proteína da lugar a una reparación ineficiente del ADN, lo que condiciona una hipersensibilidad a agentes capaces de originar un daño en el ADN (Chowdhury, et al. 2005).

UBE2B (también llamada *RAD6*) es la enzima conjugadora de ubiquitina 2B; fundamental en la reparación de ADN después de la replicación en las células eucariotas. *RAD6* actúa uniendo la ubiquitina de PCNA (en inglés, *proliferating cell nuclear antigen*, o antígeno nuclear de células ploriferantes) (Hoegge, et al. 2002). La ubiquitinización de TP53 vía *RAD6* es esencial para asegurar la respuesta inducida por daño en el ADN durante la fase postreplicativa del ciclo celular (Lyakhovich and Shekhar 2003). Un descenso en los niveles de expresión de *RAD6* se ha observado en neoplasias pulmonares, independientemente del estadio clínico de la enfermedad. Este hallazgo sugiere que *RAD6* podría ser gen supresor implicado en la tumorigénesis (Sasaki, et al. 2004).

CDKL3 (también llamado *NKIAMRE*) es un homólogo de la proteína de rata *NKIATRE*, una kinasa dependiente de ciclina. Deleciones homocigotas de este gen han sido previamente identificadas en el 50% de los casos de LMA o SMD con deleción en 5q31 (Midmer, et al. 1999). Esta proteína es una kinasa relacionada con

la proteína Cdc2, con actividad MAP kinasa y kinasa dependiente de ciclina, cuya ausencia determinaría una pérdida en el control del crecimiento y la diferenciación celular (Yee, et al. 2003).

Finalmente, SKP1A, inicialmente descrita como una proteína de unión a ciclina F, y a otras proteínas como Cdc4p y ciclina A, en el sitio de la caja F; dirige la ubiquitinización de estas proteínas y consecuentemente su proteólisis, regulando el ciclo celular (Bai, et al. 1996). SKP1 además forma parte del complejo ubiquitin protein-ligasa SCF E3 (Zheng, et al. 2002). Este complejo es el responsable de degradar proteínas de transcripción y ciclo celular, como la β -catenina, cuya degradación se produce a través de la unión de esta a Siah, una proteína inducible por p53, uniéndose posteriormente las dos al complejo SCF (Matsuzawa and Reed 2001). Alteraciones en este grupo pueden desregular genes relacionados con la tumorigénesis, tales como ciclina E (Hao, et al. 2007).

4.2. Eventos genómicos en el cromosoma 16.

En el brazo largo del cromosoma 16 se localizaron dos deleciones mínimas recurrentes. Las deleciones en el brazo largo del cromosoma han sido descritas frecuentemente en LMA (Byrd, et al. 2002; Marlton, et al. 1995; Yamamoto, et al. 2001), aunque nunca se han identificado genes candidatos. A diferencia de las alteraciones estructurales equilibradas que afectan a esta región como la *inv(16)*, la deleción 16q no se asocia a buen pronóstico, dado que habitualmente aparece en el contexto de cariotipos complejos (Betts, et al. 1992; Marlton, et al. 1995).

La región mínima situada en 16q23.1, identificada en este estudio en 4 LMAs, presentaba un tamaño de 269Kb. En esta región tan solo se identificó *FA2H*, como secuencia génica con proteína conocida. Esta proteína es una hidroxilasa de ácidos grasos que ha sido implicada en el metabolismo lipídico (Uchida, et al. 2007) aunque, sin embargo, hasta la fecha no tiene relevancia en el campo de la oncología. La segunda región mínima, situada en 16q24.2, con un tamaño mucho menor (32 kb) y delecionada en cuatro LMAs, no presentaba ningún gen conocido.

4.3. Eventos genómicos en el cromosoma 18.

Observamos una deleción de 6.4 Mb en el brazo corto del cromosoma 18 en el 4% de los casos analizados. Esta alteración se ha descrito ocasionalmente alterada tanto en series analizadas mediante citogenética convencional, en las que se observa la monosomía del cromosoma 18 (Sanderson, et al. 2006), como en series analizadas mediante técnicas de citogenética molecular como la CGH convencional (Casas, et al. 2004; Trost, et al. 2006), o el array-CGH (Rucker, et al. 2006a). En esta última esta región aparece alterada en el 30% de los casos y la región mínima identificada (desde la posición 0.2Mb a 11Mb situada en el cromosoma 18) tiene una región común con la región mínima encontrada en nuestra serie (entre la posición 7.5Mb y 14Mb). Lamentablemente, esta región contiene un más de 30 genes conocidos, con lo que resulta difícil la identificación de posibles genes diana en esta región. Además, estos genes no tienen una función relacionada con el cáncer.

4.4. Eventos genómicos en el cromosoma 20.

La deleción del brazo largo del cromosoma 20 es un evento genómico recurrentemente descrito en la leucemia mieloide aguda (Bench, et al. 2000).

Utilizando la tecnología de array-SNP, se detectó una región de pérdida de heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma 20. Al comparar esta región con el estudio de número de copias realizado con array-CGH, se detectó una región de 7Mb común de deleción y LOH en la citobanda 20q13.2. En esta citobanda se localiza el gen *L3MBTL*, que es un gen del grupo *polycomb* (Boccuni, et al. 2003). Está descrito su papel como un gen supresor tumoral, recurrentemente subexpresado en SMD debido a la pérdida de la copia salvaje del gen, por deleción del brazo largo del cromosoma 20, junto a una hipermetilación de la región promotora del alelo residual (Bench, et al. 2004; Li, et al. 2004).

Se necesitan nuevos estudios para determinar la influencia de este silenciamiento como evento primario o adquirido durante la progresión de la LMA. El efecto en la supervivencia global de esta deleción en LMA es difícil de determinar, al aparecer habitualmente en el contexto de cariotipos complejos (Brezinova, et al. 2005). En

nuestro estudio no hemos podido establecer asociaciones significativas entre esta alteración y las variables clínicas y citogenéticas estudiadas.

4.5. Eventos genómicos en el cromosoma 17.

El cromosoma 17 es uno de los cromosomas más ampliamente estudiados en cáncer. Entre otros genes de interés, este cromosoma contiene *TP53* (17p13.1), *ERBB2* o *BRCA1* (ambos en 17q21).

En el cromosoma 17 identificamos una región mínima delecionada de 1.5 megabases en la citobanda 17q11.2. Esta alteración se identificó en un 7% de los casos de nuestra serie, observándose fundamentalmente en pacientes incluidos en el grupo citogenético de pronóstico adverso (42% de los cariotipos adversos presentaban esta deleción). En la mayoría de los casos (en 4 de los 5 casos) se observaban pequeñas deleciones, inferiores a 4 Mb. Dos genes *TP53* y *NFI*, se seleccionaron como los genes diana de la deleción. El gen *NFI* (neurofibromatosis-1), es un gen supresor de tumores, de gran tamaño, que ocupa de 350 kb. Este gen codifica la proteína neurofibromina. La inactivación autosómica en la línea germinal de *NFI* da lugar al desarrollo del síndrome autosómico dominante neurofibromatosis-1 (o neurofibromatosis de Von Recklinghausen). En este síndrome donde la inactivación de una copia de *NFI* predispone al desarrollo de neoplasias sólidas y hematológicas (Reynolds, et al. 2003).

A nivel de alteraciones en la serie mieloide, este síndrome predispone al desarrollo de leucemias mielomonocíticas juveniles (LMMJ) en la infancia, a través de la inactivación de la copia salvaje, por pérdida de heterocigosidad o por modificaciones epigenéticas de este gen. (Miles, et al. 1996; Stephens, et al. 2006). Así mismo, en algunos pacientes con LMMJ sin evidencia clínica del síndrome de la neurofibromatosis, se ha descrito la presencia de mutaciones autosómicas adquiridas en *NFI* (Side, et al. 1998). Hasta el momento no existen suficientes evidencias sobre el estatus mutacional del gen *NFI* en las LMAs desarrolladas en pacientes adultos, probablemente debido a que el gran tamaño de este gen (57 exones), dificulta su estudio. Sin embargo, estudios a nivel de la proteína neurofibromina han detectado un descenso de la misma en 30% de las 66 LMAs estudiadas (Lu, et al. 2003).

A nivel biológico, *NF1* controla los niveles de expresión del oncogén RAS; se ha demostrado que las mutaciones de *NF1* producen una proteína aberrante que desregula los niveles de RAS, lo que fuerza a su vez la desregulación de mTOR, produciendo una respuesta descontrolada e inadecuada a múltiples factores de crecimiento (Johannessen, et al. 2005; Zhang, et al. 1998). Recientemente, se ha demostrado que los ratones hemicigotos para *NF1* son más sensibles a los estímulos carcinogénicos, que resultan en desórdenes hematológicos independientes de mutaciones de *TP53* (Chao, et al. 2005). Posiblemente, las células troncales hemicigotas para *NF1* podrían, en un inicio, estar predispuestas a otros efectos mutagénicos que causaran una segunda mutación o alteración capaz de producir el desorden hematológico, como pasa en los casos de LMMJ desarrollados en pacientes con el síndrome NF1 (Zhang, et al. 2001).

Paralelamente a nuestro estudio, el estudio de Rucker et al, que incluía 60 casos con cariotipo complejo, también identificó el gen *NF1* como un gen diana de la delección del brazo largo del cromosoma 17. En nuestro caso esta delección no solo se observó en el grupo adverso, sino que también se observó en 2 casos del grupo de riesgo citogenético favorable. En este trabajo previo esta delección se describió concomitantemente con la delección del gen *TP53*, observándose incluso un mayor número de casos con delección de *TP53* que con delección de *NF1* (55% frente a 22%) (Rucker, et al. 2006a). Sin embargo, esto no sucedía así en nuestra serie, en la que la delección de *NF1* se observaba tanto sola como asociada a la delección de *TP53*. Para determinar la contribución de *TP53* en nuestra serie realizamos estudios de LOH y análisis mutacional de este gen observando se confirmó que la delección de *NF1* no tenía por qué ir acompañada de delección, ni mutación, en *TP53*.

La validación de este hallazgo la realizamos utilizando una serie de 38 casos nuevos de LMA donde se demostró que *NF1* se encontraba delecionado en un porcentaje similar de casos (10% de los casos), confirmándose así por primera vez que la delección del gen *NF1* es la alteración citogenética más recurrente, junto a la trisomía 8 en esta enfermedad.

La delección de *NF1* ha sido también descrita recientemente en LMAs, con reordenamientos del gen *MLL* y en un 10% de las leucemias linfocíticas agudas infantiles T (LLA-T) (Balgobind, et al. 2008). A pesar de que los porcentajes puedan

variar, estos datos, unidos a los nuestros, confirman que *NFI* es un gen implicado en la leucemogénesis, siendo necesario el desarrollo de modelos biológicos que nos permitan un mejor entendimiento de su papel en la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. La caracterización genómica de la leucemia mieloide aguda utilizando array-CGH ha permitido detectar cambios genómicos en un 90% de las muestras analizadas. Después de filtrar esos cambios con los polimorfismos de cambio de número de copias recogidos en las bases de datos internacionales, ese porcentaje se redujo al 74% de las muestras analizadas.
2. Las variaciones en el número de copias de ADN en la LMA no muestran una gran recurrencia. Todos los cambios detectados (salvo la trisomía 8) presentaron una recurrencia menor del 10%. Es decir las deleciones y las duplicaciones detectadas no presentaban un patrón de localización muy definido
3. Ante esta situación, hemos propuesto segregar la población de LMA utilizando el número de cambios genómicos por caso como criterio para definir patrones o subgrupos. Esta clasificación de base genómica establece tres grupos. El primer grupo, llamado estable, constaba de 46 casos que tenían un máximo de una variación de número de copia por caso. El segundo grupo, llamado inestable, constaba de 30 casos, los cuales tenían 2 o 3 variaciones de número de copia por caso. Finalmente, se creó un tercer grupo de alta inestabilidad, compuesto por 24 casos, que tenían cuatro o más variaciones de número de copia por caso.
4. La clasificación utilizando criterios genómicos tiene valor pronóstico independiente de la clasificación citogenética convencional. La clasificación genómica, además, introduce un grupo de buen pronóstico (grupo estable) que tres veces mayor en número de casos al grupo de riesgo favorable citogenético y un grupo de mal pronóstico (alta inestabilidad), que es dos veces mayor que el grupo de riesgo adverso citogenético, manteniendo valores de supervivencia global e intervalos de confianza similares.
5. Al contrario que otras enfermedades genéticas, donde existen alteraciones en genes implicados en vías concretas, la LMA presenta una falta de eventos genéticos recurrentes. Por ello, proponemos considerar la LMA como una enfermedad genómica, ya que es posible clasificarla en base a la cantidad de genoma alterado.
6. El análisis de regiones de pérdida de heterocigosidad ha permitido corroborar que este evento genómico es muy común en la leucemia mieloide aguda. Nuestro estudio describió fenómenos de LOH neutras en un 75% de las muestras analizadas. Después

de filtrar esos cambios con las regiones de homocigosidad detectadas en la población sana del estudio, ese porcentaje se redujo al 56% de las muestras analizadas. Además, se ha detectado un patrón de alteraciones complejas compuestas de pérdida de heterocigosidad y cambio de número de copia que podría tener interés en el estudio de los cariotipos complejos.

7. El análisis combinado de herramientas genómicas ha permitido detectar regiones de interés para el estudio del proceso tumoral en la leucemia mieloide aguda. Entre ellas destaca la región delecionada en el brazo largo del cromosoma 17, del(17)(q11,2), observada en el 7% de los casos, que incluye el gen supresor de tumores *NFI*. Hemos validado la presencia de la deleción en una serie independiente usando técnicas de citogenética y mediante el análisis de la proteína resultante. Dado que los efectos de la deleción de este gen en modelos animales demuestran su relación con el proceso neoplásico mieloide, a través de la activación del oncogén RAS, nuestros datos indican que esta ruta debe ser explorada para determinar su valor diagnóstico y posiblemente terapéutico en la LMA.

- Alvarez S, Cigudosa JC. 2005. Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 23(1):18-25.
- Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. 2005. Amplification or duplication of chromosome band 21q22 with multiple copies of the AML1 gene and mutation of the TP53 gene in therapy-related MDS and AML. *Leukemia* 19(2):197-200.
- Athale UH, Razzouk BI, Raimondi SC, Tong X, Behm FG, Head DR, Srivastava DK, Rubnitz JE, Bowman L, Pui CH and others. 2001. Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood* 97(12):3727-32.
- Avivi I, Rowe JM. 2005. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 12(1):62-7.
- Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Schoch C, Haferlach T. 2005. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients. *Ann Hematol* 84(12):785-91.
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86(2):263-74.
- Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G. 2006. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol* 24(5):790-7.
- Balgobind BV, Van Vlierberghe P, van den Ouweland AM, Beverloo HB, Terlouw-Kromosoeto JN, van Wering ER, Reinhardt D, Horstmann M, Kaspers GJ, Pieters R and others. 2008. Leukemia associated NF1 inactivation in pediatric T-ALL and AML patients lacking evidence for neurofibromatosis. *Blood*.
- Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, Tsang P, Curry B, Baird K, Meltzer PS and others. 2004. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(51):17765-70.
- Bench AJ, Li J, Huntly BJ, Delabesse E, Fourouclas N, Hunt AR, Deloukas P, Green AR. 2004. Characterization of the imprinted polycomb gene L3MBTL, a candidate 20q tumour suppressor gene, in patients with myeloid malignancies. *Br J Haematol* 127(5):509-18.

- Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, Holden JL, French L, Swanton S, Champion KM, Li J, Whittaker P, Stavrides G and others. 2000. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Oncogene* 19(34):3902-13.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33(4):451-8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103(4):620-5.
- Betts DR, Rohatiner AZ, Evans ML, Rassam SM, Lister TA, Gibbons B. 1992. Abnormalities of chromosome 16q in myeloid malignancy: 14 new cases and a review of the literature. *Leukemia* 6(12):1250-6.
- Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T. 2005. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 11(4):1416-24.
- Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T, Pejavar S, Mehta K, Carroll P, Simko JP and others. 2005. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1):7012-22.
- Boccuni P, MacGrogan D, Scandura JM, Nimer SD. 2003. The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *J Biol Chem* 278(17):15412-20.
- Brezinova J, Zemanova Z, Ransdorfova S, Sindelarova L, Siskova M, Neuwirtova R, Cermak J, Michalova K. 2005. Prognostic significance of del(20q) in patients with hematological malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 160(2):188-92.
- Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR. 2004. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350(16):1605-16.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS and others. 2002. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100(13):4325-36.
- Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, Zhang Y, Sinha R, Feng B, Stewart JP, Zhan F, Khatri D, Protopopova M. 2006. High-resolution genomic profiles define

distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 9(4):313-325.

- Casas S, Aventin A, Fuentes F, Vallespi T, Granada I, Carrio A, Angel Martinez-Climent J, Sole F, Teixido M, Bernues M and others. 2004. Genetic diagnosis by comparative genomic hybridization in adult de novo acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 153(1):16-25.
- Cassinat B, Chomienne C. 2001. Biological features of primary APL blasts: their relevance to the understanding of granulopoiesis, leukemogenesis and patient management. *Oncogene* 20(49):7154-60.
- Castuma MV, Rao PH, Acevedo SH, Larripa IB. 2000. Comparative genomic hybridization study of de novo myeloid neoplasia. *Acta Haematol* 104(1):25-30.
- Cerveira N, Correia C, Bizarro S, Pinto C, Lisboa S, Mariz JM, Marques M, Teixeira MR. 2006. SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene* 25(45):6147-52.
- Chao RC, Pyzel U, Fridlyand J, Kuo YM, Teel L, Haaga J, Borowsky A, Horvai A, Kogan SC, Bonifas J and others. 2005. Therapy-induced malignant neoplasms in Nf1 mutant mice. *Cancer Cell* 8(4):337-48.
- Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. 2005. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20(5):801-9.
- Cigudosa JC, Odero MD, Calasanz MJ, Sole F, Salido M, Arranz E, Martinez-Ramirez A, Urioste M, Alvarez S, Cervera JV and others. 2003. De novo erythroleukemia chromosome features include multiple rearrangements, with special involvement of chromosomes 11 and 19. *Genes Chromosomes Cancer* 36(4):406-12.
- Conde L, Montaner D, Burguet-Castell J, Tarraga J, Medina I, Al-Shahrour F, Dopazo J. 2007. ISACGH: a web-based environment for the analysis of Array CGH and gene expression which includes functional profiling. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W81-5.
- Cuneo A, Castoldi G, Michaux JL, Ferrant A, Chatelain B, Louwagie A, St Jan AZ, Boogaerts M, Cin PD, Van den Berghe H. 1996. Differences in the chromosomal profile of AML-M0 versus AML-M1: response. *Blood* 87(12):5381-2.
- Daser A, Rabbitts TH. 2004. Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev* 18(9):965-74.
- Diaz-Uriarte R, Alibes A, Morrissey ER, Canada A, Rueda OM, Neves ML. 2007. Asterias: integrated analysis of expression and aCGH data using an open-

source, web-based, parallelized software suite. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W75-80.

- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Frohling S, Dohner H. 2005. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics - interaction with other gene mutations. *Blood*.
- Engel E. 2006. A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet* 14(11):1158-69.
- Estey E, Dohner H. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368(9550):1894-907.
- Farag SS, Archer KJ, Mrozek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, Pettenati MJ, Baer MR, Qumsiyeh MB, Koduru PR and others. 2006. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* 108(1):63-73.
- Fong CT, White PS, Peterson K, Sapienza C, Cavenee WK, Kern SE, Vogelstein B, Cantor AB, Look AT, Brodeur GM. 1992. Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 52(7):1780-5.
- Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, Li H, Olshen A, Segraves R, Dairkee S, Tokuyasu T, Ljung BM, Jain AN and others. 2006. Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6(1):96.
- Friedberg EC. 2003. DNA damage and repair. *Nature* 421(6921):436-40.
- Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. 2002. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100(13):4372-80.
- Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. 2004. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22(4):624-33.
- Fung H, Shepherd JD, Naiman SC, Barnett MJ, Reece DE, Horsman DE, Nantel SH, Sutherland HJ, Spinelli JJ, Klingemann HG and others. 1995. Acute monocytic leukemia: a single institution experience. *Leuk Lymphoma* 19(3-4):259-65.
- Galm O, Herman JG. 2005. Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods Mol Med* 113:279-91.

- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA and others. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286(5439):531-7.
- Gorletta TA, Gasparini P, D'Elis MM, Trubia M, Pelicci PG, Di Fiore PP. 2005. Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 44(3):334-7.
- Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I and others. 1998. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391(6669):815-8.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A and others. 1998. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92(7):2322-33.
- Hacia JG, Fan JB, Ryder O, Jin L, Edgemon K, Ghandour G, Mayer RA, Sun B, Hsie L, Robbins CM and others. 1999. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 22(2):164-7.
- Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, Schoch C. 2005a. AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes Chromosomes Cancer* 43(2):113-27.
- Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, Schoch C. 2005b. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood* 106(4):1189-98.
- Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. 2002. Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br J Haematol* 118(2):426-31.
- Hao B, Oehlmann S, Sowa ME, Harper JW, Pavletich NP. 2007. Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Mol Cell* 26(1):131-43.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. 1999. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17(12):3835-49.

- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419(6903):135-41.
- Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, McGlave P. 2005. *Hematology: basic principles and practice*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier.
- Horrigan SK, Westbrook CA, Kim AH, Banerjee M, Stock W, Larson RA. 1996. Polymerase chain reaction-based diagnosis of del (5q) in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome identifies a minimal deletion interval. *Blood* 88(7):2665-70.
- Horsley SW, Mackay A, Irvani M, Fenwick K, Valgeirsson H, Dexter T, Ashworth A, Kearney L. 2006. Array CGH of fusion gene-positive leukemia-derived cell lines reveals cryptic regions of genomic gain and loss. *Genes Chromosomes Cancer* 45(6):554-64.
- Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9):949-51.
- Jaff N, Chelghoum Y, Elhamri M, Tigaud I, Michallet M, Thomas X. 2007. Trisomy 8 as sole anomaly or with other clonal aberrations in acute myeloid leukemia: impact on clinical presentation and outcome. *Leuk Res* 31(1):67-73.
- Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. 2005. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24):8573-8.
- Jong K, Marchiori E, Meijer G, Vaart AV, Ylstra B. 2004. Breakpoint identification and smoothing of array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* 20(18):3636-7.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083):818-21.
- Kim MH, Stewart J, Devlin C, Kim YT, Boyd E, Connor M. 2001. The application of comparative genomic hybridization as an additional tool in the chromosome analysis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 126(1):26-33.
- Kirschnerova G, Tothova A, Babusikova O. 2006. Amplification of AML1 gene in association with karyotype, age and diagnosis in acute leukemia patients. *Neoplasma* 53(2):150-4.
- Knudson AG. 2002. Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111(1):96-102.
- Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5(10):773-85.

- Lai F, Godley LA, Joslin J, Fernald AA, Liu J, Espinosa R, 3rd, Zhao N, Pamintuan L, Till BG, Larson RA and others. 2001. Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del(5q). *Genomics* 71(2):235-45.
- Li J, Bench AJ, Vassiliou GS, Fourouclas N, Ferguson-Smith AC, Green AR. 2004. Imprinting of the human L3MBTL gene, a polycomb family member located in a region of chromosome 20 deleted in human myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19):7341-6.
- Li ZY, Liu DP, Liang CC. 2005. New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Leukemia* 19(2):183-90.
- Licht JD. 2001. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* 20(40):5660-79.
- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. 1999. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341(14):1051-62.
- Lu D, Nounou R, Beran M, Estey E, Manshouri T, Kantarjian H, Keating MJ, Albitar M. 2003. The prognostic significance of bone marrow levels of neurofibromatosis-1 protein and ras oncogene mutations in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer* 97(2):441-9.
- Lyakhovich A, Shekhar MP. 2003. Supramolecular complex formation between Rad6 and proteins of the p53 pathway during DNA damage-induced response. *Mol Cell Biol* 23(7):2463-75.
- Marlton P, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, Freireich EJ, Estey E. 1995. Cytogenetic and clinical correlates in AML patients with abnormalities of chromosome 16. *Leukemia* 9(6):965-71.
- Martinez-Ramirez A, Urioste M, Alvarez S, Vizmanos JL, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Benitez J. 2004. Cytogenetic profile of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes: an analysis using spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 153(1):39-47.
- Martinez-Ramirez A, Urioste M, Melchor L, Blesa D, Valle L, de Andres SA, Kok K, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Benitez J. 2005. Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer* 42(3):287-98.
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Armour JA, Jeffreys AJ, Ladda RL, Nicholls RD. 1992. The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med* 326(24):1599-607.
- Matsuzawa SI, Reed JC. 2001. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 7(5):915-26.

- Melnick A, Licht JD. 1999. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93(10):3167-215.
- Midmer M, Haq R, Squire JA, Zanke BW. 1999. Identification of NKIAMRE, the human homologue to the mitogen-activated protein kinase-/cyclin-dependent kinase-related protein kinase NKIATRE, and its loss in leukemic blasts with chromosome arm 5q deletion. *Cancer Res* 59(16):4069-74.
- Miles DK, Freedman MH, Stephens K, Pallavicini M, Sievers EL, Weaver M, Grunberger T, Thompson P, Shannon KM. 1996. Patterns of hematopoietic lineage involvement in children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *Blood* 88(11):4314-20.
- Mitelman F JBaMFE. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2005). <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. 1991. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10431-4.
- Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguez P, Vera J, Mukherjee S, Valls J and others. 2006. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue):W486-91.
- Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, Navarro A, Perea G, Esteve J, Artells R, Granell M, Berlanga J, Ribera JM and others. 2006. Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia. *Blood* 107(12):4871-9.
- Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. 2004. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18(2):115-36.
- Mrozek K, Prior TW, Edwards C, Marcucci G, Carroll AJ, Snyder PJ, Koduru PR, Theil KS, Pettenati MJ, Archer KJ and others. 2001. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 19(9):2482-92.
- Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrio D, Barroso A, Rodriguez S, Cigudosa JC, Diez O, Alonso C and others. 2003. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin Cancer Res* 9(10 Pt 1):3606-14.

- Park S, Picard F, Azgui Z, Viguie F, Merlat A, Guesnu M, Leblond V, Dreyfus F. 2002. Erythroleukemia: a comparison between the previous FAB approach and the WHO classification. *Leuk Res* 26(5):423-9.
- Paulsson K, Bekassy AN, Olofsson T, Mitelman F, Johansson B, Panagopoulos I. 2006a. A novel and cytogenetically cryptic t(7;21)(p22;q22) in acute myeloid leukemia results in fusion of RUNX1 with the ubiquitin-specific protease gene USP42. *Leukemia* 20(2):224-9.
- Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, Staaf J, Jonsson G, Borg A, Fioretos T, Johansson B. 2006b. High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia* 20(5):840-6.
- Paulsson K, Sall T, Fioretos T, Mitelman F, Johansson B. 2001. The incidence of trisomy 8 as a sole chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age, prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology. *Cancer Genet Cytogenet* 130(2):160-5.
- Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jenniges T, Garcia F, Haden K, Li J, Shaw CA, Belmont J and others. 2006. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 16(9):1136-48.
- Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, Fisch P, Timmer J, Veelken H. 2007. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 109(3):1202-10.
- Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y and others. 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20(2):207-11.
- Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, Ciolli S, Guglielmelli P, Antonioli E, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. 2006. The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 20(11):2074-6.
- Popovic R, Zeleznik-Le NJ. 2005. MLL: how complex does it get? *J Cell Biochem* 95(2):234-42.
- Puccetti E, Ruthardt M. 2004. Acute promyelocytic leukemia: PML/RARalpha and the leukemic stem cell. *Leukemia* 18(7):1169-75.
- Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ, Lister TA, Young BD. 2005. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65(2):375-8.

- Reynolds RM, Browning GG, Nawroz I, Campbell IW. 2003. Von Recklinghausen's neurofibromatosis: neurofibromatosis type 1. *Lancet* 361(9368):1552-4.
- Rucker FG, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka DB, Wessendorf S, Frohling S, Bentz M, Miller S, Scholl C, Schlenk RF and others. 2006a. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol* 24(24):3887-94.
- Rucker FG, Sander S, Dohner K, Dohner H, Pollack JR, Bullinger L. 2006b. Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations. *Leukemia* 20(6):994-1001.
- Sanderson RN, Johnson PR, Moorman AV, Roman E, Willett E, Taylor PR, Proctor SJ, Bown N, Ogston S, Bowen DT. 2006. Population-based demographic study of karyotypes in 1709 patients with adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20(3):444-50.
- Sanger F, Donelson JE, Coulson AR, Kossel H, Fischer D. 1973. Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(4):1209-13.
- Santana-Davila R, Holtan SG, Dewald GW, Ketterling RP, Knudson RA, Hanson CA, Steensma DP, Tefferi A. 2008. Chromosome 5q deletion: Specific diagnoses and cytogenetic details among 358 consecutive cases from a single institution. *Leuk Res* 32(3):407-11.
- Santarosa M, Ashworth A. 2004. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654(2):105-22.
- Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y, Yukiue H, Fukai I, Fujii Y. 2004. Decreased Hrad6B expression in lung cancer. *Acta Oncol* 43(6):585-9.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. 2005. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106(12):3733-9.
- Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. 2005. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer* 43(3):227-38.
- Schoch C, Kohlmann A, Dugas M, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. 2006. Impact of trisomy 8 on expression of genes located on chromosome 8 in different AML subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 45(12):1164-8.
- Side LE, Emanuel PD, Taylor B, Franklin J, Thompson P, Castleberry RP, Shannon KM. 1998. Mutations of the NF1 gene in children with juvenile

myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis, type 1. *Blood* 92(1):267-72.

Slany RK. 2005. When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematol Oncol* 23(1):1-9.

Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM and others. 2000. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96(13):4075-83.

Stass SA, Lanham GR, Butler D, Williams DL, Peiper SC, Kalwinsky DK, Dahl GV. 1984. Auer rods in mature granulocytes: a unique morphologic feature of acute myelogenous leukemia with maturation. *Am J Clin Pathol* 81(5):662-5.

Stephens K, Weaver M, Leppig KA, Maruyama K, Emanuel PD, Le Beau MM, Shannon KM. 2006. Interstitial uniparental isodisomy at clustered breakpoint intervals is a frequent mechanism of NF1 inactivation in myeloid malignancies. *Blood* 108(5):1684-9.

Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. 2006. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 107(9):3724-6.

Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ, Lopez A, Garcia-Larana J, Perez-Lopez C, Tormo M, Lavilla E, Lopez-Berges MC, de Santiago M and others. 2005. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 90(1):54-9.

Tchinda J, Dijkhuizen T, Vlies P, Kok K, Horst J. 2004. Translocations involving 6p22 in acute myeloid leukaemia at relapse: breakpoint characterization using microarray-based comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 126(4):495-500.

Teh MT, Blaydon D, Chaplin T, Foot NJ, Skoulakis S, Raghavan M, Harwood CA, Proby CM, Philpott MP, Young BD and others. 2005. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res* 65(19):8597-603.

Trost D, Hildebrandt B, Beier M, Muller N, Germing U, Royer-Pokora B. 2006. Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 165(1):51-63.

- Tyybakinoja A, Elonen E, Piippo K, Porkka K, Knuutila S. 2007. Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21(3):571-4.
- Tyybakinoja A, Saarinen-Pihkala U, Elonen E, Knuutila S. 2006. Amplified, lost, and fused genes in 11q23-25 amplicon in acute myeloid leukemia, an array-CGH study. *Genes Chromosomes Cancer* 45(3):257-64.
- Uchida Y, Hama H, Alderson NL, Douangpanya S, Wang Y, Crumrine DA, Elias PM, Holleran WM. 2007. Fatty acid 2-hydroxylase, encoded by FA2H, accounts for differentiation-associated increase in 2-OH ceramides during keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 282(18):13211-9.
- Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Lowenberg B and others. 2004. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350(16):1617-28.
- Venditti A, Del Poeta G, Stasi R, Buccisano F, Aronica G, Bruno A, Cox C, Maffei L, Tamburini A, Papa G and others. 1996. Biological profile of 23 cases of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0) and its clinical implications. *Blood* 87(1):418-20.
- Vey N, Mozziconacci MJ, Groulet-Martinec A, Debono S, Finetti P, Carbuccia N, Beillard E, Devilard E, Arnoulet C, Coso D and others. 2004. Identification of new classes among acute myelogenous leukaemias with normal karyotype using gene expression profiling. *Oncogene* 23(58):9381-91.
- Villamor N, Zarco MA, Rozman M, Ribera JM, Feliu E, Montserrat E. 1998. Acute myeloblastic leukemia with minimal myeloid differentiation: phenotypical and ultrastructural characteristics. *Leukemia* 12(7):1071-5.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10(8):789-99.
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, George SL and others. 2001. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 61(19):7233-9.
- Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL and others. 2007. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*.
- Wilson CS, Davidson GS, Martin SB, Andries E, Potter J, Harvey R, Ar K, Xu Y, Kopecky KJ, Ankerst DP and others. 2006. Gene expression profiling of

adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood* 108(2):685-96.

- Wolman SR, Gundacker H, Appelbaum FR, Slovak ML. 2002. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 100(1):29-35.
- Yamamoto K, Nagata K, Kida A, Hamaguchi H. 2001. Deletion of 16q11 is a recurrent cytogenetic aberration in acute myeloblastic leukemia during disease progression. *Cancer Genet Cytogenet* 131(1):65-8.
- Yamashita Y, Minoura K, Taya T, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Choi YL, Soda M, Hatanaka H, Enomoto M and others. 2007. Analysis of chromosome copy number in leukemic cells by different microarray platforms. *Leukemia* 21(6):1333-7.
- Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. 2005. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 19(8):1345-9.
- Yee KW, Moore SJ, Midmer M, Zanke BW, Tong F, Hedley D, Minden MD. 2003. NKIAMRE, a novel conserved CDC2-related kinase with features of both mitogen-activated protein kinases and cyclin-dependent kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 308(4):784-92.
- Zhang Y, Taylor BR, Shannon K, Clapp DW. 2001. Quantitative effects of Nf1 inactivation on in vivo hematopoiesis. *J Clin Invest* 108(5):709-15.
- Zhang YY, Vik TA, Ryder JW, Srour EF, Jacks T, Shannon K, Clapp DW. 1998. Nf1 regulates hematopoietic progenitor cell growth and ras signaling in response to multiple cytokines. *J Exp Med* 187(11):1893-902.
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M and others. 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416(6882):703-9.

ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1: información clínica de los casos utilizados para el estudio

Caso	Pronóstico	Cariotipo previo	FLT3	OMS	Edad	NLS	LDH	%Blasto	Infiltrado	ECOG	Estado	Meses de evolución
1	Favorable	46,XX,inv(16)(p13;q22) 46,XX,del(11)(p15),inv(16)(p13;q22)	WT	inv(16)	-	-	-	81	-	-	-	-
2	Intermedio	46,XY,del(7)(q31)	WT	M5	62	-	-	68	-	-	Fallecido	-
3	Intermedio	47,XY,+8	FLT3-ITD	M5	20	-	-	65	-	-	Fallecido	-
4	Intermedio	46,XY	FLT3-ITD	M5	47	97300	-	98	No	0	Fallecido	1.63
5	Favorable	46,XX,inv(16)(p13q22)	WT	inv(16)	67	-	-	70	-	-	Fallecido	36.67
6	Favorable	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)	WT	t(8;21)	28	41900	1967	74	Si	1	Vivo	60.00
7	Intermedio	46,XY,del(20)(q12)	WT	M5	74	21100	-	92	No	0	Fallecido	39.00
8	Intermedio	46,XY,del(7)(q22)	WT	M1	68	10900	240	60	No	1	Fallecido	0.63
9	Favorable	46,XY,inv(16)(p13q22)	WT	inv(16)	57	1290	-	82	-	-	Fallecido	44.53
10	Favorable	47,XX,+8,inv(16)(p13q22)	WT	inv(16)	51	120000	895	70	No	2	Fallecido	4.77
11	Intermedio	46,XX	WT	M6	67	4300	577	25.6	No	0	Vivo	60.00
12	Intermedio	46,XY/45,XY,-18	WT	M2	79	31600	441	99	No	2	Fallecido	0.90
13	Favorable	46,XX,inv(16)(p13q22)	WT	inv(16)	46	40500	350	32	No	0	Fallecido	13.70
14	Intermedio	47,XX,+8	FLT3-ITD	M1	66	62500	1746	99	No	1	Vivo	60.00
15	Intermedio	46,XY	FLT3-ITD	M2	71	54000	864	68	No	0	Fallecido	8.40
16	Intermedio	46,XX,16qh+	WT	M4	40	-	-	43	Si	2	Fallecido	11.03
17	Intermedio	46,XY	WT	M5	63	31000	286	82	No	1	Vivo	60.00
18	Favorable	46,XX,t(8;21)(q22;q22)	WT	t(8;21)	49	6100	300	55	No	2	Fallecido	12.67
19	Intermedio	46,XX	WT	M4	64	24000	880	53	No	0	Fallecido	17.30
20	Intermedio	47,XY,+19	WT	M2	27	2300	680	37	No	1	Fallecido	9.10
21	Intermedio	47,XY,+8	FLT3-ITD	M6	46	9510	-	91	-	-	Fallecido	-
22	Intermedio	46,XY	FLT3-ITD	M2	48	150000	529	85	No	1	Fallecido	22.60
23	Adverso	46,XX,del(5)(q13q31) 46,XX,del(5)(q13q31),der(12)add(12)(p13), 16,der(17)add(17)(p13),-18,+2mar	WT	M4	72	3810	570	66	No	3	Fallecido	2.57
24	Intermedio	46,XY	WT	M1	78	15900	323	73	No	2	Fallecido	1.90
25	Adverso	46,XX,t(6;9)(p23;q34)	FLT3-ITD	M4	30	6700	491	66	No	0	Fallecido	11.63

Caso	Pronóstico	Cariotipo previo	FLT3	OMS	Edad	NLS	LDH	%Blasto	Infiltrado	ECOG	Estado	Meses de evolución
26	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M1	28	14450	16764	92	No	-	Fallecido	7.13
27	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M2	55	43600	607	74	No	1	Vivo	60.00
28	Intermedio	46,XY	WT	M5	67	-	-	82	-	-	Fallecido	4.67
29	Intermedio	47,XX,+8	FLT3-ITD	M5	67	89840	6687	91	No	1	Fallecido	1.47
30	Intermedio	46,XX	WT	M4	65	3290	441	45	No	1	Vivo	60.00
31	Intermedio	47,XY,+8	WT	M2	56	12000	-	68	No	-	Vivo	60.00
32	Intermedio	47,XX,+8	WT	M5	23	3300	2414	74	-	-	-	-
33	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M2	70	69000	2074	93	No	0	Fallecido	10.40
34	Intermedio	46,XY	WT	M1	39	65970	4670	70	No	2	Vivo	58.80
35	Favorable	46,XY,inv(16)(p13q22) 46,XYqh+,del(2)(q31),inv(16)(p13q22)	WT	inv(16)	73	23600	906	85	-	-	Vivo	57.50
36	Intermedio	46,XY	WT	M5	64	16100	1082	93	No	1	Fallecido	32.60
37	Adverso	46,XX,-7,+mar	WT	M6	75	-	-	-	-	-	-	-
38	Intermedio	46,XY	WT	M0	74	1600	339	97	-	-	Fallecido	0.50
39	Intermedio	47,XY,+13	WT	M1	76	440000	2680	83	Si	2	Fallecido	1.07
40	Intermedio	46,XY	FLT3-ITD	M1	72	11000?	2100	75	No	1	Fallecido	18.07
41	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M4	86	38800	1433	72	No	1	Fallecido	4.57
42	Intermedio	46,XX	WT	M2	76	193000	2453	50	Si	-	Fallecido	0.20
43	Intermedio	47,XY,+8	WT	M6	80	3000	-	23	No	3	Vivo	54.73
44	Intermedio	48,XY,+6,+8	WT	M6	66	1400	773	51	No	0	Fallecido	6.07
45	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M2	69	87000	695	85	No	1	Fallecido	1.93
46	Intermedio	46,XY	WT	M5	43	75000	1162	100	No	4	Fallecido	0.77
47	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M1	74	200000	481	94	No	0	Fallecido	0.27
48	Intermedio	46,XY	WT	M1	32	159000	780	96	No	0	Vivo	45.97
49	Intermedio	46,XX	WT	M4	53	16000	418	71	No	0	Vivo	40.77
50	Intermedio	48,XX,+11,+14	WT	M1	57	3000	232	62.4	No	1	Vivo	38.67
51	Intermedio	46,XY	WT	M1	66	18000	840	75	No	2	Fallecido	0.80
52	Intermedio	47,XY,+8	WT	M0	81	15700	469	80	No	1	Fallecido	4.73
53	Intermedio	47,XY,del(5)(q13q31),+21	WT	M2	51	2400	-	90	No	1	Fallecido	2.13

Caso	Pronóstico	Cariotipo previo	FLT3	OMS	Edad	NLS	LDH	%Blasto	Infiltrado	ECOG	Estado	Meses de evolución
54	Intermedio	46,XY,del(20)(q11)	WT	M0	86	17100	-	54	No	2	Fallecido	2.87
55	Intermedio	46,XY	FLT3-ITD	M5	46	-	-	86	-	-	-	-
56	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M2	73	58000	771	95	No	1	Fallecido	3.80
57	Intermedio	46,XX,del(7)(q11q22)	WT	M5	24	-	-	86	-	1	Vivo	34.27
58	Intermedio	46,XY,i(14)(q10)	WT	M5	60	163000	347	75	No	2	Fallecido	5.97
59	Adverso	46,XX,-7,+mar	WT	M1	76	4400	310	25	No	2	Fallecido	6.77
60	Intermedio	46,XY	FLT3-ITD	M2	63	3500	315	70	No	0	Vivo	34.57
61	Favorable	46,XY,t(8;21)(q22;q22)	WT	t(8;21)	25	7800	1079	70	No	1	Vivo	32.67
62	Intermedio	46,XX	WT	M5	64	84600	823	74	No	1	Fallecido	7.07
63	Intermedio	46,XX,t(7;11)(p15;p15)	WT	M2	60	7300	472	40	No	1	Fallecido	21.13
64	Intermedio	46,XX	WT	M5	59	2600	984	90	Si	1	Fallecido	12.80
65	Intermedio	46,XX	WT	M4	37	73400	3222	37	-	2	Fallecido	0.40
66	Intermedio	48,XY,+8,+9	WT	M5	44	13000	771	90	No	1	Fallecido	3.50
67	Favorable	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)	WT	t(8;21)	28	13900	2195	51	No	1	Vivo	24.73
68	Intermedio	46,XX	WT	M2	73	1300	540	56	Si	3	Fallecido	7.33
69	Intermedio	47,XY,+8 (37%)	WT	M5	72	95000	9552	88	No	3	Fallecido	0.03
70	Adverso	53,XX,inv(1)(p?;q?),+8,+21x6 [33%]	WT	M5	70	1700	295	90	No	1	Fallecido	12.13
71	Intermedio	46,XX	WT	M5	64	86000	1159	80	No	0	Vivo	20.60
72	Adverso	46,XX,+8,+8,-17,-18 [71%]	WT	M1	68	4940	1794	98	Si	2	Fallecido	8.13
73	Intermedio	47,XX,+9 [83%]	WT	M5	54	4400	268	85	No	-	Fallecido	4.80
74	Adverso	46,XY	FLT3-ITD	MLL	76	133200	1893	95	No	3	Fallecido	0.27
75	Intermedio	47,XY,+8	WT	M0	60	2380	628	91	No	1	Vivo	12.43
76	Intermedio	46,XY,add(1)(p36) [40%]	WT	M5	76	55600	1274	74	-	-	Fallecido	0.57
77	Intermedio	46,XY	WT	M1	69	1300	385	49	No	3	Fallecido	0.77
78	Intermedio	46,XX	WT	M2	52	77900	1498	77	No	0	Vivo	14.90
79	Adverso	44,XY,der(1q),-5,-9,i(9)(q10),add(19)(q13) [47%]	WT	M1	56	4400	792	25.2	No	2	Fallecido	7.40
80	Adverso	43,XY,del(3q),del(5q),-7, add(12)(p13),add(17)(p12),-18,-19	WT	M1	77	4000	202	90	No	1	Fallecido	0.57
81	Adverso	45,X,-Y,der(17)dup(7)(q21q32)	WT	M5	80	102000	941	75	No	3	Fallecido	0.27

Caso	Pronóstico	Cariotipo previo	FLT3	OMS	Edad	NLS	LDH	%Blasto	Infiltrado	ECOG	Estado	Meses de evolución
82	Adverso	45,XX,del(4q),del(5)(q13q32),der(11)add(11p),-12,-15,add(17)(p13),+mar	WT	M4	79	15980	599	70	No	4	Fallecido	0.20
83	Intermedio	47,XY,+13 [57%]	FLT3-ITD	M0	71	3200	321	40	No	1	Vivo	12.97
84	Intermedio	46,XY	-	M4	64	1000	525	42	No	2	Vivo	13.93
85	Intermedio	47,XY,+8	WT	M2	64	21100	920	21	No	1	Fallecido	8.67
86	Favorable	46,XY,del(2q),del(5q),del(11q), +2mar,inv(16)(p13;q22)	WT	inv(16)	40	34500	877	70	No	0	Fallecido	2.17
87	Favorable	51,XY,+8,+13,+14,+20,+22, inv(16)(p13;q22)	WT	inv(16)	20	14900	813	56	No	-	Fallecido	0.77
88	Intermedio	47,XY,del(20)(q11)x2	WT	M6	71	3820	-	42	No	1	Fallecido	3.07
89	Intermedio	46,XX	WT	M1	32	3600	380	83	No	1	Vivo	6.43
90	Favorable	46,XY,inv(16)(p13q22)	WT	inv(16)	41	82900	2852	70	No	0	Vivo	7.57
91	Intermedio	46,XX	WT	M1	32	3950	350	88	No	3	Vivo	5.00
92	Favorable	46,XY,inv(16)(p13q22)	WT	inv(16)	-	-	-	52	-	-	-	-
93	Intermedio	46,XX	WT	M4	76	24860	581	57	No	1	Fallecido	0.37
94	Intermedio	46,XX	FLT3-ITD	M2	64	6400	3452	56	No	1	Vivo	5.73
95	Intermedio	46,XY	WT	M5	-	-	-	69	-	-	-	-
96	Intermedio	46,XY	WT	M1	75	2000	662	90	No	0	Vivo	5.43
97	Intermedio	46,XX	WT	M4	37	11720	582	36	No	0	Vivo	6.40
98	Intermedio	46,XX	WT	M5	74	4000	415	74	No	2	Fallecido	4.20
99	Adverso	46,XY,t(11;12)(q13;p13),der(12p),del(17)(p13),der(17p)	WT	M0	75	2200	376	37	No	0	Vivo	3.93
100	Intermedio	47,XY,+19	WT	M5	75	60000	1940	88	Si	2	Fallecido	0.17

Pronóstico: grupo de riesgo citogenético utilizando la CALGB

FLT3: análisis de la presencia de mutaciones de repetición interna en tándem en el gen *FLT3*

OMS: clasificación de la LMA por el criterio de la OMS

Edad: edad al diagnóstico (en años)

NLS: número de leucocitos en sangre (células/ μ l)

LDH: lactato deshidrogenasa (U/L)

% Blastos: porcentaje de blastos en médula

Infiltrado: presencia de infiltrado extramedular

ECOG: escala ECOG

Estado: estado del paciente (muerto o no) a los cinco años tras el diagnóstico

Meses de evolución: meses de vida del paciente (máximo cinco años)

Tabla suplementaria 2. Polimorfismos de número de copia detectados en LMA utilizando array-CGH

Polimorfismo	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (pb)	Casos
Ganancia	1	12795076	13101013	305937	32
Ganancia	1	103875725	104009322	133597	75
Ganancia	2	241114617	241166617	52000	53,81
Ganancia	3	199216869	199292130	75261	6
Ganancia	4	3488130	3556852	68722	67
Ganancia	5	179154835	179159242	4407	81
Ganancia	7	142276697	142351543	74846	60
Ganancia	7	142863066	143094553	231487	59
Ganancia	8	55045477	55247833	202356	62
Ganancia	12	52635734	52666934	31200	52
Ganancia	15	41676219	41726139	49920	21
Ganancia	16	593282	640311	47029	81
Ganancia	16	34481842	34847384	365542	72
Ganancia	17	21260658	21442522	181864	20
Ganancia	17	76966394	77047563	81169	1,81
Ganancia	19	1067068	1162699	95631	31
Ganancia	19	1376923	1390200	13277	3,21,32,63
Ganancia	20	60418677	60478172	59495	53
Delección	1	1286916	1532140	245224	64
Delección	1	1532086	1536363	4277	82
Delección	1	16794038	16977123	183085	75,87
Delección	1	103875725	104009322	133597	1,11,12,39,48,59,61,65,76,77,78,85, 89,91,93,95
Delección	1	193477721	193528820	51099	5,12,16,17,18,30,37,44,48,53,59,66,72,73,87,89,92,93
Delección	2	110199090	110337776	138686	41
Delección	2	130843354	131033903	190549	72
Delección	2	242646352	242757116	110764	12,89,91
Delección	3	15068057	15088471	20414	52
Delección	5	171560278	171603838	43560	59
Delección	6	204528	295265	90737	6,16,23,48,85
Delección	6	31275262	31315719	40457	10
Delección	6	32066971	32088729	21758	9,27,76
Delección	7	62098454	62277792	179338	50
Delección	7	142351484	142398232	46748	15,38,39,99
Delección	10	81687481	81695442	7961	34
Delección	11	484533	522279	37746	94
Delección	14	47317645	47520952	203307	27
Delección	15	41676219	41726139	49920	6
Delección	16	390584	511828	121244	59
Delección	17	37100216	37123151	22935	4
Delección	17	42143048	42360303	217255	86
Delección	19	22805184	23128961	323777	80
Delección	21	10013263	10079120	65857	21
Delección	22	14433473	15605162	1171689	45
Delección	22	20647659	20747674	100015	25
Delección	22	23946476	24216807	270331	96
Delección	22	24156238	24216807	60569	34
Delección	22	37683612	37709985	26373	26

Tabla suplementaria 3. Alteraciones detectadas en LMA utilizando array-CGH

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
1	inv(16)	Ganancia	6	27208521	27212836	4.32
		Deleción	13	57009987	57197787	187.80
2	Resto intermedios	-	-	-	-	-
3	Trisomía simple	Deleción	6	32477762	32605337	127.58
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	19	602028	633057	31.03
		Ganancia	19	53909246	53924758	15.51
4	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
5	inv(16)	Deleción	1	149386203	149399354	13.15
		Deleción	15	54855502	54986764	131.26
		Deleción	17	24394045	27576519	3182.47
		Deleción	21	34277780	36229777	1952.00
6	t(8;21)	Deleción	1	149386203	149399354	13.15
		Deleción	2	62639539	62780809	141.27
7	Resto intermedios	Deleción	4	62447	4983488	4921.04
		Ganancia	11	110936751	133951370	23014.62
		Deleción	20	30897918	49388214	18490.30
8	Resto intermedios	Deleción	7	95458771	148149728	52690.96
9	inv(16)	Deleción	20	43638107	43692923	54.82
10	inv(16)	Ganancia	1	198168603	198192467	23.86
		Deleción	3	110503436	110719842	216.41
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	18	6932021	8343275	1411.25
		Ganancia	20	44001697	44078612	76.92
		Ganancia	21	44381910	44413495	31.59
11	Cariotipo normal	Ganancia	8	47655222	48067921	412.70
12	Resto intermedios	Deleción	7	149268	63879603	63730.34
		Deleción	11	7777067	7774613	2.55
		Deleción	12	53642606	53754598	111.99
		Deleción	18	170229	13816094	13645.87
		Deleción	20	28081598	29423700	1342.10
13	inv(16)	Deleción	16	15705303	16213237	507.93
		Deleción	16	65595593	67107679	1512.09
14	Trisomía simple	Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
15	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
16	Cariotipo normal	Ganancia	11	66952782	66960508	7.73
17	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
18	t(8;21)	-	-	-	-	-
19	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
20	Trisomía simple	Ganancia	19	232080	63784382	63552.30
21	Trisomía simple	Deleción	1	155139399	155351678	212.28
		Deleción	6	26346139	26378998	32.86
		Deleción	7	54532292	54746162	213.87
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	19	4316115	4354030	37.92
22	Cariotipo normal	-	-	-	-	-

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
23	Complejo	Delección	5	64480424	154801366	90320.94
		Delección	6	73428247	74286278	858.03
		Delección	12	15665223	16406192	740.97
		Ganancia	12	16594603	16676972	82.37
		Delección	12	16935827	19538196	2602.37
		Delección	16	45258	88651780	88606.52
		Delección	17	15432414	23709984	8277.57
		Delección	17	25747113	31456690	5709.58
		Delección	18	170229	16904246	16734.02
		Delección	18	21866420	30700104	8833.68
		Delección	18	38169137	76083117	37913.98
		Ganancia	21	10013263	33027142	23013.88
		Ganancia	21	36517408	42427453	5910.05
Ganancia	21	45827900	46892352	1064.45		
24	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
25	Resto adversos	Ganancia	7	64090975	64136145	45.17
26	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
27	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
28	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
29	Trisomía simple	Ganancia	7	127410523	127538375	127.85
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
30	Cariotipo normal	Delección	12	52939144	52961859	22.72
		Delección	19	8292714	8341667	48.95
31	Trisomía simple	Ganancia	10	138206	135293404	135155.20
32	Trisomía simple	Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	19	53917176	53924758	7.58
33	Cariotipo normal	Delección	15	39339722	39361680	21.96
34	Cariotipo normal	Delección	1	148556830	148601248	44.42
35	Inv(16)	-	-	-	-	-
36	Cariotipo normal	Ganancia	9	89474382	89663932	189.55
		Ganancia	18	13875256	13961521	86.27
		Ganancia	18	61189566	61430753	241.19
37	Resto adversos	Delección	7	149268	158588112	158438.84
		Ganancia	21	10013263	46892352	36879.09
38	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
39	Trisomía simple	Ganancia	13	18601703	114077122	95475.42
40	Cariotipo normal	Delección	6	22679441	22700683	21.24
		Delección	7	21098797	21230591	131.79
41	Cariotipo normal	Delección	6	8046936	18332437	10285.50
		Delección	11	7777067	7774613	2.55
42	Cariotipo normal	Delección	21	28368917	28418310	49.39
43	Trisomía simple	Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
44	Doble trisomía	Delección	1	92077244	92233560	156.32
		Delección	3	171590713	171634444	43.73
		Delección	3	186735226	187100440	365.21
		Ganancia	6	204528	170809934	170605.41
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Delección	15	39263642	39466885	203.24
Ganancia	17	38832482	39014573	182.09		

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
45	Cariotipo normal	Delección	7	143390024	144615745	1225.72
		Ganancia	13	19104540	19255024	150.48
46	Cariotipo normal	Delección	3	145827082	146012587	185.51
		Ganancia	4	98112136	98185795	73.66
		Ganancia	18	13875256	13961521	86.27
47	Cariotipo normal	Ganancia	1	224312023	224909699	597.68
		Ganancia	2	172777833	172791872	14.04
		Ganancia	3	39119326	39209044	89.72
		Ganancia	12	48637052	48645669	8.62
48	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
49	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
50	Doble trisomía	Delección	9	34105673	34178026	72.35
		Ganancia	11	186966	133951370	133764.40
		Ganancia	14	18402516	106329869	87927.35
51	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
52	Trisomía simple	Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Delección	9	34105673	34178026	72.35
53	Resto adversos	Ganancia	5	1930595	1932462	1.87
		Delección	5	90712814	158761738	68048.92
		Ganancia	11	65793544	65858485	64.94
54	Cariotipo normal	Delección	20	30585065	49834736	19249.67
55	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
56	Cariotipo normal	Delección	7	54596358	54746162	149.80
57	Resto intermedios	Ganancia	7	149268	62277792	62128.52
		Delección	7	62553122	158588112	96034.99
58	Trisomía simple	Delección	12	45896674	46052722	156.05
		Ganancia	14	18402516	106329869	87927.35
		Ganancia	19	60632058	60853735	221.68
59	Resto adversos	Delección	4	57236373	57683223	446.85
		Delección	5	68203607	70784638	2581.03
		Delección	5	133526865	134264343	737.48
		Delección	7	149268	75885451	75736.18
		Delección	7	147693185	158588112	10894.93
		Delección	8	30557351	30721635	164.28
		Delección	8	33348916	33525017	176.10
		Delección	11	57032486	57267060	234.57
		Delección	11	61840384	62404326	563.94
Ganancia	19	2166856	2203064	36.21		
60	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
61	t(8;21)	Ganancia	10	26651992	26767274	115.28
		Ganancia	18	25349753	25553838	204.09
62	Cariotipo normal	Ganancia	6	39374262	39380117	5.86
		Ganancia	18	61189566	61430753	241.19
63	Resto intermedios	Ganancia	2	233099731	233170091	70.36
		Delección	7	54596358	54746162	149.80
		Delección	14	18402516	18765437	362.92

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
64	Cariotipo normal	Delección	7	99885360	99923768	38.41
		Delección	11	66952782	66960508	7.73
		Delección	19	8292714	8341667	48.95
		Delección	20	32611751	32612047	0.30
65	Cariotipo normal	Delección	6	28205805	28218925	13.12
66	Doble trisomía	Delección	3	196133259	196270358	137.10
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	9	204367	138284752	138080.39
67	t(8;21)	Ganancia	3	42676533	42706908	30.38
		Ganancia	10	360819	966693	605.87
		Ganancia	14	36055761	36120957	65.20
68	Cariotipo normal	Delección	2	23962709	26320483	2357.77
		Ganancia	16	1111470	1211711	100.24
		Ganancia	19	50541405	50587942	46.54
69	Trisomía simple	Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	19	60658091	60853735	195.64
70	Complejo	Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Delección	12	6748327	7708477	960.15
		Delección	17	71488671	71511380	22.71
		Delección	20	29870997	43137505	13266.51
		Ganancia	21	10013263	34277839	24264.58
		Delección	21	34332139	36643532	2311.39
71	Cariotipo normal	Ganancia	4	42889123	43060891	171.77
		Delección	2	162307200	242757116	80449.92
72	Complejo	Delección	7	64090975	64714017	623.04
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	16	45258	31835614	31790.36
		Delección	16	34059589	34242154	182.57
		Delección	16	45172598	88651780	43479.18
		Delección	17	48539	46826980	46778.44
		Delección	18	170229	76083117	75912.89
73	Resto intermedios	Delección	3	191560644	191855430	294.79
		Ganancia	7	16607806	16996069	388.26
		Delección	9	20336094	20943091	607.00
		Ganancia	9	20992866	138284752	117291.89
		Ganancia	11	117907606	133951370	16043.76
74	Cariotipo normal	Delección	7	54596358	54746162	149.80
		Delección	12	4525039	4579165	54.13
75	Trisomía simple	Delección	9	137258417	137318434	60.02
		Ganancia	10	138206	135293404	135155.20
76	Resto intermedios	Delección	1	604268	28647274	28043.01
		Ganancia	1	142416822	245422419	103005.60
		Ganancia	3	139856678	199292130	59435.45
		Delección	21	28368917	28418310	49.39
77	Cariotipo normal	Delección	21	28368917	28418310	49.39
78	Cariotipo normal	-	-	-	-	-

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
79	Complejo	Deleción	5	148243	20599752	20451.51
		Deleción	9	204367	1728574	1524.21
		Ganancia	9	1972355	7952341	5979.99
		Deleción	9	15581401	23650030	8068.63
		Ganancia	9	23843392	25357384	1513.99
		Ganancia	9	27316598	27562178	245.58
		Ganancia	9	29209997	29591894	381.90
		Deleción	9	29743333	30542394	799.06
		Deleción	9	31463840	42531199	11067.36
		Deleción	13	26314494	26518090	203.60
		Deleción	17	29622249	29625988	3.74
		Ganancia	17	75057499	78623230	3565.73
		Ganancia	19	7371913	8292764	920.85
		Deleción	19	8341611	9130554	788.94
		Ganancia	19	9238958	11522106	2283.15
		Deleción	19	11526026	12006005	479.98
		Ganancia	19	12103867	12157782	53.92
		Deleción	19	12222694	13111668	888.97
		Ganancia	19	13120858	15342900	2222.04
		Deleción	19	15352798	15790679	437.88
		Ganancia	19	15858355	17034839	1176.48
		Deleción	19	17096592	23783753	6687.16
Ganancia	19	24020549	24132581	112.03		

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
80	Complejo	Ganancia	1	149386203	149399354	13.15
		Delección	1	190009274	191102440	1093.17
		Ganancia	1	245361556	245422419	60.86
		Delección	2	16553880	25479392	8925.51
		Delección	2	67850894	89801348	21950.45
		Delección	2	219671510	232059228	12387.72
		Ganancia	3	104496210	106309809	1813.60
		Delección	3	106446923	130293221	23846.30
		Ganancia	3	130338822	130488234	149.41
		Ganancia	4	62447	40429260	40366.81
		Delección	5	89966438	165700950	75734.51
		Delección	6	49256992	58722020	9465.03
		Delección	7	604093	23343833	22739.74
		Delección	7	32371755	44023960	11652.21
		Delección	7	47115381	158588112	111472.73
		Delección	12	49967	958453	908.49
		Ganancia	12	1007502	6850401	5842.90
		Delección	12	6884862	26022158	19137.30
		Ganancia	12	26040106	32710090	6669.98
		Delección	16	87305787	87337534	31.75
		Delección	17	48539	7307920	7259.38
		Ganancia	17	7328201	11407931	4079.73
		Delección	17	11565503	14052556	2487.05
		Delección	17	15487871	27634173	12146.30
		Delección	17	38398917	38591831	192.91
		Delección	17	48105944	49169352	1063.41
		Delección	17	70130816	70743420	612.60
		Delección	18	7428812	39322918	31894.11
		Ganancia	18	39397462	43537830	4140.37
		Delección	18	43629003	76083117	32454.11
Ganancia	19	32964337	33594529	630.19		
Delección	19	33682557	49263736	15581.18		
Ganancia	19	49291487	50959980	1668.49		
Delección	19	55776055	57421475	1645.42		
Ganancia	19	57493730	63784382	6290.65		
81	Complejo	Delección	3	117895555	118098190	202.64
		Ganancia	13	110165544	110171019	5.48
		Delección	14	18402516	19365110	962.59
		Delección	20	43638107	43692923	54.82
		Ganancia	21	43462715	43465598	2.88

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
82	Complejo	Delección	5	86412812	155635397	69222.59
		Ganancia	11	186966	12582924	12395.96
		Delección	11	15738399	37082864	21344.47
		Ganancia	11	68406403	72180028	3773.63
		Delección	11	87128513	94243722	7115.21
		Delección	11	95725560	99716516	3990.96
		Ganancia	11	111945282	132773688	20828.41
		Delección	11	132926078	133951370	1025.29
		Delección	12	8961920	10028772	1066.85
		Delección	12	10845519	14873614	4028.10
		Delección	12	15152654	22131190	6978.54
		Delección	12	25105770	25177569	71.80
		Delección	12	108320650	110266961	1946.31
		Delección	15	19109124	39480446	20371.32
		Delección	15	49269086	56252635	6983.55
		Delección	16	73304503	73573866	269.36
		Delección	17	7022559	8224124	1201.57
		Delección	17	24601387	24939229	337.84
		Delección	17	25384943	27238399	1853.46
Delección	17	70325731	72313306	1987.58		
83	Trisomía simple	Ganancia	13	18601703	114077122	95475.42
84	Cariotipo normal	Delección	7	149608941	149655662	46.72
85	Trisomía simple	Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
86	inv(16)	Delección	2	29193	35035707	35006.51
		Delección	2	73030906	81309181	8278.28
		Delección	2	223133867	224231762	1097.90
		Delección	5	46136065	180617107	134481.04
		Delección	6	14653555	27659801	13006.25
		Delección	7	100364702	101486400	1121.70
		Delección	7	149458682	149876588	417.91
		Delección	8	20512562	41772798	21260.24
		Ganancia	8	41854796	49125000	7270.20
		Delección	11	3159169	6498617	3339.45
		Delección	11	18241608	42182794	23941.19
		Ganancia	11	42383609	47571420	5187.81
		Delección	11	47597663	47682718	85.06
		Ganancia	11	89508376	133951370	44442.99
		Delección	16	31675728	88651780	56976.05
		Delección	17	48539	6614890	6566.35
		Delección	17	24637991	27475483	2837.49
		Delección	17	42552718	42862260	309.54
		Delección	17	70793471	71068897	275.43
Delección	17	71488671	71511380	22.71		

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
87	inv(16)	Delección	4	57355356	57521548	166.19
		Ganancia	8	181530	146250824	146069.29
		Ganancia	13	18601703	114077122	95475.42
		Ganancia	14	18402516	106329869	87927.35
		Delección	16	15705303	16130553	425.25
		Delección	16	65726391	67626883	1900.49
		Ganancia	20	18580	62363633	62345.05
		Ganancia	22	14433473	49468408	35034.94
88	Resto intermedios	Ganancia	20	18580	30386348	30367.77
		Delección	20	30448241	49053630	18605.39
		Ganancia	20	49144509	62363633	13219.12
		Ganancia	21	36330122	39809217	3479.10
		Ganancia	21	45546632	45586119	39.49
89	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
90	inv(16)	Delección	1	74867112	74942969	75.86
		Delección	2	219368746	219393019	24.27
		Ganancia	8	130792478	130857683	65.21
		Delección	10	69661546	69721821	60.28
		Ganancia	22	14433473	49468408	35034.94
91	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
92	inv(16)	-	-	-	-	-
93	Cariotipo normal	Ganancia	5	149772120	149808120	36.00
		Ganancia	16	2453792	2463512	9.72
		Delección	20	43638107	43692923	54.82
94	Cariotipo normal	Delección	1	604268	6589733	5985.47
		Delección	1	17478277	17505018	26.74
		Delección	1	24129901	31019817	6889.92
		Delección	2	29193	22962104	22932.91
		Delección	3	178523091	191610769	13087.68
		Delección	6	27215365	27326206	110.84
		Delección	7	112053257	132223736	20170.48
		Delección	10	75076818	75173955	97.14
		Delección	10	134222814	134603929	381.12
		Delección	11	67564153	67973337	409.18
		Delección	17	53711065	53747533	36.47
		Ganancia	18	14584357	58873767	44289.41
		Delección	19	18320485	18341770	21.29
		Ganancia	20	12837507	12964267	126.76
Delección	20	60247696	60317337	69.64		
Delección	22	37584794	37683671	98.88		
95	Cariotipo normal	Delección	2	102802085	103814828	1012.74
		Delección	4	105906720	106735525	828.81
		Delección	5	170752790	175243487	4490.70
96	Cariotipo normal	-	-	-	-	-
97	Cariotipo normal	Delección	6	26354830	26378998	24.17
98	Cariotipo normal	Delección	1	193354776	193659828	305.05

Caso	Citogenética	Alteración	Chr	Comienzo	Fin	Tamaño (Kb)
99	Complejo	Deleción	9	103291623	103513313	221.69
		Deleción	12	4525039	4660399	135.36
		Deleción	17	25665804	27576519	1910.72
		Deleción	18	5226858	5280807	53.95
100	Trisomía simple	Deleción	10	42955951	44669819	1713.87
		Ganancia	19	232080	63784382	63552.30

Tabla suplementaria 4. Regiones mínimas recurrentes en el estudio de array-CGH

Tipo	Chr	Inicio	Fin	Tamaño (pb)	Frec (%)	Casos
Ganancia	1	149386203	149399354	13151	2	76,80
Ganancia	1	198168603	198192467	23864	2	10,76
Ganancia	1	224312023	224909699	597676	2	47,76
Ganancia	1	245361556	245422419	60863	2	76,80
Ganancia	7	16607806	16996010	388204	2	57,73
Ganancia	8	47655222	48067921	412699	2	11,86
Ganancia	10	138206	135293404	135155198	2	31,75
Ganancia	16	1111470	1211711	100241	2	68,72
Ganancia	16	2453792	2463512	9720	2	72,93
Ganancia	18	13875256	13961521	86265	2	36,46
Ganancia	18	39397462	43537830	4140368	2	80,94
Ganancia	18	61189566	61430753	241187	2	36,62
Ganancia	19	232080	63784382	63552302	2	20,100
Ganancia	19	50541405	50587942	46537	2	68,80
Ganancia	19	53917176	53924758	7582	2	3,32
Ganancia	22	14433473	49468408	35034935	2	87,90
Delección	1	149386203	149399354	13151	2	5,6
Delección	2	73030906	81309181	8278275	2	80,86
Delección	3	110503436	110719842	216406	2	10,80
Delección	3	117895555	118098190	202635	2	80,81
Delección	3	186735226	187100440	365214	2	44,94
Delección	3	191560644	191610769	50125	2	73,94
Delección	5	170752790	175243487	4490697	2	86,95
Delección	6	14653555	18332437	3678882	2	41,86
Delección	6	27215365	27326206	110841	2	86,94
Delección	8	30557351	30721635	164284	2	59,86
Delección	8	33348916	33525017	176101	2	59,86
Delección	9	20336094	20943091	606997	2	73,79
Delección	11	18241608	37082864	18841256	2	82,86
Delección	12	4525039	4579165	54126	2	74,99
Delección	12	8961920	10028772	1066852	2	80,82
Delección	14	18402516	18765437	362921	2	63,81
Delección	15	54855502	54986764	131262	2	5,82
Delección	17	11565503	14052556	2487053	2	72,80
Delección	17	38398917	38591831	192914	2	72,80
Delección	17	42143048	42862260	719212	2	72,86
Delección	17	70325731	70743420	417689	2	80,82
Delección	17	70793471	71068897	275426	2	82,86
Delección	19	18320485	18341770	21285	2	79,94
Delección	21	34332139	36229777	1897638	2	5,70
Ganancia	9	27316598	27562178	245580	3	66,73,79
Ganancia	13	18601703	114077122	95475419	3	39,83,87
Ganancia	14	18402516	106329869	87927353	3	50,58,87
Ganancia	19	60632058	60802065	170007	3	58,69,80
Ganancia	20	12837507	12964267	126760	3	87,88,94
Ganancia	20	60418677	60478172	59495	3	53,87,88
Ganancia	21	10013263	33027142	23013879	3	23,37,70
Ganancia	21	43462715	43465598	2883	3	37,70,81
Ganancia	21	44381910	44413495	31585	3	10,37,70

Anexo I: Material Suplementario

Tipo	Chr	Inicio	Fin	Tamaño (pb)	Frec (%)	Casos
Ganancia	21	45546632	45586119	39487	3	37,70,88
Ganancia	21	45827900	46892352	1064452	3	23,37,70
Delección	2	16553880	22962104	6408224	3	80,86,94
Delección	2	23962709	25479392	1516683	3	68,80,86
Delección	2	219368746	219393019	24273	3	72,90,91
Delección	2	223133867	224231762	1097895	3	72,80,86
Delección	6	26346139	26378998	32859	3	21,86,97
Delección	9	34105673	34178026	72353	3	50,52,79
Delección	12	15665223	19538196	3872973	3	23,80,82
Delección	15	39339722	39361680	21958	3	33,44,82
Delección	16	15705303	16130553	425250	3	13,87,23
Delección	16	34059589	34242154	182565	3	23,72,86
Delección	17	48539	6614890	6566351	3	72,80,86
Delección	17	7022559	7307920	285361	3	72,80,82
Delección	17	15487871	23709984	8222113	3	23,72,80
Delección	17	29622249	29622988	739	3	23,72,79
Delección	17	71488671	71511380	22709	3	70,82,86
Delección	18	5226858	5280807	53949	3	12,23,99
Delección	18	21866420	30700104	8833684	3	23,72,80
Delección	18	38169137	39322918	1153781	3	23,72,80
Delección	18	43629003	76083117	32454114	3	23,72,80
Delección	19	8292714	8341667	48953	3	30,64,79
Delección	21	28368917	28418310	49393	3	42,77,76
Ganancia	21	36685700	39809217	3123517	4	23,37,70,88
Delección	7	32371755	44023960	11652205	4	12,37,59,80
Delección	16	73304503	73573866	269363	4	23,72,82,86
Delección	16	87305787	87337534	31747	4	23,72,80,86
Delección	18	7428812	13815806	6386994	4	12,23,72,80
Delección	20	30897918	43137505	12239587	4	7,54,70,88
Ganancia	11	117907606	132773688	14866082	5	7,50,73,82,86
Delección	7	21098797	21230591	131794	5	12,37,40,59,80
Delección	7	64090975	64714017	623042	5	37,57,59,72,80
Delección	7	100364702	101486400	1121698	5	8,37,57,80,86
Delección	7	112053257	132223736	20170479	5	8,37,57,80,94
Delección	7	143390024	144615745	1225721	5	8,37,45,57,80
Delección	7	147693185	148149728	456543	5	8,37,57,59,80
Delección	16	65726391	67107679	1381288	5	13, 23,72,86,87
Delección	5	133526865	134264343	737478	6	23,53,59,80,82,86
Delección	7	149608941	149655662	46721	6	37,57,59,80,84,86
Delección	20	43638107	43692923	54816	6	7,9,54,88,81, 93
Delección	17	25747113	27238399	1491286	7	5,23,72,80,82,86,99
Delección	7	54596358	54746162	149804	8	12,21,37,56,59,63,74,80
Ganancia	8	181530	146250824	146069294	15	3,10,14,21,29,32,43,44,5 2,66,69,70,72,85,87

ANEXO II: PUBLICACIONES

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

En este apartado se adjuntan las publicaciones cuyos resultados se han mostrado a lo largo de la presente tesis:

1. Javier Suela, Sara Álvarez, Francisco Cifuentes, Cristina Largo, Bibiana I. Ferreira, David Blesa, Maite Ardanaz, Rebeca García, Jose Antonio Marquez, Maria D. Odero, M. José Calasanz, Juan C. Cigudosa. *DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups*. *Leukemia*, 2007 Jun;21(6):1224-31.
2. Javier Suela, Cristina Largo, Bibiana Ferreira, Sara Álvarez, Mercedes Robledo, Anna González-Neira, Maria José Calasanz, Juan C Cigudosa. *NF1, and not TP53, seems to be the main target of chromosome 17 deletions in de novo acute myeloid leukemia*. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 Mar 20;25(9):1151-2.
3. Javier Suela, Sara Álvarez, Juan C. Cigudosa. *DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes*. *Cytogenetics and genome research*. 2007, 118:304-309.
4. Javier Suela, Maria José Calasanz, Sara Marsal, Antonio Juliá, Anna González-Neira, Juan Cruz Cigudosa. *Coincident neutral loss of heterozygosity and copy number aberrations contribute to define complex genomic rearrangements in AML*. *Haematologica* (en revision, 2008)



ORIGINAL ARTICLE

DNA profiling analysis of 100 consecutive *de novo* acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups

J Suela¹, S Álvarez¹, F Cifuentes², C Largo¹, BI Ferreira¹, D Blesa¹, M Ardanaz³, R García⁴, JA Marquez⁵, MD Otero^{6,7}, MJ Calasanz⁸ and JC Cigudosa¹

¹Molecular Cytogenetics Group, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain; ²Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA; ³Service of Hematology, Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain; ⁴Service of Hematology, Hospital Donostia, San Sebastián, Spain; ⁵Service of Hematology, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain; ⁶Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spain and ⁷Oncology Division, Center for Applied Medical Research (CIMA), Pamplona, Spain

We have carried out a high-resolution whole genome DNA profiling analysis on 100 bone marrow samples from a consecutive series of *de novo* acute myeloid leukemia (AML) cases. After discarding copy number changes that are known to be genetic polymorphisms, we found that genomic aberrations (GA) in the form of gains or losses of genetic material were present in 74% of the samples, with a median of 2 GA per case (range 0–35). In addition to the cytogenetically detected aberration, GA were present in cases from all cytogenetic prognostic groups: 79% in the favorable group, 60% in the intermediate group (including 59% of cases with normal karyotype) and 83% in the adverse group. Five aberrant deleted regions were recurrently associated with cases with a highly aberrant genome (e.g., a 1.5 Mb deletion at 17q11.2 and a 750 kb deletion at 5q31.1). Different degrees of genomic instability showed a statistically significant impact on survival curves, even within the normal karyotype cases. This association was independent of other clinical and genetic parameters. Our study provides, for the first time, a detailed picture of the nature and frequency of DNA copy number aberrations in *de novo* AML. *Leukemia* (2007) 21, 1224–1231. doi:10.1038/sj.leu.2404653; published online 22 March 2007

Keywords: acute myeloid leukemia; array CGH; cytogenetic prognosis; FLT3 ITD

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease that accounts for about 30% of all adult leukemias.¹ Despite improvements in clinical management, death rates are still over 60% for patients younger than 65. Benefits from current and emerging therapies will largely rely on appropriate stratification of AML patients at diagnosis. The World Health Organization (WHO) classification of AML uses patients' age, white blood cell count (WBC), morphology, immunohistochemistry, and cytogenetics, which are determinant clinical variables, to categorize the disease properly.²

Cytogenetic studies are used to stratify patients into three groups of prognosis according to overall survival (OS): favorable, intermediate and adverse.^{3,4} The favorable group is composed of AMLs associated with t(8;21), inv(16) or t(15;17). The adverse group includes complex karyotypes, t(6;9) and

del(5q), among others.⁵ The intermediate prognosis group is heterogeneous and includes cases with normal karyotype (NK) (40–50% of AML)⁶ and trisomy 8, among others.⁷ Lately, several studies have focused on the importance of searching for specific receptor tyrosine kinase mutations, such as tandem duplications in *FLT3* or mutations in *NPM1*,^{8–12} as markers of prognosis in AML.

Genomic technologies, not yet implemented in routine clinical practice, such as expression microarrays, are useful tools to identify molecular subgroups with distinct gene expression signatures.^{13,14} However, optimal RNA samples are difficult to obtain and expression signatures are not always reproducible. In fact, since it is known that AML is commonly characterized by chromosome aberrations that result in deletions or gains of large genome regions, other approaches that are DNA-based are, in principle, more suitable to study the genetic features of this disease. In this regard, although SNP microarrays have been recently used to determine regions of partial uniparental disomy that are not visible using other chromosomal aberration studies,¹⁵ array-based comparative genomic hybridization (arrayCGH) stands up as a more optimal approach to find lost and gained regions among the cancer genome.^{16–19} Recently, oligonucleotide-based arrayCGH techniques have greatly increased the number of clones represented in an array, fostering expectations of determining smaller regions of aberration in cancer.²⁰ With the intention of providing a more complete genetic and genomic characterization of this disease, we have carried out the first high-resolution (44 000 probes) arrayCGH study in a series of 100 consecutively ascertained samples of *de novo* AML.

Materials and methods

Patient selection, cytogenetics and clinical data

Bone marrow samples were selected from a series of 140 consecutive *de novo* AML patients recruited for diagnosis. Exclusion criteria were AML cases positive for PML/RARA or t(15;17), a previous history of myelodysplasia or cytotoxic drugs or radiation, low quality and/or amount of genomic DNA from the sample and/or absence of relevant clinical data. Hematological, WHO classification, conventional cytogenetics, fluorescence in situ hybridization (FISH), FLT3-ITD molecular studies, (only for NK cases²¹) and clinical follow-up were available in 100 samples. Clinical data and leukemia cell characterization are summarized in Table 1. All samples were stored after diagnosis and obtaining informed consent. All patients were uniformly treated according to the PETHEMA LAM99 protocol.²² Samples were classified into three subgroups

Correspondence: Dr JC Cigudosa, Molecular Cytogenetics Group, Human Cancer Genetics Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, Spain.

E-mail: jcigudosa@cnio.es

Received 17 November 2006; revised 8 February 2007; accepted 13 February 2007; published online 22 March 2007

Table 1 Summary of clinical data

	Median (range)	Subtype WHO	n
Age (years)	64 (20–86)	t(8,21)(q22;q22)	4
WBC (cells/10 ⁶)	15980 (1000–140 000)	inv(16)(p13q22)	10
LDH (IU/l)	780 (202–16 764)	11q23 abnormality (MLL)	1
Extramedullary infiltrate	n (%)	M0	6
Yes	8 (10)	M1	19
No	75 (90)	M2	17
Total cases*	83 (100)	M4	12
EOCG	n (%)	M5	25
0	20 (25)	M6	6
1	33 (41)	Total cases	100
2	17 (21)	Cytogenetic classification ^b	
3	8 (10)	Good	14
4	2 (3)	t(8,21)	4 (29)
Total cases*	80 (100)	inv(16)	7 (50)
FLT3 (only for NK cases)	n	inv(16)+other	3 (21)
ITD	15	Intermediate	74
None	31	NK	46 (61)
Total Cases	46	Single trisomy	16 (21)
		Double trisomy	3 (4)
		Other	9 (14)
		Adverse	12
		Complex karyotype	8 (70)
		Other	4 (30)

Abbreviations: EOCG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; NK, normal karyotype; WBC, white blood cell count.

*Total cases are limited to those with the relevant (?) clinical diagnosis.

^bCytogenetic classification based upon the CALGB study.

according to the CALGB cytogenetics cumulative incidence of relapse classification system:⁴ 14 belonged to the favorable prognosis group, 74 to the intermediate prognosis group and 12 to the adverse prognosis group.

ArrayCGH and management of genetic polymorphisms

Human Genome CGH 44k microarrays (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), versions A and B, were used. Hybridizations were performed according to the manufacturer's protocols as described previously.²⁰ DNA from 15 healthy women was extracted to create a donor DNA pool to be used as reference and to minimize the effect of individual genetic polymorphisms on the estimation of the DNA copy number changes present in the patients' samples. Microarray data were extracted and visualized using Feature Extraction Software v8.1 and CGH Analytics v3.2.2.5, (Agilent Technologies). Categorized copy number values (0, 1 or -1 indicating no change, gain or loss, respectively) were obtained using Insilico array CGH software.²³ We defined a genomic aberration (GA) as a group of at least two consecutive probes showing the same non-zero categorized copy number value. Single-probe aberrations did not score as genomic aberrations. The existence of a large number of genetic polymorphisms that originate as duplication and deletion of genomic regions of varying sizes has been previously described and annotated.²⁴ To avoid overestimation of the number of genomic aberrations, due to such polymorphisms being detected by the arrayCGH platform, we eliminated all DNA copy changes observed in our samples that showed at least 80% of their sequence overlapping with the known polymorphisms included in the latest version (20 December 2006) of the Database of Genomic Variants.²⁴

Definition and validation of smallest overlapping regions of imbalance

Aberrant regions were used to obtain the smallest overlapping regions of imbalance (SORI). Each SORI represents a recurrent

region of imbalance whose limits were defined by the minimum number of consecutive clones with identical aberrations in at least two cases.²⁵ SORI limits were determined as the clones placed at the boundaries of the gained or lost region of the case showing the smallest unbalanced region (a representative example is provided in Figure 1). Multiplex ligation-dependent probe amplification and FISH assays were performed as described previously^{26,27} to validate copy number changes obtained in the arrays (data not shown).

Bioinformatics and statistical analysis

SORIs were subjected to supervised clustering analysis using GEPAS Suite software.²³ Associations between genomic instability and other clinical parameters were assessed using Fisher's exact test for qualitative variables and the Kruskal-Wallis test for quantitative factors. Kaplan-Meier curves were drawn and the log-rank test and multivariate Cox regression applied using SPSS v13.0 (Lead Technologies, Inc., Charlotte, NC, USA) to test for differences in overall survival between groups. Factors with $P < 0.1$ in univariate analysis and well-known prognostic markers (FLT3 and WBC) were included in the multivariate regression. Nine AML cases for whom clinical evolution data were not recovered were excluded from the analysis.

Results

Frequency of genomic instability

Using oligonucleotide-based arrayCGH, we initially identified genomic imbalances in more than 90% of the cases. After the elimination of known polymorphisms,²⁴ a total of 74% of the cases remained as displaying an aberrant genome, with a median number of two altered regions per case (range 0–35). A complete description of all identified copy number variants is provided in Supplementary Tables 1 and 2. DNA aberrations

series into two major groups according to the median number of GA per case (see scheme in Supplementary Figure 1). One group was characterized by a low number of changes (0-1) and included 46 cases. The remaining cases displayed a higher number of GA with a wide range of values (2-35). In an attempt to minimize the effect of this large variability, the second group was again segregated into two subgroups according to the median number of changes:³ 30 cases with 2 or 3 GA per case, and a last group of 24 cases with four or more GA. The distribution of the cytogenetic prognosis groups across these genomic aberration groups is also shown in Table 2.

Description of smallest overlapping regions of imbalance

We identified 92 SORI that included 62 losses and 30 gains (Supplementary Table 3). The frequency of SORI ranged from 2 to 15%. Six aberrant regions were observed in more than 5% of the series: five losses of less than 2Mb involving chromosomes 5, 7, 17 and 20; and one gain that corresponded to trisomy 8 and represented the most recurrent change (1.5% of cases). The median size of the SORI was 243 kb for gains (ranging from 3 kb to 147 Mb) and 364 kb for losses (ranging from 739 bp to 32.5 Mb). We evaluated whether any SORI were associated

with the previously defined GA groups, by supervised clustering. We identified five regions of interest (s-SORI) which clearly differentiated the cases with GA ≥ 4 ($P < 0.05$) (Table 3). All the s-SORI corresponded to deletions in chromosomes 5, 16 (included two s-SORI), 17 and 18 and all were validated by FISH (Figure 1). Deletion sizes ranged from a few kb (in 16q24) to 6 Mb (in 18p11.2). In spite of the lack of recurrence for specific changes, among 24 cases with four or more GA (which also included five cases from the favorable group), nine (38%) showed deletion of at least one of these five s-SORI.

Association between genomic profiles and survival

We tested associations with OS in our series for several potentially prognostic variables and clinical parameters (Table 4). As expected, cytogenetic prognosis group and age at diagnosis were statistically and significantly associated with OS ($P < 0.05$) in the univariate analyses. The proposed genomic instability classification was also associated with survival, regardless of whether the two or three group classification was considered ($P = 0.007$ or $P = 0.002$, respectively). Cases with a more aberrant genome had a worse prognosis (Figure 2a). Additionally, we assessed the effect of deleted SORI that characterized the highly unstable group of AML (s-SORI, Table 3)

Table 2 Median number of GA per case according to cytogenetic and instability classification groups

Cytogenetic classification	n	No. of Cases with additional GA (%)	Median GA per case (range)	No. of Cases 0-1 GA (%)	No. of Cases		
					≥ 2 GA (%)	2-3	≥ 4
Favorable	14	11 (79)	2	4 (29)	10 (71)	5	5
inv(16)	10	8 (80)	3 (0-20)	3 (30)	7 (70)	2	5
t(8;21)	4	3 (75)	2 (0-3)	1 (25)	3 (75)	3	0
Intermediate	74	44 (60)	1	41 (55)	33 (45)	23	10
Normal Karyotype	46	27 (59)	1 (0-16)	32 (70)	14 (30)	11	3
Single trisomy	16	9 (56)	2 (1-5)	7 (43)	9 (57)	7	2
Double trisomy	3	3 (100)	3 (3-7)	0 (0)	3 (100)	2	1
Other	9	7 (78)	3 (0-6)	2 (22)	7 (88)	3	4
Adverse	12	10 (83)	7.5	1 (8)	11 (92)	2	9
Complex	8	7 (88)	11 (4-35)	0 (0)	8 (100)	0	8
Other	4	3 (75)	2.5 (1-10)	1 (25)	3 (75)	2	1

Abbreviation: GA, genomic aberration.

Table 3 SORI with statistically significant association with cytogenetic prognostic groups and genomic classifications

SORI ^a	Chromosome	Start	Size (kb)	Frequency	Cases	Genes
5q1.1	5	133526865	735	6% total cases 42% adverse group ^b 21% cases ≥ 4 GA ^b	23, 53, 59, 80, 82, 86	PPP2CA, UBE2B (RAD6), CDKL3 (NKIAMRE), SKP1A, FHF15, SARA2, SEC24A, CAMLG, DDX46
16q23.1	16	73304503	269	4% total cases 25% adverse group ^b 17% cases ≥ 4 GA ^b	23, 72, 80, 86	FA2H, WDR59
16q24.2	16	87305787	32	4% total cases 25% adverse group ^b 17% cases ≥ 4 GA ^b	23, 72, 82, 86	LOC348180, FAM38A
17q11.2	17	25747113	1491	7% total cases 42% adverse group ^b 30% cases ≥ 4 GA ^b	5, 23, 72, 80, 82, 86, 99	CPD, GOSR1, SUZ12P, CRLF3, CEN2A, NF1, RAB11FIP4, HCA88
18p11.2	18	7428812	6382	4% total cases 25% adverse group 17% cases ≥ 4 GA ^b	12, 23, 72, 80	PTRM, NDUFV2, TWSG1, RALBP1, PPP4R1, RAB31, VAPA, APCDD1, NAPG, GNAL, CHMP1B, IMPA2, CIDEA, AFG3L2, SPIRE1, TNFSF5IP1, PTPN2, SEH1L, C18orf1, RNMT, MCSR

Abbreviations: GA, genomic aberration; SORI, smallest overlapping regions of imbalance.

^aAll regions are losses.

^bStatistically significant association.

Table 4 Comparative 5-year overall survival (OS) by potential prognostic factor

Prognostic factor	% OS	Median	95% CI	P
Age at diagnosis				0.017
<60 years (n=34)	44.1	12.8	0–26.4	
>60 years (n=57)	22.8	6.1	3.2–9.0	
Gender				0.513
Female (n=42)	33.3	11.0	5.7–16.4	
Male (n=49)	28.6	6.1	1.1–11.0	
WBC ($\times 10^9/l$)				0.284
<30 (n=54)	33.3	11.6	5.9–17.3	
>30 (n=33)	27.3	4.6	0.1–9.1	
LDH				0.436
<380 (n=36)	36.1	12.1	4.8–19.5	
>380 (n=43)	27.9	7.4	4.7–10.1	
FLT3 (only for NK)				0.292
None (n=28)	44.4	12.8	0–26.5	
ITD (n=14)	21.4	7.1	0.9–13.4	
Cytogenetics				0.026
Favorable (n=12)	41.7	36.7	0–89.5	
Intermediate (n=68)	32.4	8.4	4.0–12.9	
Adverse (n=11)	9.1	6.8	0–13.8	
Stability (two groups)				0.007
0–1 Aberrations (n=43)	44.2	12.7	0–25.6	
≥ 2 Aberrations (n=48)	18.2	4.8	3.5–8.4	
Stability (three groups)				0.002
0–1 Aberrations (n=43)	44.2	12.7	0–25.6	
2–3 Aberrations (n=26)	23.1	7.1	0–18.1	
≥ 4 Aberrations (n=22)	13.6	4.8	1.5–8.1	
SORI				0.015
Absence (n=81)	33.3	10.4	5.7–15.1	
Presence (n=10)	10.0	2.2	1.5–2.8	

Abbreviations: LDH, lactate dehydrogenase; NK, normal karyotype; SORI, smallest overlapping regions if imbalance; WBC, white blood cell count.

and found that cases with a deletion of any s-SORI (n=10) showed statistically significant worse prognosis ($P=0.015$). Multivariate analysis demonstrated the independence of genomic instability status as a prognostic factor with respect to other clinical variables (conventional cytogenetics, WBC, age and FLT3, Supplementary Table 4), with a hazard ratio of 2.43 ($P=0.003$) for the two-group classification and 1.89 for the three-group classification ($P=0.001$). We assessed the same associations among the NK cases only (supplementary Table 5) and found that only genomic instability was a statistically significant prognostic factor ($P=0.045$) (Figure 2b).

Discussion

Conventional karyotyping has been used until now as the main tool for assigning a patient to a predictive prognosis group at diagnosis, but it has been demonstrated that karyotyping alone is insufficient to predict outcome.²⁸ Experiments using expression arrays have proved that, within the favorable prognosis group, there are statistical and biological differences in expression profiling and survival.^{29,30} Many of these differences may have originated through mutational or epigenetic alterations that

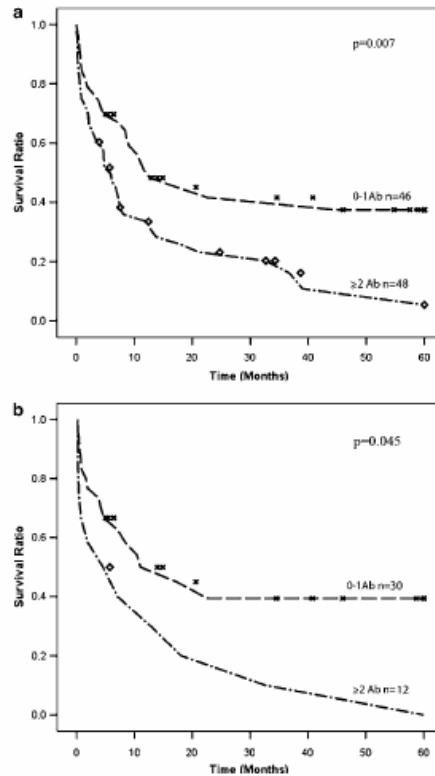


Figure 2 Five-year OS Kaplan-Meier analysis of AML according to different prognostic classifications. (a). Two-group genomic instability prognosis for all AML. (b). Two-group genomic instability prognosis for NK-AML.

contributed to the variability of the disease.^{31,32} Other molecular cytogenetic techniques have also unveiled new chromosomal rearrangements which were not visible by karyotyping.^{16–19,33,34}

We have used a genomic array with more than 40 000 probes that offers a median resolution of 75 kb and whose composition is biased towards known genes. We have analyzed 100 samples from a series of consecutively ascertained cases, an optimal experimental design that provides a comprehensive and complete picture of the genomic features of the disease. Previous studies dealing with the genomic characterization of AML have been reported, but have failed either to cover all the cytogenetic subtypes^{18,19,35} or to provide a complete high resolution description of gained and deleted regions that occurred in their series because they were based on SNP-array technology and focused exclusively on the loss of heterozygosity analysis.^{15,36}

As a consequence of our design, we have demonstrated that AML is a genomically heterogeneous disease that is characterized by a high incidence of small and non-recurrent DNA copy number aberrations. In general, cytogenetic and genomic classifications showed a high degree of correlation (Supplementary Table 6), probably due to the fact that both are based on similar causal events (genetic errors). As expected, most of the described recurrent GA were carried by cases with a complex karyotype. However, the identification of GA in a substantial proportion of cases that were classified in the favorable and intermediate cytogenetic prognostic groups is a novel finding. Additional GA were detected in 60% of cases with normal karyotype, in contrast with previous studies where this percentage was less than 20%.^{15,36} An explanation for this difference may be the higher resolution of our arrayCGH platform, as well as its greater efficacy in detecting genomic gains compared to the previous reports using SNP-based platforms. Recently, a new manuscript working with arrayCGH detected aberrations in 15% of NK-AML, showing aberrations from 0.4 to 4.1 Mb.³⁵ The conclusions of all these studies suggest that normal karyotype AML may have GA but with no consistence or recurrence in the affected regions. More surprisingly, 10 out of the 14 cases with favorable prognosis had unstable genomes. Among them, five cases had highly unstable genomes, including two cases with inv(16) that showed deletions in the 5q31.1 and 17q1.2 regions (two of the s-SORI). Although it has been demonstrated that additional cytogenetic abnormalities have no impact on the outcome of patients with favorable cytogenetics,^{4,5} our results suggest that this may not be the case when arrayCGH aberrations (otherwise unnoticed by conventional cytogenetics) are taken into account.

We have also demonstrated, with a resolution of 75 kb, that there is a low recurrence of relevant or specific GA. This is in concordance with larger studies where the low recurrence of copy number aberrations in AML has been demonstrated at the cytogenetic level.⁴ Only trisomy 8, reported as the most recurrent change in AML (frequency > 5%),^{3,33,37,38} was also observed in our series in more than 10% of cases. On the basis of the heterogeneity of genomic changes that we have observed in our series, we suggest that, rather than searching for specific or unique recurrent aberrations, AML should be studied in terms of patterns of genomic instability. Genomic instability has been proposed to be a measure of clinical outcome prediction in other cancer studies.^{39,40} Recent studies have shown that polymorphisms in some DNA repair genes may be used as markers of poor prognosis in AML,⁴¹ meaning that DNA repair genes are crucial in avoiding instability. Our genomic stability classification seemed to be efficient in segregating groups with different survival. Furthermore, this association was independent of other known clinical and genetic parameters as age, WBC or cytogenetics classification.

We considered the effect of FLT3-ITD mutational status by carrying out a separate analysis in the subset of NK cases (Supplementary Table 5). Although the detection of FLT3-ITD showed no association with OS (probably due to the sample size), NK cases with GA had a statistically significant worse prognosis (8% 5-year OS) than NK cases with less than 2 GA (46%).

The definition of minimal regions is a common part of the analysis in array-CGH studies. In the absence of available software to perform this type of analysis, SORIs were defined by compiling all GA from each case along the entire genome (as has been previously reported).²⁵ A schematic example of the 17q1.2 region is shown in Figure 1. The two identified s-SORI, 5q31.1 and 17q1.2 regions are of particular interest within the context of AML. 5q has been widely studied in myeloid

leukemias, being an important marker of karyotype complexity.^{34,42} Genes included in the deleted 5q31.1 region are *PPP2CA*, *SKP1A*, *UBE2B* and *CDKL3*. *PPP2CA*, the isoform α of the catalytic subunit of the protein phosphatase 2, has been shown to play a crucial role in DNA repair: loss of function of this phosphatase leads to inefficient DNA repair and to further hypersensitivity to DNA damage.⁴³ The minimal region at 17q1.2 (approximately 1.5 Mb) is homogeneously deleted (four cases showed deletions of less than 4 Mb including this region and only one case had a deletion above 15 Mb). It includes several genes, including neurofibromatosis-1 (*NF1*). *NF1* is a large tumor suppressor gene (over 350 kb), responsible for the autosomal-dominant disorder known as NF1 syndrome (or Von Recklinghausen's neurofibromatosis). These patients have an increased risk of various tumors, including myeloid hematological disorders.⁴⁴ Recently, it has been described that affected children with *NF1* may develop myeloid malignancies after losing their wild-type *NF1* allele due to interstitial uniparental disomy.⁴⁵ To date, mutations in *NF1* have not been identified in adult patients with any myeloid disorders⁴⁶ but, it has been recently demonstrated that hemizygotic *NF1* mice are more sensitized to carcinogenic stimuli, which result in hematological disorders independent of mutation of *Trp53*.⁴⁷ The *NF1* gene has also been shown to be downregulated by the *AML1-ETO* fusion gene, which represses *NF1* gene expression, resulting in *RAS* overexpression.⁴⁸ Recently, *NF1* cryptic deletion was described in a case of secondary AML⁴⁹ and in a study of complex karyotype AML.¹⁹ These findings show that, in concordance with our data, *NF1* may play an important role in poor prognosis leukemia. Unfortunately, detection of mutations in *NF1* or *PPP2CA* requires a large amount of fresh material (RNA or intact cells), which was not available for our samples.

In conclusion, our study provides evidence that genomic instability is a common feature in AML. This instability results in a median of 2 GA per case and it affects all cytogenetic groups with variable incidence (always more than 60%). However, recurrence of specific changes was observed only in cases with highly aberrant genomes. DNA profiling produces genomic patterns that could be used to segregate patients into groups with a potential role in predicting survival. Further studies may help to confirm our findings and should be followed by functional analyses to explain the implications of our regions of interest in leukemia.

Acknowledgements

We thank our colleagues Carmen Mateos (Hospital Virgen del Camino, Pamplona), José Rifón (Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona), María José Najera (Hospital San Millán, Logroño), Filomena Floristan (Hospital Cruces, Bilbao), Maite Zudaire (Hospital de Navarra Pamplona), Gerardo Hemida (Hospital General Yague, Burgos), Angel Pereda (Hospital Santiago, Vitoria), Gemma Azaceta (Hospital Clínico Lozano Blesa, Zaragoza) and Alfonso G. Pineda (Hospital U. Gregorio Marañón, Madrid) for providing samples and clinical information. We also thank M. José Larrazoy and Iria Gonzalez for managing DNA samples; Joaquín Dopazo (Centro Investigación Príncipe Felipe, Valencia) for bioinformatic advice; M. Carmen Martín, Carmen Carralero and Gloria Soler for their technical support; and Roger Milne (CeGen, CNIO, Madrid) for his help with the multivariate statistical analysis.

Research grants and financial support: This work was partially financed by grant PI040555 from Fondo Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo to JCC and a grant from Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer

to MDO. JS has a PhD fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia. CL has a PhD fellowship from Gobierno de Navarra. BF has a Marie Curie PhD Early Stage Research Training Fellowship.

Contributions: JS, FC, CL and BF performed the laboratory work, JS, SA, DB, and JCC analyzed the data; MA, RG, JAM, MDO and MJC contributed vital new reagents, and collected clinical data; JCC, MJC and SA designed the study; JS and JCC wrote the paper.

References

- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341: 1051-1062.
- Bacher U, Kern W, Schnitger S, Hiddemann W, Schoch C, Haferlach T. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients. *Ann Hematol* 2005; 84: 785-791.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92: 2322-2333.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100: 4325-4336.
- Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18: 115-136.
- Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 197-222.
- Wolman SR, Gundacker H, Appelbaum FR, Slovak ML. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2002; 100: 29-35.
- Kelly L. Genetics of Myeloid Leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 179-198.
- Střewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724-3726.
- Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group UIm. *Blood* 2002; 100: 4372-4380.
- Schnitger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733-3739.
- Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 2854-2861.
- Haferlach T, Kohlmann A, Schnitger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W et al. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood* 2005; 106: 1189-1198.
- Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, Caligiuri MA et al. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1124-1129.
- Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005; 65: 375-378.
- Martinez-Ramirez A, Urioste M, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Benitez J. Array comparative genomic hybridization analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes. A technical evaluation. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 144: 87-89.
- Martinez-Ramirez A, Urioste M, Melchor L, Blesa D, Valle L, de Andres SA et al. Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42: 287-298.
- Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, Staaf J, Jonsson G, Borg A et al. High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia* 2006; 20: 840-846.
- Rucker FG, Bullinger L, Schwaben C, Lipka DB, Wessendorf S, Frohling S et al. Disclosure of Candidate Genes in Acute Myeloid Leukemia With Complex Karyotypes Using Microarray-Based Molecular Characterization. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3887-3894.
- Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17765-17770.
- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-3080.
- Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ, Lopez A, Garcia-Larana J, Perez-Lopez C et al. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 2005; 90: 54-59.
- Vaquerez JM, Conde L, Yankilevich P, Cabezon A, Minguez P, Diaz-Uriarte R et al. GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2005; 33 (Web Server issue): W616-W620.
- The Database of Genomic Variants 2005. Accession Date: 20th December 2006. <http://projects.tcag.ca/variation>.
- Carrasco DR, Toton G, Huang Y, Zhang Y, Sinha R, Feng B et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 2006; 9: 313-325.
- Cigudosa JC, Otero MD, Calasanz MJ, Sole F, Salido M, Arranz E et al. De novo erythroleukemia chromosome features include multiple rearrangements, with special involvement of chromosomes 11 and 19. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 406-412.
- Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T et al. Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 265-276.
- Farag SS, Archer KJ, Mrozek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B 8461. *Blood* 2006; 108: 63-73.
- Wilson CS, Davidson GS, Martin SB, Andries E, Potter J, Harvey R et al. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood* 2006; 108: 685-696.
- Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1605-1616.
- Avivi I, Rowe JM. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2005; 12: 62-67.
- Galm O, Wilop S, Luders C, Jost E, Gehbauer G, Herman JG et al. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 2005; 84 (Suppl 13): 39-49.
- Alvarez S, Cigudosa JC. Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 2005; 23: 18-25.
- Trost D, Hildebrandt B, Beier M, Muller N, Germing U, Royer-Pokora B. Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 165: 51-63.
- Tyybakinoja A, Honen E, Piippo K, Porikka K, Knuutila S. Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 571-574.

- 36 Gorletta TA, Gasparini P, D'Elia MM, Trubia M, Pelicci PG, Di Fiore PP. Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44: 334–337.
- 37 Mitelman F JBaMFE. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. (2005). Accession Date: 2006. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- 38 Sanderson RN, Johnson PR, Moorman AV, Roman E, Willett E, Taylor PR et al. Population-based demographic study of karyotypes in 1709 patients with adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 444–450.
- 39 Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T et al. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7012–7022.
- 40 Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, Li H, Ohnen A, Seagraves R et al. Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 2006; 6: 96.
- 41 Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, Navarro A, Perea G, Esteve J et al. Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 4871–4879.
- 42 Beyer V, Castagne C, Muhlematter D, Parlier V, Gmur J, Hess U et al. Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31), -7, or chromosome 8 aneuploidy by interphase fluorescence *in situ* hybridization in 110 acute myelocytic leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152: 29–41.
- 43 Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 2005; 20: 801–809.
- 44 Reynolds RM, Browning GC, Nawroz I, Campbell IW, Von Recklinghausen's neurofibromatosis: neurofibromatosis type 1. *Lancet* 2003; 361: 1552–1554.
- 45 Stephens K, Weaver M, Leppig KA, Maruyama K, Emanuel PD, Le Beau MM et al. Interstitial uniparental isodisomy at clustered breakpoint intervals is a frequent mechanism of NF1 inactivation in myeloid malignancies. *Blood* 2006; 108: 1684–1689.
- 46 Lu D, Nounou R, Beran M, Estey E, Manshouri T, Kantarjian H et al. The prognostic significance of bone marrow levels of neurofibromatosis-1 protein and ras oncogene mutations in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2003; 97: 441–449.
- 47 Chao RC, Pyzel U, Fridlyand J, Kuo YM, Teel L, Haaga J et al. Therapy-induced malignant neoplasms in Nf1 mutant mice. *Cancer Cell* 2005; 8: 337–348.
- 48 Yang G, Khalaf W, van de Locht L, Jansen JH, Gao M, Thompson MA et al. Transcriptional repression of the Neurofibromatosis-1 tumor suppressor by the t(8;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5869–5879.
- 49 Crescenzi B, La Starza R, Romoli S, Beacci D, Matteucci C, Barba G et al. Submicroscopic deletions in 5q- associated malignancies. *Haematologica* 2004; 89: 281–285.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

Correspondence

Wendy R. Cornett, Linda M. McCall, Rebecca P. Petersen,
James E. Herndon II, and Douglas S. Tyler
Duke University Medical Center, Durham, NC

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST
The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCE

1. Cornett WR, Fraker DL, Petersen RP, et al: Prospective randomized multicenter trial of hyperbaric isolated limb perfusion with melphalan alone versus melphalan plus tumor necrosis factor: American College of Surgeons Oncology Group Trial 20020. *J Clin Oncol* 24:4196-4201, 2006

DOI: 10.1200/JCO.2006.09.9440

Neurofibromatosis 1, and Not TP53, Seems to Be the Main Target of Chromosome 17 Deletions in De Novo Acute Myeloid Leukemia

TO THE EDITOR: We read with great interest the article by Rucker et al¹ about array comparative genomic hybridization (CGH) profiling on acute myeloid leukemia (AML) complex karyotype patients, which included therapy-related, post-myelodysplastic syndrome, and de novo AML samples. Among the pattern of most frequent aberrations, they found that a discrete loss at 17p13, which contains the TP53 gene, is one of the most recurrent deletions in these patients (55% of recurrence). They also described another deleted region in chromosome 17 (6.4 Mb) that is located around the centromeric area (17p11 to 17q11) and contains the neurofibromatosis 1 (NF1) gene. They found this second deletion in 18 samples. Interestingly, in 17 of these 18 patients, this deletion was concomitant with the loss of the TP53 region. Only in one patient the deletion encompassed NF1 without involving TP53.

Among a series of 120 de novo AML, on which we have conducted DNA profiling analysis using a high density oligonucleotide-based array CGH (more than 44,000 probes) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA),² we detected seven patients of AML that showed DNA copy number aberrations involving chromosome 17 (Table 1). Aberrations in chromosome 17 were cryptic deletions affecting the regions 17p13.1 (including TP53 gene) or 17q11.2 (including NF1 gene). We observed that all our seven samples displayed losses involving NF1, but in contrast with the data reported by Rucker et al,¹ only two of them showed concomitant loss of TP53 (both patients also displayed complex karyotype). We validated the array

data with fluorescence in situ hybridization (FISH) assays. The TP53 FISH probe was commercial (LSI p53, Vysis, Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL) and the NF1 FISH probe was prepared from BAC clone RP11-518B17 (CHORI Collection, Oakland, CA). In all samples, FISH data confirmed array CGH copy number values.

Two more approaches were used to better characterize the genomic and genetic features of the rearranged chromosome 17. The presence of loss of heterozygosity (LOH) was studied with the Illumina Infinium 300K SNP platform (Illumina Inc, San Diego, CA).³ This genomic platform, in addition to detect LOH in a chromosome region that is deleted due to an actual genetic loss, allows the detection of uniparental isodisomy (UPI) LOH regions without actual loss of genetic material. In AML, UPI LOH has been shown to be associated with mutations in relevant oncogenes (ie, CEBPA) located within the affected region.⁴ Only patient 2 showed LOH affecting the TP53 genomic region. Finally, TP53 mutation analysis was performed by complete sequencing of exons 4 to 9 in all patients (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer [Applied Biosystems, Foster City, CA]). Patients 3 and 4 harbored mutations in exons 8 and 9, respectively. Patient 3 had lost the wild-type allele of TP53 and patient 4 was heterozygous for the mutation.

In conclusion, we confirmed the existence of recurrent cryptic deletions in the area of 17q11.2, targeting the gene NF1, as suggested previously by Rucker et al.¹ By using a high density array CGH, the minimum deleted region in 17q11 was reduced down to approximately 1.5 Mb. Although previous reports described that deletions of 17q11.2 were tightly associated with deletions in 17p13.1, including the TP53 gene, we report here that less than 50% of our de novo AML samples with deletions in 17q11.2 showed either deletion or UPI LOH among the TP53 locus (none of the noncomplex patients and three of the five complex karyotype patients). Only one patient with

Table 1. TP53 and NF1 Status in Patients With Chromosome 17 Abnormalities

Patient	Karyotype	TP53				NF1		
		Array CGH	FISH	UPI	Mutation	Array CGH	FISH	UPI
1	inv(16)	2n	2n	—	—	1n	1n	NA
2	Complex	2n	2n	+	—	1n	1n	NA
3	Complex	1n	1n	NA	R280G	1n	1n	NA
4	Complex	3n	3n	—	1246gdelc	1n	1n	NA
5	inv(16)	2n	2n	—	—	1n	1n	NA
6	Complex	2n	2n	—	—	1n	1n	NA
7	Complex	1n	1n	NA	—	1n	1n	NA

Abbreviations: NF1, neurofibromatosis 1; CGH, comparative genomic hybridization; FISH, fluorescence in situ hybridization; UPI, uniparental isodisomy; R, arginine; G, glycine; g, guanine; c, cytosine; NA, not assessed due to the deleted status.

Correspondence

deletion or UPiD in *TP53* showed mutations in the gene, suggesting that *TP53* may not be the principal target in de novo AML, although its role has been demonstrated to be more relevant in secondary AML.^{5,6} Therefore, we think our genetic data support the proposed role of *NFI* as the main target in rearrangements of chromosome 17 in de novo AML, based on previous reports, which set *NFI* as a leukemogenic agent when mutated or haploinsufficient.^{7,8}

Javier Suela, Cristina Largo, Bibiana Ferreira,
and Sara Álvarez

Molecular Cytogenetics Group, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas,
Madrid, Spain

Mercedes Robledo

Endothelial Cancer Group, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas,
Madrid, Spain

Anna González-Neira

Centro Nacional de Genotipado, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas,
Madrid, Spain

María José Calasanz

Department of Genetics, University of Navarra, Navarra, Spain

Juan C. Cigudosa

Molecular Cytogenetics Group, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas,
Madrid, Spain

ACKNOWLEDGEMENT

Financial support from Grants No. PI 040555 and G03/136 from the Ministerio de Sanidad y Consumo to JCC. We thank Fatima Mercedillo and Emilio A. González for their technical assistance.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Rüdiger FG, Bullinger L, Schwabian C, et al: Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol* 24:3857-3864, 2006
2. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, et al: Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17765-17770, 2004
3. Pfeiffer DA, Lu JM, Staemers FJ, et al: High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 16:1136-1146, 2006
4. Raghaven M, Ullington DM, Stoukakis S, et al: Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65:375-378, 2005
5. Christensen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J: Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 19:1405-1413, 2001
6. Herzog G, Lu-Hessalmann J, Zimmermann Y, et al: Microsatellite instability and p53 mutations are characteristic of subgroups of acute myeloid leukemia but independent events. *Hematologica* 90:693-696, 2005
7. Stephens K, Weaver M, Leppig KA, et al: Interstitial uniparental isodisomy at clustered breakpoint intervals is a frequent mechanism of *NFI* inactivation in myeloid malignancies. *Blood* 108:1684-1689, 2006
8. Birnbaum RA, O'Meara A, Wandek Z, et al: *NFI* and *GMCSF* interact in myeloid leukemogenesis. *Mol Cell* 5:189-195, 2000

DOI: 10.1200/JCO.2006.09.3013

IN REPLY: Suela et al profiled a series of 120 unselected de novo acute myeloid leukemia (AML) patients including all cytogenetic subgroups for genomic imbalances using a high density oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization platform. Using this approach, they identified seven patients, two patients with inversion 16 (*inv*(16)) and five patients with complex karyotypes, that showed cryptic genomic deletions in chromosomal band 17q11.2 encompassing neurofibromatosis 1 (*NFI*). Of these patients only two exhibited concomitant deletions affecting *TP53*. In addition, the authors performed loss of heterozygosity analyses revealing one patient with loss of heterozygosity affecting the genomic region of *TP53*. Furthermore, sequence analyses of *TP53* (exons 4 through 9) disclosed two patients with additional *TP53* alterations (one patient was heterozygous for the mutation, the other one had lost the wild type allele of *TP53*). Thus, in four of seven 17q11.2 deleted patients *TP53* aberrations were present, and interestingly all of these were AML patients with complex karyotypes.

We greatly appreciate the comments by Suela and colleagues confirming our findings that *NFI* may be a target of chromosome 17 rearrangements. In our recent study comprising 60 AML patients with complex karyotypes, genomic deletions of 17p13 encompassing *TP53* were more common than deletions harboring *NFI* (55% v 30%).² Suela and colleagues analyzed 120 unselected patients of de novo AML; with a general incidence of 15%, the series probably included about 15 patients

with complex karyotypes (the number was not provided). We believe that such low numbers do not allow a reliable determination of the incidence of genetic lesions. Subgroup-specific analyses in our series of 60 complex karyotypes AML patients (younger [age < 60 years] de novo AML [n = 7], younger secondary [post-myelodysplastic syndrome and therapy-related] AML [n = 6], elderly [age ≥ 60 years] de novo AML [n = 13], and elderly secondary AML patients [n = 5]) disclosed deletions of 17p13 encompassing *TP53* in all subsets as the main chromosome 17 aberration. Our data support the finding that *NFI* deletion may occur without *TP53* alteration. We recently identified two additional patients with isolated 17q11.2 loss without concomitant 17p13 deletion. We were able to further narrow down the minimally deleted fragment to approximately 800 kb in size harboring *NFI*. Sequence analysis of *TP53* (exons 4 through 9) showed that in one of these patients no *TP53* mutation was present.

An intriguing finding of the study by Suela et al is that 17q11.2 deletions may also occur in other cytogenetic subgroups as shown by isolated 17q11.2 deletion as secondary change in two patients with *inv*(16).

In summary, our data and that by Suela et al are in agreement in showing that *NFI* may be a target of chromosome 17 rearrangements with or without *TP53* alteration. *NFI* deletions seem to be most prevalent in AML with complex karyotypes. Future analyses including the investigation of uniparental

DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes

J. Suela S. Alvarez J.C. Cigudosa

Molecular Cytogenetics Group, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid (Spain)

Manuscript received 7 September 2006; accepted in revised form for publication by L. Cannizzaro, 9 November 2006.

Abstract. Acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) represent two distinct but related myeloid haematological neoplasms. At diagnosis, a substantial proportion of cases show cytogenetic and molecular genetic markers whose range of specificity is highly variable. Most specific reciprocal translocations, as t(8;21)(q21;q21) or t(15;17)(q22;q21), have been extensively studied and are currently introduced in clinical diagnosis. Two other major groups remain to be better characterized at the genetic and genomic level: cases with normal karyotype and cases with complex aberrations. Comparative genomic hybridization (CGH) performed on chromosomes was the first approach taken and nearly 300 cases studied by this technique have

already been reported. Array based CGH has also been applied to a smaller number of cases. Both types of genomic studies have confirmed that recurrent genomic losses and gains can almost exclusively be found in cases with complex karyotype. In most cases with normal karyotype (as well as in others with single chromosome aberrations as trisomy 8), arrayCGH has been able to unveil small DNA copy number changes whose recurrence is very low. Recently, single-nucleotide-polymorphism based arrays have been used in AML showing that loss of heterozygosity (LOH) is a common feature in normal karyotype leukemia.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Genetic aberrations in the form of losses of genetic material (deletions) or localized gains (duplications to amplifications), that affect certain regions of the genome have been shown to be the basis of many diseases or human pathologies, cancer being one of the most frequently characterized by the occurrence of one or more of such genetic alterations. Traditionally, the identification and further characterization of these genomic copy number changes was achieved

by using Comparative Genomic Hybridization (CGH), a molecular cytogenetic technique that allows the analysis of DNA gains and losses in the entire genome in a single hybridization experiment. Initially, CGH experiments were performed on normal human metaphase chromosomes (Kallioniemi et al., 1992, 1994) but currently, an increased number of CGH assays are being performed on arrayed DNA elements (arrayCGH). This swift evolution from chromosomes to DNA clones allows a much better characterization (in terms of size and limits) of DNA copy number alterations (CNA) that take place during oncogenesis and progression.

Acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) constitute two related but, at the same time, different entities among myeloid neoplasms. While not all cases of MDS terminate in AML, those syndromes are considered preleukemic diseases, reflecting that both disorders may be the result of a similar genetic damage (Harris et al., 2000). Three major cytogenetic subgroups can be distinguished among myeloid disorders: (1) cases with a

Work funded by Grant J040555 from Fondo Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo to J.C.C.J.S. has a Ph.D. fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia.

Request reprints from Juan C. Cigudosa
Molecular Cytogenetics Group
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)
C/Melchor Fernández Almagro, 3, E-28029, Madrid (Spain)
telephone: +34 91 224 6900; fax: +34 91 228 6923
e-mail: jcigudosa@cnio.es

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
1424-3981/07/1184-0304\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/cgr

primary balanced chromosome aberration (approximately 20% of all AML cases, and some therapy-related MDS), (2) cases with normal karyotypes and (3) cases with unbalanced karyotype abnormalities, which are characterized by gains and/or losses of usually large regions of the genome and no known primary balanced abnormality (35–40% of AML, 50% of the *novus* MDS, and more than 80% of the therapy related MDS/AML) (Grimwade et al., 2001, 2004; Schoch et al., 2005). Focusing in these last two groups of patients (normal and unbalanced karyotypes), this review will show a brief summary of what is known about conventional CGH in myeloid disorders and will try to present the current state of the arrayCGH advances in this type of leukemia.

Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia under the light of chromosome based CGH (CGH)

In addition to providing insights into the molecular pathophysiology of myeloid disorders, cytogenetic analysis has been the main provider of the prognostic information that influences therapy and outcome of AML and MDS (Alvarez et al., 2001). Still, individuals displaying a normal karyotype in chromosome-banding analysis represent 40–45% of MDS and AML patients, precluding any advance that may derive from classical cytogenetics in terms of molecular mechanisms and/or prognosis. Lately, several molecular defects, such as length mutations of the *FLT3* gene (Bullinger and Valk, 2005) and *NPM* genes (Dohner et al., 2005; Falini et al., 2005), have been described in AML with normal karyotypes. On the other hand, myeloid disorders with unbalanced karyotype abnormalities constitute a subtype that has been classified mostly based on its cytogenetic/molecular genetic profile, although these patients may truly represent a distinct biological entity (Schoch et al., 2005). The characterization and the understanding of specific roles of these rearrangements have dramatically improved through the application of a spectrum of cytogenetic and molecular diagnostic techniques. These techniques include multicolor karyotyping, conventional comparative genomic hybridization (CGH), loss of heterozygosity analysis, CGH arrays, and expression arrays.

Taking into account only published series that included more than ten patients studied with cCGH, nearly 120 MDS and 260 cases of AML have been reported (Bentz et al., 1995; El-Rifai et al., 1997; Huhta et al., 1999; Wilkens et al., 1999; Castuma et al., 2000; Heller et al., 2000; Kim et al., 2001; Lindvall et al., 2001; Dalley et al., 2002; Casas et al., 2004; Babicz et al., 2005; Karst et al., 2005; Martinez-Ramirez et al., 2005). Compared with data obtained with classic cytogenetic methods, cCGH analysis yielded a higher number of well defined structural changes. This increased rate of chromosome aberrations was nurtured by the fact that CGH is a DNA based technique so those cases where cell culture was unsuccessful (no metaphase chromosomes could be analyzed) were however suitable for the comparative hybrid-

ization analysis. On the other hand, another well known source of discrepancy comes from the analysis of different clonal cell populations that may be present in the tumor samples. This fact remains as a problem for CGH, while classic cytogenetics has the advantage of allowing the detection and characterization of such clonal populations.

cCGH studies of MDS with unbalanced karyotype, previously detected by conventional cytogenetics, established that genomic losses are the most prevalent findings, involving 5q in around 75% of cases, 7q in 30%, and 20q in 24%. Most common gains involved total or partial chromosome 8 (about 40%), 11q (35%) and 4q (27%) (Wilkens et al., 1999; Castuma et al., 2000; Martinez-Ramirez et al., 2005). Amplifications were also detected and confirmed in one third of the patients involving *MLL* and *RUNX1*, among others (Martinez-Ramirez et al., 2005).

AML has been more extensively studied (Gebhart, 2005). With nearly 300 cases, including individual reports, the main conclusions confirmed that genomic losses affected 5q and 7q (with high frequency), followed by 1p, 3p2, 12p, 13q, and 17p. Frequent gains involved chromosomes 6, 8q and 21q (with high frequency), followed by 3q26→q27 and 22q. Amplifications were not common but were demonstrated for well known genes as *MYC* and *MLL* (Kim et al., 2001; Casas et al., 2004), as well as for some other rare locations on 13q without a clear candidate gene (Heller et al., 2000).

ArrayCGH approach: development and platforms

The sensitivity of CGH technique is dependent on several factors. The main intrinsic factors are the degree of condensation of the chromosomes and power of resolution of the microscope hardware and software. Extrinsically, the sensitivity is also limited by the size of the chromosomal aberration (if it is large enough to be visualized under the microscope) as well as by the minimal portion of a cell population carrying a specific change that needs to be present in the test sample to be detected. Adding up all these limitations, it is widely accepted that copy number changes (deletions, gains or amplifications) that affect genomic regions smaller than 3–5 Mb of size whose presence in a cell population is under 30% are not readable or efficiently detected by chromosome based CGH (Gebhart et al., 2000; Gebhart, 2005).

The change from chromosome to genome based approaches has had an immediate effect also in chromosome CGH. Metaphase spreads are being replaced as target for hybridization by microarrays. Therefore, one of the limitations mentioned above, the power of resolution of the chromosomal CGH, has been easily overcome by substituting chromosomes with small fragments of DNA arrayed onto a solid support e.g. large insert clones (BAC/PAC clones), cDNA clones, or oligonucleotides (Solinas-Toldo et al., 1997; Pinkel et al., 1998; Pollack et al., 1999; Lucito et al., 2000; Mei et al., 2000). Resolution is now limited by the type, through the genome of the clones

Página siguiente

that are included in the array. Typically, most studies utilize microarrays comprising large insert clones (100 kb) spaced at approximately one clone per Mb (Fiegler et al., 2003), but higher resolution arrays comprising overlapping clone sets from specific regions are being employed. There are published experiments with array platforms that include from a few hundred clones to over 30,000 clones covering the complete human genome (Ishkanian et al., 2004). The panel of platforms can be initially divided into three groups regarding the type and size of clones arrayed: large BAC/PAC clones of a mean size of 150 kb, cDNA clones with sizes of around hundreds of bp, and oligonucleotides with sizes around 40 to 70 bp. Each type of platform has its own advantages and limitations. In recent years we have observed in the literature and in scientific forums a competition among users and providers of different platforms in order to demonstrate which one was the most powerful or efficient, or both, to detect DNA gains and losses.

BAC based arrays are the most commonly used because of their robustness and good signal in hybridization experiments. Because of this good hybridization yield, they are especially useful in the detection of genomic losses (deletions). This type of platform has been used in six reported works dealing with myeloid disorders (Martinez-Ramirez et al., 2003, 2005; Tchinda et al., 2004; Paulsson et al., 2006; Rucker et al., 2006a, b). cDNA arrays to be used as CGH arrays is another option. In this type of platform the clones are expressed sequences that are been obtained from a previously defined library.

cDNA clones have been extensively used for expression profiles and they are not a first choice for studying copy number changes because of their poor hybridization efficiency. They are mostly indicated for in certain experiments such as localization of genes that are simultaneously overexpressed and amplified. However, the cDNA approach is clearly not recommended if the aim is the detection of low copy number changes (simple gains or deletions) because the available bioinformatics (that includes the running average of multiple clones, typically five to ten, along the genome) often fails to provide reproducible data (Alvarez and Cigudosa, 2005).

Finally, oligonucleotide based CGH arrays are the most recent approach. It implies the use of short sequences of newly synthesized fragments of DNA (oligonucleotides) of 40 or 60 base pair length (40-mer or 60-mer oligos) as targets for hybridization on the slides. This type of array, characterized by the high density of clones that may be easily arrayed (it is rather normal that they contain 40,000 clones), have been used in six reports dealing with myeloid disorders (Fitzgibbon et al., 2005; Gorletta et al., 2005; Raghavan et al., 2005; Tyybakinoja et al., 2006, 2007; Suela et al., 2007).

Myeloid leukemias and arrayCGH

It is reasonable to expect that genomics may give different approaches to unveil leukemogenesis, aggressiveness and other clinical factors in AML and MDS. In fact, some

genomic approaches have been already taken to explain leukemia, mostly in the form of expression arrays (see Bullinger and Valk, 2005; Valk et al., 2005; Mano, 2006 for recent reviews). However, it is somehow striking that, while a large number of arrayCGH studies have been reported in solid tumors (mostly breast), prenatal disorders or other diseases, there are few articles yet published about copy number aberrations on myeloid disorders using this approach. Only ten works have been published so far in which arrayCGH has been applied to AML or MDS samples. We initiated the research in this field first confirming the suitability of the arrayCGH for studying copy number aberrations in MDS (Martinez-Ramirez et al., 2003).

Some published reports have chosen the arrayCGH approach in a small number of cases in order to provide a refined characterization of specific chromosome aberrations previously detected using other methods. Tchinda et al. (2004) reported two cases of de novo AML with translocations involving the breakpoint 6p22 first detected at relapse. By using arrayCGH they found that translocations were truly unbalanced showing gains and losses at the breakpoints. Tyybakinoja et al. (2006) reported another two cases of AML characterized by the presence of amplicons in the 11q23→q25 cytobands. They described the limits and physical genomic structure of the amplicon, concluding that, unexpectedly, *MLL* was not affected by this genetic event. They proposed a common region of amplification which included 14 known genes.

As mentioned, an important advantage of the high resolution of arrayCGH is the possibility to detect DNA copy number changes that may be simply invisible to conventional karyotyping. Along this line, an interesting study was recently published to disclose such hidden aberrations in ten cases of AML/MDS where trisomy 8 was the only detected chromosome abnormality (Paulsson et al., 2006). By using a tiling Path BAC array that includes 32,000 human clones they showed that new undetected CNA could be observed in all analyzed cases. However, due to the design of the platform, that includes in its coverage polymorphic non-coding genomic regions, it was indicated that most of these aberrations could represent genetic polymorphisms. After removing these predicted or known polymorphisms, they observed that four out of ten cases showed new CNA, therefore suggesting that trisomy 8 alone may not be the unique genetic event that is needed for the onset of this kind of myeloid leukemia.

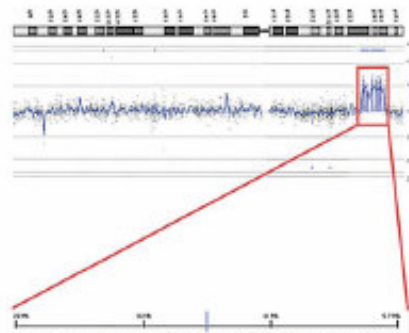
Regarding unbalanced and complex karyotypes in myeloid disorders, two more articles, using a combination of 1 Mb BAC arrayCGH and expression profiling on a panel of 17 cell lines (Rucker et al., 2006b) and a large series of patients (Rucker et al., 2006a), have been published. The series of primary samples included 60 cases with newly diagnosed complex karyotype leukemias (de novo AML, post MDS and therapy related leukemias). Both the recurrence and the nature of genomic changes were precisely delineated in this work. Genomic losses were more frequent than gains. While the recurrences of 5q and 7q deletions were 77% and 45%, similar to that observed with conventional CGH in a similar

group of patients (Martinez-Ramirez et al., 2005), the incidence of losses at 17p (55%), and those at 18q, 16q, and 17q (35% each) were higher than previous reports. Additionally, a large set of smaller recurrent aberrations, including other losses and gains of 11q and 8q, were observed. Of interest they described the presence of 41 high level DNA amplifications with a noticeable recurrence of those located at 11q23.3→q24 (seven cases), 21q22 (six cases), 11q23.3 (five cases). These findings have been useful to point to potential candidate genes in several regions. Although global expression profiling was performed in the same set of samples, no significant gene expression signatures correlated with major arrayCGH aberrations as losses of 5q, 17p, and 7q, or gains of 11q and 8q.

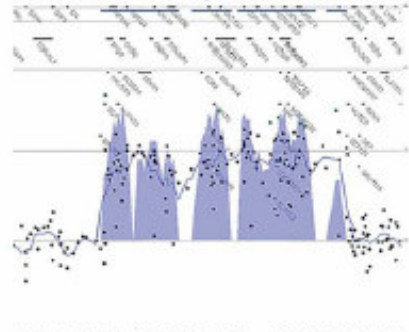
With all collected evidence of DNA copy number changes and expression studies, it is becoming accepted that myeloid leukemias with complex karyotypes constitute a distinct genetic and probably biological entity (Alvarez and Cigudosa, 2005; Schoch et al., 2005). However, the extent and nature of CNA in myeloid leukemia samples with normal karyotype at diagnosis still remain to be clarified. Conventional CGH has not been successful in finding recurrent aberrations in this type of sample (Dalley et al., 2002; Casas et al., 2004), and we will probably see in the near future the results of currently ongoing research dealing with this issue. Our group and others are actively working on this matter (Suela et al., 2007; Tybakinoja et al., 2007). CNA are frequent in AML but our findings show that, except for those seen in complex karyotypes, recurrent aberrations are not a common feature (some aberrations as seen by arrayCGH that were detected in NK cases are represented in Table 1 and Fig. 1).

**Myeloid leukemias and new genomics strategies:
array-SNP**

Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) can be also arrayed and used for studying simultaneously variations in the DNA copy number content and the presence of genomic regions with loss of heterozygosity (LOH). Although the



Deletion at 6p24



Deletion at 2q13

Fig. 1. ArrayCGH representative ideograms of deletions in a case of AML with normal karyotype. Human Genome CGH 44k microarrays (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA), versions A and B, were used. Hybridizations were done as previously described according to the manufacturer's protocols. Graphics are modified output from CGH-Analytics v3.2.1 (also from Agilent Technologies Inc.). Moving average (0.5 Mb) log₂ ratio values along the chromosome are represented by a blue line. Balanced ratio (no copy number changes) falls around the 0x vertical lines. Displacement of this blue line to the left or right represents genomic losses or gains, respectively. Aberrations that were statistically significant are represented as blue dots on the left (deletion) or right (gain) of the moving average. Features of the regions are highlighted and zoomed in to a gene view on the right of the chromosome view. Gene view displays oligo probes as dots. The color of each dot represents losses (green), normal (black) or gains (red). Large (6p24, size 10 Mb) and small deletions (2q13, size 115 kb) are represented.

Table 1. Detection of new copy number aberrations in normal karyotype cases of AML using arrayCGH platform

Case	Karyotype	Array-OGH
1	46,XX	46,XX,del(2)(q13),del(6)(p24)
2	46,XX	46,XX,del(X)(p32.21)
3	46,XX	46,XX,del(2)(q23.3)
4	46,XX	46,XX,del(1)(p36),del(2)(p24),del(3)(q27q28),del(7)(q31),+18q21
5	46,XY	46,XY,del(2)(q12),del(4)(q24),del(5)(q35)

use of array-SNP for detecting CNA may be redundant with other platforms, their ability to detect LOH regions without net changes in DNA content (diploid LOH) represents a substantial change in genomic research.

Diploid LOH is thought to arise in somatic cells through the genetic process known as uniparental disomy (UPD), and it was found in nearly 20% of AML cases with normal karyotype studied by a 10K array-SNP platform (Raghavan et al., 2005). Mutation analysis of several genes included in specific diploid LOH regions observed by this group demonstrated that those regions may include the presence of homozygous mutations in cancer related genes, like *CEBPA*, *FLT3* or *RUNX1* (Fitzgibbon et al., 2005). Additionally, a LOH study of a panel of 30 myeloid leukemias with normal karyotype confirmed these previous results (Gorletta et al., 2005). They proposed the existence of two types of LOH: terminal, involving large genomic regions (30–90 Mb), produced by a UPD phenomenon and interstitial, affecting smaller regions (2–8 Mb) usually caused by a microdeletion event (resulting in loss of one DNA copy or haploid LOH). They also found that 10% of the normal karyotype cases showed interstitial microdeletions, similar to our results (Table 1) obtained with the arrayCGH platform.

Conclusion

In conclusion, arrayCGH, confirming previous data based on chromosome based CGH, provides useful information regarding the nature of genomic aberrations that take place in cases with complex karyotypes. The high resolution and the use of several platforms on complex karyotype cases have produced an enormous amount of data with interesting candidate genes whose involvement has to be explored. These genetic aberrations are probably related to late stages of myeloid disease, transformation of MDS to AML, or exposure to environmental- or therapy-related clastogenic agents. However, the role of CNA in myeloid leukemias with normal karyotypes or single numerical changes remains unclear, mostly due to the lack of recurrence of the so far observed aberrations. Obviously more genomic data have to be collected in as many patients as possible. It is of major interest to direct the genomic research of AML and MDS towards other emerging approaches. The role and extent of UPD, the large-scale detection of mutations on key proliferation-related genes, and the epigenetics profiling of this disease are the next unavoidable steps which need to be taken.

References

- Alvarez S, Cigudosa JC: Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: A light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 23:18–25 (2005).
- Alvarez S, MacGrogan D, Calasanz MJ, Nimer SD, Jhanwar SC: Frequent gain of chromosome 19 in megakaryoblastic leukemias detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 32:285–293 (2001).
- Babicz M, Kowalczyk J, Winnicka D, Gawerczyk A, Lejman M, et al: The effectiveness of high-resolution-comparative genomic hybridization in detecting the most common chromosomal abnormalities in pediatric myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 158:49–54 (2005).
- Bentz M, Dohner H, Huck K, Schutz B, Ganser A, et al: Comparative genomic hybridization in the investigation of myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 12:193–200 (1995).
- Bullinger L, Valk PJ: Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 23:e206–e205 (2005).
- Casas S, Avenin A, Fuentes F, Vallespi T, Granada I, et al: Genetic diagnosis by comparative genomic hybridization in adult de novo acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 153:16–25 (2004).
- Castlana MV, Rao PH, Acevedo SH, Larruga JB: Comparative genomic hybridization study of de novo myeloid neoplasia. *Acta Haematol* 104: 25–30 (2000).
- Dalley CD, Neat MJ, Foot NJ, Burridge M, Byrne L, et al: Comparative genomic hybridization and multiplex-fluorescence in situ hybridization: An appraisal in elderly patients with acute myelogenous leukemia. *Hematol J* 3:290–298 (2002).
- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, et al: Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood* 106:3740–3746 (2005).
- El-Rifai W, Honen E, Larramendy M, Ruutu T, Knustila S: Chromosomal breakpoints and changes in DNA copy number in refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia* 11:958–963 (1997).
- Filini E, Mecucci C, Tacci E, Alcalay M, Rosati R, et al: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352:254–266 (2005).
- Flagler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, et al: DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36:361–374 (2003).
- Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, Smith ML, Debernard S, et al: Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65:9152–9154 (2005).
- Gebhart E: Genomic imbalances in human leukemia and lymphoma detected by comparative genomic hybridization (review). *Int J Oncol* 27: 593–606 (2005).
- Gebhart E, Verdorfer I, Saul W, Trautmann U, Brecevic I: Delineating the use of comparative genomic hybridization in human myeloid neoplastic disorders. *Int J Oncol* 16:1099–1105 (2000).

- Corletta TA, Gasparini P, D'Elia MM, Trubia M, Pellicci PG, Di Fiore PP: Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 44:334-337 (2005).
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, et al: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): Analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98:1312-1320 (2001).
- Grimwade D, Moorman A, Hills R, Wheatley K, Walker H, et al: Impact of karyotype on treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 83 Suppl 1:545-48 (2004).
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Handrin G, Muller-Hermelink HK, et al: The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the clinical advisory committee meeting, Arlington House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol* 13:193-207 (2000).
- Heller A, Chudoba I, Bleck C, Senger G, Clausen U, Llehr T: Microdissection based comparative genomic hybridization analysis (micro-CGH) of secondary acute myelogenous leukemias. *Int J Oncol* 16:461-468 (2000).
- Huhta T, Votawanta K, Helenen K, Kanerva I, Larramendy ML, et al: Comparative genomic hybridization and conventional cytogenetic analysis in childhood acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 35:311-315 (1999).
- Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeuw RI, Chi B, et al: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 36:299-303 (2004).
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, et al: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821 (1992).
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, et al: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10:231-243 (1994).
- Karstl C, Heller A, Clausen U, Gebhart E, Llehr T: Detection of cryptic chromosomal aberrations in the in vitro non-proliferating cells of acute myeloid leukemia. *Int J Oncol* 27:355-359 (2005).
- Kim MH, Stewart J, Devlin C, Kim YI, Boyd E, Connor M: The application of comparative genomic hybridization as an additional tool in the chromosome analysis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 125:26-33 (2001).
- Lindvall C, Nordenskjöld M, Perwit A, Björkholm M, Blomqvist E: Molecular cytogenetic characterization of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple chromosome rearrangements. *Haematologica* 86:1158-1164 (2001).
- Lucito R, West J, Felner A, Alexander J, Esposito D, et al: Detecting gene copy number fluctuations in tumor cells by microarray analysis of genomic representations. *Genome Res* 10:1726-1736 (2000).
- Mano H: DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 47:9-14 (2006).
- Martinez-Ramirez A, Urioste M, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Benitez J: Array comparative genomic hybridization analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes. A technical evaluation. *Cancer Genet Cytogenet* 144:87-89 (2003).
- Martinez-Ramirez A, Urioste M, Melchor L, Blesa D, Valle L, et al: Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer* 42:287-298 (2005).
- Mel R, Gailpeau PC, Prass C, Berne A, Chandour G, et al: Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res* 10:1126-1137 (2000).
- Pauisson K, Heidenblad M, Strombeck B, Staaf J, Jonsson G, et al: High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 9 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia* 20:840-846 (2006).
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, et al: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211 (1998).
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, et al: Genome-wide analysis of DNA copy number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23:41-46 (1999).
- Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, et al: Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65:375-378 (2005).
- Rucker FG, Bullinger L, Schwansen C, Lipka DB, Weissendorf S, et al: Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol* 24:3887-3894 (2006a).
- Rucker FG, Sander S, Dohner K, Dohner H, Pollack JR, Bullinger L: Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations. *Leukemia* 20:994-1001 (2006b).
- Schoch C, Kern W, Kohmann A, Hildebrand W, Schnittger S, Haferlach T: Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer* 43:227-238 (2005).
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stiglbauer S, Nickolenko J, Benner A, et al: Matrix-based comparative genomic hybridization: Bioclips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407 (1997).
- Sueta J, Alvarez S, Cifuentes F, Largo C, Ferrera BI, et al: DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. *Leukemia* 21:1224-1231 (2007).
- Tchinda J, Dijkhuizen T, Viles P, Kok K, Horst J: Translocations involving 6p22 in acute myeloid leukemia at relapse: Breakpoint characterization using microarray-based comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 126:495-500 (2004).
- Tyybatinoja A, Saarinen-Pihkala U, Elenon E, Knuutila S: Amplified, lost, and fused genes in 11q23-q25 amplicon in acute myeloid leukemia, an array-CGH study. *Genes Chromosomes Cancer* 45:257-264 (2006).
- Tyybatinoja A, Elenon E, Piippo K, Porkka K, Knuutila S: Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21:571-574 (2007).
- Valk PJ, Delwel R, Lowenberg B: Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 12:76-81 (2005).
- Wilkens L, Burkhardt D, Tchinda J, Busche G, Werner M, et al: Cytogenetic aberrations in myelodysplastic syndrome detected by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 8:47-53 (1999).

Coincident neutral loss of heterozygosity and copy number aberrations contribute to define complex genomic rearrangements in AML

To the editor:

Copy number neutral loss of heterozygosity (CNN-LOH) are genomic alterations characterized by the absence of one parental copy and the duplication of the remaining one. This event generates a homozygous region, which may have the same effect as a genomic loss if it contains sequences that are silenced(1). Array-SNP have been used to determine either copy number altered regions or regions of loss of heterozygosity which could not be visible using other chromosomal aberration studies (2). These events have been mainly described, among several cancer types(1, 3, 4), like acute myeloid leukemia (AML) cases with normal karyotype (NK), showing that CNN-LOH is a common phenomena in this disease (10-20%) (5, 6). Moreover, many of these regions were associated with mutations in cancer related proteins (as *CEBPA*, *FLT3* or *RUNX1*), suggesting that CNN-LOH features are a common way to induce leukemogenesis (7). However, no detailed studies at high resolution level have been reported describing the limits and the genomic features of regions affected by a combination of both CNN-LOH and copy number aberrations.

We selected DNA from sixteen *de novo* adult AML representing all AML cytogenetic-risk groups (Table 1). DNA was hybridized using a Illumina Infinium whole genome HumanHap300 Genotyping Beadchip (Illumina, Inc, San Diego, CA, USA), containing up to 317K SNPs across the genome. Hybridizations were done according to manufacturer's protocol. For LOH data analysis, we used the LOH score provided by the company (see Peiffer et al, 2006, for more details)(2). We accepted as positive LOH region those with more than 10 consecutively affected

SNPs. Copy number variations across the genome were also studied in the same experiments by using the smoothing method implemented in InsilicoCGH from GEPAS Suite Software (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>). The results of both types of observations were contaminated with the presence of genetic polymorphisms. In fact, regarding CNN-LOH, large regions of homozygosity have been recently described in normal populations, probably due to remaining ancestral haplotypes (8). Because of that, and in the absence of a public database we were forced to test two hundred healthy donor DNA samples, extracted from the Spanish population, that were hybridized to detect ancestral homozygous regions. We curated CNN-LOH regions which overlapped at least 80% of the sequence with CNN-LOH regions found in our cohort of healthy donor samples. To curate the copy number variations that may be due to polymorphisms, we excluded regions with at least 80% of overlapping sequence with polymorphisms in our control population and from the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>) (a summary of all eliminated polymorphisms is shown in Supplementary table 1). Finally, copy number values and LOH statuses of the 16 AML samples were compared and validated with our previous results obtained in a 100 AML study using the Agilent 44k ArrayCGH platform (9).

We observed that 11 out of 16 samples (69%) were affected by LOH events (graphical overview of the cases is shown in supplementary material). In total, 49 LOH regions were detected (Supplementary table 2). None of these regions were found in the 200 controls. Twenty eight of them (57%) were exclusively due to the presence of deletions (overlapping limits and extension). From the remaining 21 regions (all recorded in Table 1), 18 were exclusively CNN-LOH regions. These regions were found in nine (56%) of the 16 cases. They showed a median size of

4.56 Mb (range 500kb to 87Mb). The proportion of cases with CNN-LOH is higher than the ones previously published for AML (5, 6), being the most likely reason for explaining this difference the thirty-fold increase in the number of probes per assay (300K versus 10K) and the composition of our series that included cases with chromosome aberrations. Apart from the NK subgroup of cases, we have studied 12 cases with previously known chromosome and/or copy number aberrations (Table 1). Seven of these 12 cases showed CNN-LOH regions, (equally frequent in all cytogenetic risk groups). This fact was not reported before. Regarding the molecular features of the CNN-LOH events, a classical genetic division differentiates those affected regions ending at the telomeres (telomeric CNN-LOH) and those limited by two rearrangements within the same chromosome arm (interstitial CNN-LOH). Previous reports found a strong bias towards the telomeric CNN-LOH (5, 6). Conversely, we found that interstitial CNN-LOH was much more frequent in our series than telomeric events (15 versus 3, respectively), probably due to the same above mentioned reasons. Interstitial CNN-LOH was observed in all three cytogenetics groups.

The remaining 3 LOH regions were studied as a different phenomenon because they were physically associated with copy number variations. We have termed these regions as complex-LOH, which were composed by an CNN-LOH region flanked by deletions. These events were found in chromosomes 8 and 17. These regions were very large, from 19.6 Mb (complex-LOH in case 3 at chromosome 8) to an entire chromosome (a monosomy of chr #17 that included a CNN-LOH region of 31.6 Mb, in case #13). Complex-LOH events were frequent in complex karyotypes: 2 out 3 cases with complex-LOH events, showed complex karyotypes. Interestingly, complex karyotype cases did not harbor any exclusive CNN-LOH region.

Molecular mechanisms underlying the origin of these highly rearranged regions are yet unknown. Based in their frequency, it seems reasonable to assume than a complex-LOH region is formed by an initial CNN-LOH event that is followed by secondary deletions in the boundaries of CNN-LOH region. However, the size and limits of the involved regions may induce to think in the opposite way. In any case, both types of rearrangements are closely linked and should be considered as markers of genomic/genetic instability.

In conclusion, we have confirmed that LOH events are a common issue in the AML. Moreover, we were able to describe for the first time the complex-LOH events as a frequent genomic event in cases with chromosomal copy number aberrations. These findings were much more common in complex karyotypes, suggesting that complex-LOH could be markers of instability in leukemia.

Javier Suela

*Molecular Cytogenetics Group. Spanish National Cancer Center (CNIO). Madrid,
Spain.*

Maria José Calasanz

University of Navarra. Pamplona, Spain.

Sara Marsal, Antonio Juliá

*Unitat de Recerca de Reumatologia. Institut de Recerca Hospital Universitari Vall
d'Hebron. Barcelona, Spain.*

Anna González-Neira

Genotyping Unit. Spanish National Cancer Center (CNIO). Madrid, Spain.

Juan Cruz Cigudosa

*Molecular Cytogenetics Group. Spanish National Cancer Center (CNIO).
Melchor Fernández Almagro, 3*

E-28029 Madrid, Spain.

Telephone: 34-91-2246900 ext 2101

Fax: 34-91-2246923

E-mail: jccigudosa@cni.es

Acknowledgements

Research grants and financial support: This work was financed by grant PI040555 from Fondo Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo to JCC. We also thank Genoma España for financial support. JS has a PhD fellowship from Ministerio de Educacion y Ciencia.

References:

1. Walker BA, Morgan GJ. Use of single nucleotide polymorphism-based mapping arrays to detect copy number changes and loss of heterozygosity in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006;7(3):186-91.
2. Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jenniges T, Garcia F, et al. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 2006;16(9):1136-48.
3. Andersen CL, Wiuf C, Kruhoffer M, Korsgaard M, Laurberg S, Orntoft TF. Frequent occurrence of uniparental disomy in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007;28(1):38-48.
4. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008;111(3):1534-42.
5. Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005;65(2):375-8.
6. Gorletta TA, Gasparini P, D'Elis MM, Trubia M, Pelicci PG, Di Fiore PP. Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44(3):334-7.
7. Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, Smith ML, Debernardi S, Skoulakis S, et al. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005;65(20):9152-4.
8. Gibson J, Morton NE, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet* 2006;15(5):789-95.
9. Suela J, Alvarez S, Cifuentes F, Largo C, Ferreira B, Blesa D, et al. DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. *Leukemia* 2007;In press.

Legend to Figure

Figure 1. complex LOH events found in different AML cases.

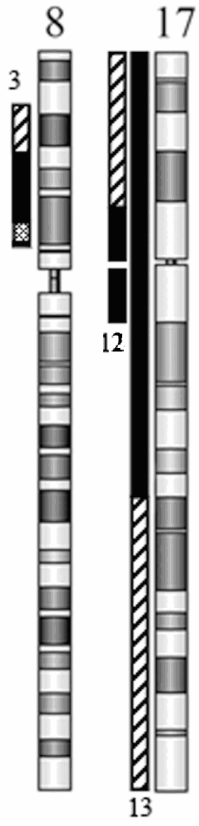
Each complex LOH phenomena is represented by a bar drawn left to the specific chromosome. The number of case is shown up or down the bar. Colors define the type of aberrations along the complex LOH event (black = loss of genomic material, dashed = diploid-LOH, cross stitched pattern = polyploid LOH).

Table 1. LOH regions found in AML cases.

Case	Prognosis	Karyotype Findings	Whole LOH Region			Copy Number Alterations in this region				
			LOH Type	Chr	Start	Size	Ploidy	Start	Size	
1	Favorable	inv(16)	N/IL	3	79068495	28.3	-	-	-	
			N/IL	11	38454177	20.4	-	-	-	
			N/IL	16	72456853	4.7	-	-	-	
2	Favorable	inv(16)	-	-	-	-	-	-		
3	Favorable	inv(16)	N/IL	2	140813260	7.3	-	-	-	
			C/IL	8	14126601	19.6	1n	20388180	11.6	
							>2n	31979736	1.3	
							1n	33298381	0.5	
			N/IL	18	42005991	4.6	-	-	-	
				N/IL	20	11799	5.1	-	-	-
4	Favorable	inv(16)	N/IL	2	88389214	2.6	-	-	-	
5	Intermediate	-18	N/IL	6	28033346	0.8	-	-	-	
			N/IL	14	43576901	41.6	-	-	-	
6	Intermediate	+19	N/IL	2	58387567	2.8	-	-	-	
7	Intermediate	+8	N/IL	3	113653472	17.0	-	-	-	
			N/IL	9	128451226	1.3	-	-	-	
			N/IL	20	34875713	7.0	-	-	-	
8	Intermediate	NK	-	-	-	-	-	-		
9	Intermediate	NK	N/IL	5	151372673	1.8	-	-	-	
			N/TL	13	27338007	86.8	-	-	-	
10	Intermediate	NK	N/TL	12	131872351	0.5	-	-	-	
11	Intermediate	NK	-	-	-	-	-	-		
12	Adverse	Complex	C/TL	17	51088	22.1	1n	15495286	6.7	
13	Adverse	Complex	C/TL	17	51088	78.6	1n	51088	47.0	
14	Adverse	Complex	-	-	-	-	-	-		
15	Adverse	Complex	-	-	-	-	-	-		
16	Adverse	MLL	N/IL	6	121445811	1.5	-	-	-	
			N/TL	16	37354	0.5	-	-	-	

Type of LOH: N=neutral, C=complex, IL=interstitial, TL=telomeric

Figure 1



OTRAS PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

1. Largo C, Saéz B, Alvarez S, Suela J, Ferreira B, Blesa D, Prosper F, Calasanz MJ, Cigudosa JC. Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocations. *Haematologica*. 2007 Jun;92(6):795-802.

2. Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, Acquadro F, Largo C, Suela J, Teixeira MR, Cerveira N, Molares A, Gómez-López G, Pestaña A, Sastre A, Garcia-Miguel P, Cigudosa JC. Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene*. 2008 Mar 27;27(14):2084-90. Epub 2007 Oct 22.

3. Ferreira BI, García JF, Suela J, Mollejo M, Camacho FI, Carro A, Montes S, Piris MA, Cigudosa JC. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica*. 2008 Mar 26; [Epub ahead of print]

Haematologica. 2007 Jun;92(6):795-802. Links

Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocations.

Largo C, Saéz B, Alvarez S, Suela J, Ferreira B, Blesa D, Prosper F, Calasanz MJ, Cigudosa JC.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Multiple myeloma (MM) is a malignant plasma cell neoplasia in which genetic studies have shown that genomic changes may affect almost all chromosomes, as shown by fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). Our objective was the genomic characterization of CD 138 positive primary MM samples by means of a high resolution array CGH platform. **DESIGN AND METHODS:** For the first time, a high resolution array CGH with more than 40,000 probes, has been used to analyze 26 primary MM samples after the enrichment of CD138-positive plasma cells. **RESULTS:** This approach identified copy number imbalances in all cases. Bioinformatics strategies were optimized to perform data analysis allowing the segregation of hyperdiploid and non-hyperdiploid cases by array CGH. Additional analysis showed that structural chromosome rearrangements were more frequently seen in hyperdiploid cases. We also identified the same Xq21 duplication in nearly 20% of the cases, which originated through unbalanced chromosome translocations. High level amplifications and homozygous deletions were recurrently observed in our series and involved genes with meaningful function in cancer biology. **INTERPRETATION AND CONCLUSIONS:** High resolution array CGH allowed us to identify copy number changes in 100% of the primary MM samples. We segregated different MM subgroups based on their genomic profiles which made it possible to identify homozygous deletions and amplifications of great genetic relevance in MM.

Oncogene. 2008 Mar 27;27(14):2084-90.

Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma.

Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, Acquadro F, Largo C, Suela J, Teixeira MR, Cerveira N, Molares A, Gómez-López G, Pestaña A, Sastre A, Garcia-Miguel P, Cigudosa JC.

Ewing's sarcoma (ES) is characterized by specific chromosome translocations, the most common being t(11;22)(q24;q12). Additionally, other type of genetic abnormalities may occur and be relevant for explaining the variable tumour biology and clinical outcome. We have carried out a high-resolution array CGH and expression profiling on 25 ES tumour samples to characterize the DNA copy number aberrations (CNA) occurring in these tumours and determine their association with gene-expression profiles and clinical outcome. CNA were observed in 84% of the cases. We observed a median number of three aberrations per case. Besides numerical chromosome changes, smaller aberrations were found and defined at chromosomes 5p, 7q and 9p. All CNA were compiled to define the smallest overlapping regions of imbalance (SORI). A total of 35 SORI were delimited. Bioinformatics analyses were conducted to identify subgroups according to the pattern of genomic instability. Unsupervised and supervised clustering analysis (using SORI as variables) segregated the tumours in two distinct groups: one genomically stable (< or =3 CNA) and other genomically unstable (>3 CNA). The genomic unstable group showed a statistically significant shorter overall survival and was more refractory to chemotherapy. Expression profile analysis revealed significant differences between both groups. Genes related with chromosome segregation, DNA repair pathways and cell-cycle control were upregulated in the genomically unstable group. This report elucidates, for the first time, data about genomic instability in ES, based on CNA and expression profiling, and shows that a genomically unstable group of Ewing's tumours is correlated with a significant poor prognosis.

Haematologica. 2008 Mar 26 [Epub ahead of print]

Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia.

Ferreira BI, García JF, Suela J, Mollejo M, Camacho FI, Carro A, Montes S, Piris MA, Cigudosa JC.

Background Low-grade B-cell lymphomas are a very heterogeneous group of tumors, whose differential diagnosis is frequently compromised by the lack of specific cytogenetic or molecular features. Our objective was to search for genomic features that allow a better molecular identification of the different types of lymphoma studied. **DESIGN AND METHODS:** We selected a panel of 87 low-grade B-cell lymphoma tumor samples that were unambiguously diagnosed (clinically and cytogenetically) as: follicular, splenic marginal zone, nodal marginal zone, lymphoplasmacytic, mantle cell, extranodal marginal zone MALT-type lymphoma or B-cell chronic lymphocytic leukemia. All samples were subjected to the same high-resolution genomic DNA analysis (array-based comparative genomic hybridization): a whole genome platform that contained 44000 probes distributed across the genome. Genomic imbalances were recorded, compiled and analyzed. **RESULTS:** Eighty percent of analyzed cases showed genomic imbalances (deletions and gain/amplifications) but the frequency of these imbalances ranged from 100% in mantle cell lymphomas to 33% in MALT lymphomas. A total of 95 new genomic imbalances affecting all lymphoma subtypes, were defined. We evaluated the extension of the genomic instability, detecting distinct patterns of genomic instability within subtypes. Specific pathways, such as nuclear factor κ B (gains of REL and BCL11A, and losses of COMMD3, BIRC1, IKK1 and NF κ B2), Polycomb group proteins (gain of BMI1 and deletion of PCGF6), DNA repair checkpoint pathways (deletion of 16q24 involving CDT1), or miRNA with a role in B-cell lymphoma pathogenesis (MIRN15A, MIRN16-1), were targeted by this genomic instability. **Conclusions** Although all subtypes of lymphomas showed gains and losses of DNA, the analysis of their genomic profiles indicated that there are specific aberrations in almost every subtype as well as frequent aberrations that are common to a large number of lymphoma types. These common aberrations target genes that are important in B-cell lymphomagenesis.

