



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Medicina

Programa de Doctorat de Medicina Interna

**Tratamiento adaptado al riesgo de la leucemia
promielocítica aguda con ATRA y quimioterapia**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Pau Montesinos Fernández

Dirigida por:

Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Prof. Jordi Sierra Gil

MIGUEL A. SANZ ALONSO, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia,

JORDI SIERRA GIL, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: "TRATAMIENTO ADAPTADO AL RIESGO DE LA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA CON ATRA Y QUIMIOTERAPIA", ha sido realizada bajo mi dirección por **Pau Montesinos Fernández**, Licenciado en Medicina y Cirugía, y reúne a mi juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

Fdo.: Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Fdo.: Prof. Jordi Sierra Gil

Barcelona, Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Al director de esta Tesis Doctoral y mentor, el Prof. Miguel A. Sanz, por tener la paciencia necesaria conmigo, por confiar en mí, por inculcarme el espíritu crítico y la pasión por el trabajo necesarios para cualquier científico, y por supuesto, por ayudarme a mejorar continuamente como persona, siendo el mejor espejo en el que reflejarse.

Al director de esta Tesis Doctoral, el Prof. Jordi Sierra Gil, por ayudarme en este proyecto y por su generosidad con la comunidad contribuyendo a desarrollar múltiples estudios en hematología.

A David, a Blanca y a Rebeca, por echarme una mano siempre y por transmitirme su entusiasmo en todo.

A todos los compañeros que forman o han formado parte del Servicio de Hematología del Hospital La Fe por ayudarme a convertirme en el hematólogo que soy.

A todos los centros, investigadores y *data managers* de PETHEMA que colaboran día a día para mantener el registro nacional de leucemias y mejorar los resultados en nuestros pacientes. Detrás de trabajos como este, hay muchas más personas implicadas.

Y muy especialmente, a Shirley y a nuestras criaturas, por darme una vida de satisfacciones más allá del trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE	7
1 MOTIVACIÓN DE LA TESIS.....	12
2 INTRODUCCIÓN.....	15
2.1 GENERALIDADES SOBRE LA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA	16
2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	17
2.3 BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA	17
2.4 TRATAMIENTO DE LA LPA EN LA ERA PRE-ATRA.....	18
2.4.1 <i>Tratamiento de inducción a la remisión</i>	18
2.4.2 <i>Tratamiento post-remisión</i>	19
2.5 TRATAMIENTO DE LA LPA EN LA ERA DEL ATRA.....	19
2.5.1 <i>Tratamiento de inducción a la remisión</i>	19
2.5.2 <i>Evaluación de la respuesta a la inducción</i>	21
2.5.3 <i>Tratamiento post-remisión</i>	22
2.5.4 <i>Consolidación adaptada al riesgo</i>	25
2.5.5 <i>Tratamiento de mantenimiento</i>	26
2.6 CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y BIOLÓGICA DE LA LPA	27
2.6.1 <i>Confirmación del diagnóstico genético</i>	27
2.6.2 <i>Pruebas diagnósticas y procesamiento de las muestras</i>	27
2.7 TRATAMIENTO DE SOPORTE PARA LA LPA.....	31
2.7.1 <i>Inicio inmediato de tratamiento con ATRA</i>	31
2.7.2 <i>Inicio inmediato de medidas para corregir la coagulopatía</i>	31
2.7.3 <i>Prevención y manejo del síndrome de diferenciación</i>	33
2.7.4 <i>Otras medidas de soporte específicas</i>	33
2.8 JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DEL PROYECTO.....	34
3 HIPÓTESIS.....	36
4 OBJETIVOS	38
5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
5.1 PACIENTES	41
5.2 CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD EN LOS ESTUDIOS	41
5.3 CITOMETRÍA DE FLUJO	41
5.4 ANÁLISIS CITOGENÉTICO Y MOLECULAR	42
5.5 REGISTRO PETHEMA	42
5.6 AGENTES EMPLEADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LPA	42
5.6.1 <i>ATRA</i>	43
5.6.2 <i>Idarubicina</i>	44

5.6.3	<i>Mitoxantrone</i>	44
5.6.4	<i>Metotrexate</i>	45
5.6.5	<i>6-Mercaptopurina</i>	46
5.7	TRATAMIENTO DE LA LPA	46
5.7.1	<i>Protocolo PETHEMA LPA96</i>	46
5.7.2	<i>Protocolo PETHEMA LPA99</i>	48
5.8	DEFINICIONES COMUNES EN LOS TRES ESTUDIOS	51
5.8.1	<i>Evaluación de la respuesta</i>	51
5.8.2	<i>Riesgo de recaída</i>	53
5.8.3	<i>Coagulopatía</i>	53
5.8.4	<i>Síndrome de diferenciación</i>	53
5.9	TRATAMIENTO DE SOPORTE	54
5.9.1	<i>Coagulopatía</i>	54
5.9.2	<i>Síndrome de diferenciación</i>	54
5.9.3	<i>Infecciones</i>	55
5.10	RECOGIDA Y REGISTRO DE DATOS	55
5.11	CONFIDENCIALIDAD	55
5.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
6	RESULTADOS	58
6.1	ARTÍCULO 1	59
6.2	ARTÍCULO 2	66
6.3	ARTÍCULO 3	78
7	DISCUSIÓN	88
8	CONCLUSIONES	97
9	ANEXOS	101
9.1	ARTÍCULO ANEXO 1	103
9.2	ARTÍCULO ANEXO 2	111
9.3	ARTÍCULO ANEXO 3	122
9.4	ARTÍCULO ANEXO 4	131
9.5	ARTÍCULO ANEXO 5	140
9.6	ARTÍCULO ANEXO 6	151
9.7	ARTÍCULO ANEXO 7	159
10	BIBLIOGRAFÍA	168

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ATO	Trióxido de Arsénico
ATRA	Ácido holo-trans retinòico
CID	Coagulación intravascular diseminada
CIR	Incidencia Acumulada de Recaída (<i>Cumulative Incidence of Relapse</i>)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FAB	French-American-British
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FLT3	Fms-like tyrosin kinase 3
IDA	Idarubicina
IM	Vía intramuscular
IV	Vía intravenosa
LMA	Leucemia Mieloblástica Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
MO	Médula ósea
MTX	Metotrexate
MTZ	Mitoxantrone
RARA	Receptor alfa del ácido retinóico
RC	Remisión Completa
SC	Vía subcutánea
SD	Síndrome de diferenciación
SG	Supervivencia Global
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNC	Sistema Nervioso Central
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VO	Vía oral
WHO	World Health Organization
6-MP	6-Mercaptopurina

1 MOTIVACIÓN DE LA TESIS

Durante mi formación como hematólogo en el hospital Universitario y Politécnico La Fe, me fascinó el ímpetu de mis “mayores” a la hora de tratar un grupo de enfermedades, las leucemias agudas, que son consideradas unas de las enfermedades neoplásicas de curso más letal a corto plazo, y en el que los tratamientos administrados a los pacientes son por ende extremadamente agresivos. Mis compañeros *senior*, curtidos en la batalla, ponían todo su empeño en tratar de la mejor manera posible a sus pacientes, pero al mismo tiempo se veía que no estaban conformes con los resultados que se obtenían. Por este motivo, desde el primer momento contemplé como era necesario un espíritu que necesariamente incluyera la vertiente investigadora a la hora de afrontar el difícil manejo de esta enfermedad. Básicamente, contentarse simplemente con administrar los esquemas de tratamiento al uso en nuestros pacientes no era más que “pan para hoy y hambre para mañana”. Afortunadamente, aprendí de mi mentor, el Profesor Miguel Ángel Sanz Alonso, y del resto de su equipo, y especialmente del Doctor Guillermo Martín Aragonés, que el camino hacia la mejoría de nuestros pacientes con leucemia aguda, implicaba un sacrificio intelectual por parte del médico, dedicando mucho tiempo a desentrañar los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad, y sobre todo a estudiar las complicaciones de nuestros pacientes y la respuesta a los tratamientos que les ofrecíamos. Todo esto, para conocer los puntos débiles de la leucemia aguda y de los esquemas terapéuticos administrados, con el fin de ir mejorando los tratamientos y corrigiendo sus defectos. Sin duda, desde la investigación clínica, el conocimiento de la magnitud de las complicaciones de la leucemia (muerte tóxica, resistencia y recaída tras la quimioterapia) y el análisis de los factores pronósticos para predecir el fracaso terapéutico, son un eje fundamental para la optimización de los agentes antileucémicos que los clínicos disponemos para intentar curar la enfermedad.

Aún recuerdo cuando Miguel y Guillermo me dijeron que analizara la mortalidad hemorrágica en los pacientes con leucemia mieloide aguda. A mi me pareció muy interesante, no había llegado a ser Hematólogo para quedarme con el “pan para hoy”. Pero lo que vino después también lo recuerdo: horas, días y semanas en los archivos del hospital repasando las historias microfilmadas de centenares de pacientes con leucemia. Eso sí que era investigación. Y la mejor manera de aprender, desde luego mucho más real que los libros...

Tras finalizar mi formación MIR como hematólogo tuve la suerte de contar con el apoyo incondicional del Miguel y poder solicitar un contrato de formación en investigación ofertado por el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Éste me fue concedido en Septiembre de 2005. De esta forma tuve el privilegio de seguir

formándome como investigador en un área de gran interés personal como eran las leucemias agudas. Ese año, cuando Guillermo decidió jubilarse para la investigación, Miguel decidió cederme su relevo con la base de datos de leucemia promielocítica aguda (LPA) del grupo Programa Español de Tratamientos en Hematología (PETHEMA). Recuerdo que en aquel momento esta apenas contaba con 800 casos registrados, pero aún así ya era uno de los mejores registros mundiales de este subtipo de leucemia aguda. Y pensar que ahora son más de 2300 sujetos. El caso es que asumiendo esa responsabilidad, tuve la suerte de poder disfrutar y aprender en estrecho contacto con Miguel Sanz y también del Profesor Jordi Sierra, puesto que su grupo también colaboraba y sigue colaborando con registro PETHEMA de LPA. Ahora, ambos son los co-directores de la presente tesis.

La defensa de esta tesis doctoral supone un gran paso personal labrado con paciencia y perseverancia a lo largo de varios años, así como la culminación de una fase de formación fundamental. Del mismo modo, espero que sea el inicio de una etapa fuertemente ligada a la transmisión de conocimiento y que pueda repercutir positivamente en los futuros médicos y los pacientes.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades sobre la leucemia promielocítica aguda

La leucemia promielocítica aguda (LPA) es un subtipo de leucemia mieloblástica aguda (LMA) caracterizada por una alteración genética específica que afecta al receptor alfa del ácido retinóico (RAR α), que conduce al bloqueo de la diferenciación de las células hematopoyéticas granulocíticas. La acumulación de blastos promielocíticos en la médula ósea producirá intensas citopenias en sangre periférica y, con menor frecuencia, leucocitosis, asociándose en ambos casos una coagulopatía de consumo con manifestaciones hemorrágicas en ocasiones severas. El conjunto de conocimientos biológicos sobre la LPA establece a esta leucemia como una entidad única que debe ser rápidamente reconocida y distinguida del resto de LMA, sobre todo debido a su exquisita sensibilidad al tratamiento con antraciclinas y agentes diferenciadores como ácido holo-transretinóico (ATRA) y trióxido de arsénico (ATO). El tratamiento de elección actual, que incluye la administración simultánea de ATRA y quimioterapia basada en antraciclinas en inducción y consolidación, seguido de mantenimiento con ATRA y quimioterapia de baja intensidad, ha transformado la LPA en el subtipo de leucemia aguda más curable en adultos, con aproximadamente un 80% de supervivientes a largo plazo.^{1,2,3,4,5,6} La curación de la LPA, sin embargo, también dependerá de la instauración inmediata de medidas de soporte intensivas para corregir las complicaciones amenazantes para la vida asociadas a la actividad biológica de la LPA o de los mismos agentes diferenciadores y quimioterápicos (por ejemplo, la coagulación intravascular diseminada o el síndrome de diferenciación). Por otro lado, los tratamientos adaptados al riesgo (de recaída o de muerte), modulando la intensidad de los esquemas terapéuticos, pueden ser una estrategia efectiva para minimizar la mortalidad y la morbilidad asociadas al tratamiento, manteniendo, al mismo tiempo, la eficacia antileucémica.

A pesar del elevado potencial curativo de los regímenes de primera línea con ATRA y antraciclinas, una proporción importante de pacientes (alrededor del 10-15%) desarrollará una recaída leucémica. Dada la gran eficacia del ATO en monoterapia o combinado con ATRA, este agente es actualmente considerado el tratamiento de elección en los pacientes que presenten recaída. En estos pacientes, una vez obtenida la segunda remisión completa, se aconseja la intensificación de la respuesta mediante la realización de un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Un problema adicional, aunque poco frecuente, podría ser la recaída en el sistema nervioso central, que requerirá tratamiento específico mediante administración de quimioterapia intratecal o radioterapia craneoespinal.

2.2 Aspectos epidemiológicos

Aunque la incidencia real de la LPA no es bien conocida, podemos afirmar que se trata de una enfermedad hematológica relativamente rara. El número estimado de nuevos casos en los Estados Unidos puede ser de 600 a 800 por año.^{7,8} Los datos epidemiológicos en España son escasos, pero parece que este subtipo de leucemia puede representar en torno al 14% de todas las LMA del adulto.⁹ Una característica de la LPA es su relación con ciertas franjas de edad: es muy rara en niños menores de 10 años, y su incidencia aumenta a partir de esta edad alcanzando una meseta en torno a los 40 años para después disminuir a partir de los 60 años.¹⁰ Esto supone un comportamiento diferente al resto de LMA, que ocurren sobre todo a partir de los 55 años (con una mediana de edad en torno a los 65-70 años). Existen datos sugestivos de un aumento de los casos de LPA secundaria a exposición previa a inhibidores de topoisomerasa II y otros agentes con potencial leucemógeno, particularmente en pacientes con antecedentes de cáncer de mama o de esclerosis múltiple.^{11,12,13,14} Aunque no se conoce la incidencia real de la LPA secundaria, los escasos estudios sugieren que podrían representar un 5-10% de todos los casos de esta leucemia. Respecto a la incidencia entre las diferentes razas o grupos étnicos, existen datos contradictorios que apuntan hacia una mayor incidencia entre los "Latinos".¹⁵ La posible mayor incidencia de LPA entre "Latinos", o visto de otra forma, la posible menor incidencia entre "Nórdicos", es sin duda una cuestión epidemiológica en debate que tendrá que ser confirmada en futuros estudios. Otro aspecto interesante de la LPA es su posible aparición en "rachas". Puede existir la sensación entre los médicos que diagnostican y tratan a pacientes con LPA de que los casos pueden aparecer acumulados en un corto espacio de tiempo, mientras que no se diagnostican nuevos pacientes durante periodos prolongados. Esta interesante hipótesis deberá ser confirmada o refutada en estudios epidemiológicos bien diseñados, que por otra parte serán difíciles de realizar debido a la rareza de la enfermedad. Es probable que esto no sea más que una percepción del hematólogo, que ante la rareza de una enfermedad con unos rasgos clínico-biológicos y un pronóstico tan particulares, podría asociar fácilmente entre sí los casos de LPA consecutivos que se presentaran en medio del resto de casos de LMA.

2.3 Breve reseña histórica de la leucemia promielocítica aguda

Durante las tres últimas décadas la LPA ha pasado de ser el subtipo de leucemia aguda más letal, por la elevada mortalidad hemorrágica precoz, a ser el

paradigma de la curabilidad de las leucemias agudas mediante el uso de terapias dirigidas a dianas genéticas (“targeted therapy”). El primer hito en el tratamiento de la LPA fue la observación de su exquisita quimio-sensibilidad a la daunorubicina, demostrada en el estudio publicado en 1973 por Bernard et al.¹⁶ En los siguientes años, otros investigadores confirmaron la eficacia de la daunorubicina y de otras antraciclinas como la idarubicina.^{17,18,19,20,21} El Segundo hito en el tratamiento de esta enfermedad fue señalado por el Grupo de Shanghai al final de los años 1980, al demostrar una alta tasa de remisiones completas (RC) usando un agente diferenciador no citotóxico, el ATRA.²² A continuación se resumirá el desarrollo terapéutico de la LPA en las últimas décadas.

2.4 Tratamiento de la LPA en la era pre-ATRA

2.4.1 Tratamiento de inducción a la remisión

Antes de la irrupción del ATRA, el tratamiento de la LPA estaba basado en dos aproximaciones terapéuticas generales: una con quimioterapia tipo LMA y otra con quimioterapia específica de LPA. La última estrategia fue adoptada por el grupo Europeo de investigadores liderado por Jean Bernard, influidos por los resultados obtenidos por su equipo en el Hospital de Saint-Louis de París. En este periodo, varios ensayos mostraron mayores tasas de RC respecto al resto de las LMA, usando idarubicina o daunorubicina en monoterapia. Además, los fallos terapéuticos observados en la LPA se debían a complicaciones tóxicas, fundamentalmente hemorrágicas aunque también infecciosas, con fallos debidos a resistencia a la quimioterapia solo observados en un 10% de los pacientes. Estos resultados indicaron una exquisita sensibilidad de las células leucémicas de la LPA a las antraciclinas, que probablemente podían estar en relación a la casi nula expresión de la glicoproteína p170 y de otras moléculas asociadas a multiresistencia a quimioterapia en estas células leucémicas.²³ Además, se observó que la adición de citarabina a la antraciclina no mejoraba los resultados de la quimioterapia de inducción.^{24,25,26,27} En este sentido, el único estudio aleatorizado de la era pre-ATRA comparando la monoterapia con antraciclina frente a la combinación de antraciclina y citarabina, llevado a cabo por el grupo GIMEMA, mostró que, incluso a largo plazo, la monoterapia con antraciclina ofrecía mejores resultados que la combinación en tasas de RC y en supervivencia.²⁸

2.4.2 Tratamiento post-remisión

Diversas estrategias terapéuticas, generalmente similares a las usadas en otras LMA, fueron adoptadas para el tratamiento post-remisión en la LPA. Los primeros estudios usaron ciclos de consolidación de moderada intensidad (re-inducciones) con o sin una posterior fase de quimioterapia de mantenimiento. En la LMA, estas estrategias post-remisión fueron cambiando hacia la administración de unos ciclos más intensivos de quimioterapia (consolidaciones), seguidos de ciclos de intensificación generalmente incluyendo algún tipo de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Así, estas estrategias de consolidación e intensificación con o sin TPH también se aplicaron en la LPA, manteniéndose así hasta la irrupción del ATRA. Puesto que no se realizó ningún estudio aleatorizado en aquella época, no se puede concluir firmemente que estrategia post-remisión pudiera ser la más acertada. Sin embargo, dos estudios mostraron que, a diferencia de otros subtipos de LMA, una fase de quimioterapia de mantenimiento de baja intensidad prolongada, basada en la administración continua¹⁷ o alternante²⁹ de mercaptopurina y metotrexate, podía ofrecer ventajas en la LPA. Estos estudios fueron el racional para la incorporación de un mantenimiento con bajas dosis de mercaptopurina y metotrexate en los protocolos modernos diseñados a partir de la irrupción del ATRA.^{30,31}

2.5 Tratamiento de la LPA en la era del ATRA

2.5.1 Tratamiento de inducción a la remisión

El advenimiento de ATRA representó un hito en el tratamiento de la LPA, lográndose mejoras impresionantes en los resultados de los pacientes desde su introducción rutinaria en la terapia de primera línea en la década de 1990, particularmente con respecto a la inducción de la remisión. Los estudios iniciales con ATRA en monoterapia, se tradujeron en altas tasas de RC hematológica, pero mostraron claramente la necesidad de administrar algún tipo de terapia de consolidación. De hecho, casi nunca se logró remisión molecular con el ATRA en monoterapia, y la mayoría de los pacientes tuvo una recaída de la enfermedad en el primer año tras la obtención de la RC.^{32,33,34}

La administración simultánea de ATRA y quimioterapia basada en antraciclinas es considerada actualmente la terapia de inducción estándar en pacientes con nuevo diagnóstico de LPA. Esta combinación tiene una elevada eficacia antileucémica,

permitiendo alcanzar tasas de remisión completa (RC) del 90-95%. De hecho, virtualmente no existe resistencia leucémica a esta terapia de inducción, y solo se han publicado casos anecdóticos de resistencia en la literatura.^{35,36} Varios ensayos clínicos realizados en la década de los 90 ha llevado a un refinamiento de los regímenes con ATRA y quimioterapia basada en antraciclinas.^{23,45} Los estudios iniciales mostraron que la monoterapia con ATRA producía una alta tasa de RC, pero era necesaria algún tipo de quimioterapia de consolidación para evitar la recaída leucémica. Varios estudios posteriores, y en especial los estudios aleatorizados del European APL group³⁷ y del North-American Intergroup,³⁸ mostraron que los pacientes tratados con ATRA seguido de quimioterapia tenían mejores resultados que aquellos tratados solo con quimioterapia. En ambos estudios las tasas de muerte precoz y de RC no fueron diferentes entre las dos ramas de tratamiento, pero las tasas de recaídas fueron mucho mayores en los pacientes tratados solo con quimioterapia. Más tarde, otro estudio aleatorizado del European APL group demostró que la administración simultánea, y no secuencial, de ATRA y quimioterapia basada en antraciclinas, mejoraba los resultados en términos de duración de la RC.³⁹ Estos hallazgos fueron confirmados en varios ensayos multicéntricos que incluyeron un gran número de pacientes.^{36,40,41,42,43,44} A partir de estos estudios, la administración simultánea de ATRA y quimioterapia basada en antraciclinas fue considerada como la terapia de inducción estándar en LPA.

Aunque existe un consenso general sobre la terapia estándar de inducción, aún existe controversia respecto a la superioridad de una antraciclina sobre otra (idarubicina frente a daunorubicina), así como respecto a la idoneidad de combinar otros agentes en inducción, como la citarabina. Tasas de RC comparables han sido descritas con ATRA combinado a daunorubicina más citarabina³⁹ y con ATRA más idarubicina sola,^{41,43} sin aparentes ventajas al añadir otros agentes quimioterápicos.³⁶ El único estudio aleatorizado que ha comparado inducción con ATRA más daunorubicina frente a ATRA más daunorubicina y citarabina, no ha demostrado superioridad de ninguna rama terapéutica en cuanto a tasas de muerte en inducción y RC.⁴⁵ Sin embargo, este estudio mostró un aumento de las recaídas cuando la citarabina se omitió tanto en inducción como en consolidación. Los resultados de otro ensayo aleatorizado comparando ATRA más idarubicina frente a ATRA más daunorubicina y citarabina, no encontró diferencias en las tasas de RC y recaída, pero sí una disminución significativa de las muerte tóxicas en remisión en los pacientes tratados con ATRA y antraciclinas en monoterapia.⁴⁶ Respecto al tipo de antraciclina, la combinación de idarubicina con citarabina ha demostrado un beneficio en

supervivencia respecto a la combinación de daunorubicina con citarabina, pero estos hallazgos solo se han producido en pacientes jóvenes con otros tipos de LMA.⁴⁷ Sin embargo, en LPA no se han publicado aún estudios prospectivos que comparen los resultados terapéuticos de ambas antraciclina.

La administración de una terapia de inducción diferente a la considerada estándar solo debe ser considerada para aquellos pacientes con contraindicaciones para la quimioterapia (por ejemplo, comorbilidades severas, edad muy avanzada). Modificaciones de la inducción estándar basadas en características fenotípicas y genotípicas de la LPA, como la presencia de mutaciones FLT3, anomalías cromosómicas secundarias, isoforma BCR3, y expresión de CD56, no son recomendables en vista de los datos actualmente disponibles.

2.5.2 Evaluación de la respuesta a la inducción

Los resultados de los exámenes morfológicos, citogenéticos y moleculares deben ser cuidadosamente evaluados al final de la inducción. Es importante destacar que no cabe esperar resistencia leucémica en pacientes con LPA tratados con regímenes de inducción estándar. Los rasgos morfológicos en los AMO realizados precozmente durante el tratamiento de inducción pueden llevar a etiquetar erróneamente como resistencia a algunos pacientes que muestran una maduración retardada y/o una persistencia de promielocitos atípicos. Estos hallazgos, que ocasionalmente se detectan hasta diversas semanas después de comenzado el tratamiento (hasta 40-50 días), no deberán llevar de ningún modo a realizar cambios terapéuticos. De la misma forma, la detección de la t(15;17) por FISH, incluso varias semanas después de iniciar la inducción, no debe ser interpretada como resistencia leucémica. El tratamiento con ATRA deberá ser continuado hasta la diferenciación terminal de los blastos y alcanzar RC, que invariablemente ocurre en todos los pacientes con LPA genéticamente probada que sobreviven a una inducción basada en ATRA. En un estudio del grupo PETHEMA analizando 739 pacientes que recibieron inducción con ATRA e idarubicina, seis de los siete pacientes que fueron considerados como resistencia fueron evaluados para la respuesta mucho antes de lo recomendado (es decir, aún en fase de aplasia y entre los días 18 y 33 post-quimioterapia).⁴⁸ En caso de dudas sobre la respuesta, por ejemplo por persistencia de blastos o promielocitos atípicos más allá de 35 días post-inducción, se recomienda prolongar el tratamiento con ATRA durante 2 o 3 semanas adicionales y repetir la evaluación de médula ósea pasado ese tiempo.

Por otra parte, la evaluación del estado molecular en MO mediante RT-PCR al finalizar la inducción no parece tener utilidad, puesto que aproximadamente el 50% de los pacientes con LPA que alcancen RC al finalizar la inducción estándar mostrarán positividad para PML/RARA, sin que esto tenga, aparentemente, ningún significado pronóstico. En contraste, la determinación del estado molecular en MO mediante RT-PCR al finalizar la consolidación y durante el seguimiento de la enfermedad sí que será relevante para predecir el riesgo de recaída del paciente.

2.5.3 Tratamiento post-remisión

La LPA es el subtipo de LMA en el que el beneficio de la fase de consolidación ha sido mejor evaluado debido a la posibilidad de medición sensible por PCR de la cantidad de enfermedad residual en prácticamente todos los pacientes. Sin embargo, a diferencia de la fase de inducción, el tipo y la intensidad de la terapia de son más controvertidos. Varios estudios han puesto de manifiesto el beneficio de la quimioterapia de consolidación en la LPA, demostrando el logro de la remisión molecular en más del 90% de los pacientes tras la administración de dos o tres ciclos intensivos tras la obtención de la RC. Junto al pronóstico favorable a largo plazo, estas observaciones indican que opciones post-remisión más agresivas, tales como el TPH no son necesarias para consolidar la respuesta y tener curaciones definitivas a largo plazo. Solo la pequeña fracción de pacientes con enfermedad molecular persistente (PCR-positivos) tras el fin de la fase de consolidación se consideran candidatos para tratamientos adicionales más intensivos, incluyendo el TPH.

Una vez que se estableció que la combinación de ATRA y quimioterapia (citarabina y/o antraciclinas) concomitantes representaba la mejor opción disponible para la inducción, entre otras razones porque esto reducía la tasa de recaídas, diversos estudios evaluaron que esquemas de consolidación incluyendo estos agentes podían ser óptimos para mejorar los resultados a largo plazo.

2.5.3.1 Papel del ATRA en consolidación

El beneficio de la adición de ATRA a la quimioterapia de consolidación aún no ha sido demostrado en estudios aleatorizados. Sin embargo, estudios comparativos de cohortes consecutivas diseñados simultáneamente por los grupos GIMEMA⁴⁹ y PETHEMA⁵⁰ han mostrado una reducción del riesgo de recaída estadísticamente significativa cuando el ATRA se añadió en consolidación (45 mg/m²/d x 15 días en adultos; 25 mg/m²/d x 15 días en niños).

2.5.3.2 Papel de la citarabina en consolidación

Desde que se reportó el primer tratamiento eficaz con daunorubicina en monoterapia hasta la actualidad, el papel de la citarabina en la LPA es controvertido. Ningún estudio realizado en la era pre-ATRA, incluyendo uno aleatorizado,⁵¹ mostró beneficios de la adición de citarabina a las antraciclinas comparado con la administración de altas dosis de antraciclinas en monoterapia. Con la incorporación del ATRA al arsenal terapéutico, el debate sigue abierto. Un estudio aleatorizado publicado por el European APL group demostró un mayor riesgo de recaída cuando la citarabina se omitió en inducción y consolidación.⁴⁵ Los resultados de este interesante estudio, sin embargo, deben ser interpretados con cautela. De hecho, en este estudio, la eficacia de la rama con daunorubicina en monoterapia podría estar comprometida por las relativamente bajas dosis acumuladas del fármaco (495 mg/m²). Un reciente análisis conjunto de los grupos PETHEMA y European APL,⁵² demostró una reducción significativa en la incidencia acumulada de recaída en los pacientes menores de 65 años con menos de $10 \times 10^9/L$ leucocitos en SP al diagnóstico tratados con antraciclinas en monoterapia (protocolo PETHEMA LPA99), comparado con aquellos tratados con citarabina y antraciclinas (protocolo European APL 2000). Sin embargo, en este mismo estudio, se observó una tendencia hacia una mayor tasa de recaídas en los pacientes menores de 65 años con leucocitos $> 10 \times 10^9/L$ tratados con antraciclinas en monoterapia. Una posible explicación de estos resultados podría ser la diferente dosis de antraciclinas usada por ambos grupos: idarubicina (dosis acumuladas de 80-100 mg/m²) y mitoxantrone (50 mg/m²) en el protocolo PETHEMA LPA99, frente a daunorubicina (495 mg/m²) en el European APL2000. En contraste, un análisis conjunto de los grupos PETHEMA y GIMEMA usando dosis idénticas de antraciclinas, no demostró ningún beneficio de la adición de varios agentes, incluyendo citarabina, en el protocolo GIMEMA.⁵³ De la misma forma, los resultados del ensayo aleatorizado MRC15 no parecen indicar beneficio de la adición de citarabina.⁴⁶ Sin embargo, en línea con los resultados del estudio conjunto de los grupos PETHEMA y European APL, los resultados de los protocolos GIMEMA AIDA 2000⁵¹ y PETHEMA LPA 2005,⁵⁴ sugieren una disminución significativa del riesgo de recaída añadiendo citarabina a la consolidación con antraciclinas y ATRA en los pacientes menores de 60 años de alto riesgo (leucocitos en sangre periférica [SP] $>10 \times 10^9/L$ al diagnóstico). Según estos estudios, la tasa de recaídas a los 2 años en pacientes de alto riesgo podría situarse en torno al 10%, lo que supone una mejoría significativa respecto al 25% observado en los protocolos previos, sin citarabina, de estos grupos cooperativos. Sin embargo, estos estudios aún requieren un mayor seguimiento de los pacientes

para evaluar su eficacia a largo plazo, y no han demostrado un beneficio en cuanto a supervivencia global.

2.5.3.3 Papel del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)

El lugar del TPH en primera línea en pacientes con LPA ha cambiado dramáticamente desde la introducción del ATRA. Debido a la alta tasa de curaciones y excelente tolerabilidad de los regímenes actuales basados en ATRA y antraciclinas, el papel del TPH en primera línea ha quedado reducido a los pocos pacientes que presentan persistencia molecular al final de la consolidación.⁵⁵ En estos pacientes, una vez alcanzada de nuevo la remisión molecular (con ATO, por ejemplo), se puede realizar un TPH autólogo como consolidación. Aunque buenos resultados han sido obtenidos con esta estrategia,^{56,57} el papel del TPH en esta situación sigue siendo controvertido, puesto que también pueden alcanzarse remisiones de larga duración usando ATO combinado o no con quimioterapia o gentuzumab ozogamizina.

2.5.3.4 Evaluación de la respuesta molecular post-consolidación

En contraste con la determinación del estado molecular en MO mediante RT-PCR de PML/RARA al finalizar la inducción, la evaluación molecular al finalizar el último ciclo de consolidación será determinante para establecer el pronóstico de la enfermedad.^{58,59} La obtención de la remisión molecular al final de la consolidación es clave, siendo el objetivo en la evaluación final de la respuesta en pacientes con LPA según las recomendaciones del International Working Group para la estandarización de los criterios de la respuesta en la LMA.⁶⁰ Estas recomendaciones, sin embargo, solo son evidentes en el contexto de una monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR) usando PCR cuantitativa convencional, o de baja sensibilidad, que puede detectar 1 célula leucémica entre células normales en MO. La monitorización de EMR mediante PCR cuantitativa (RQ-PCR) es más sensible que la técnica cuantitativa y tiene otras ventajas.⁶¹ En concreto, es menos susceptible de contaminarse y producir falsos positivos, y permite una estrecha monitorización de la dinámica de la EMR. En cualquier caso, en aquellos pacientes en los que se detectara una PCR positiva, se recomienda repetir la técnica al cabo de 2 semanas y, además, enviar la muestra de MO para confirmación por un laboratorio de referencia. Se acepta que los pacientes que, una vez finalizado el último ciclo de consolidación, presenten en cualquier

momento al menos 2 muestras positivas para PML/RARA por RT-PCR de baja sensibilidad, recaerán a nivel hematológico si no reciben tratamiento adicional.⁵⁵

2.5.4 Consolidación adaptada al riesgo

El objetivo de estos protocolos “a medida” es administrar el mínimo tratamiento posible a los pacientes de bajo riesgo de recaída, manteniendo al mismo tiempo altas tasas de curación, y ser más agresivos en aquellos pacientes con LPA de mal pronóstico, en los que el riesgo de recaída supera con creces al riesgo de complicaciones tóxicas derivadas de la intensificación del tratamiento.

Una vez alcanzada la remisión hematológica, varios parámetros clínicos y biológicos identificados a la presentación del paciente pueden tener un impacto en el riesgo de recaída. Se trata de los recuentos de glóbulos blancos, el tipo de transcrito del gen de fusión PML/RARA, y probablemente la expresión de CD56. Estos factores pronósticos se han identificado a través de estudios retrospectivos y no se han utilizado generalmente para adaptar la intensidad de la terapia post-remisión. Un estudio conjunto de los grupos PETHEMA y GIMEMA sugirió un simple modelo para la predicción de la recaída basado en el recuento inicial de glóbulos blancos y plaquetas.⁵³ Según estos parámetros, se identificaron tres grupos de riesgo de recaída: «riesgo bajo», con glóbulos blancos y plaquetas $\leq 10 \times 10^9/L$ y $> 40 \times 10^9/L$ respectivamente; «riesgo intermedio o estándar», con glóbulos blancos y plaquetas $\leq 10 \times 10^9/L$ e $\leq 40 \times 10^9/L$, respectivamente; y «riesgo alto», definido por una cifra glóbulos blancos $> 10 \times 10^9/L$, independientemente del recuento de plaquetas. La supervivencia libre de recaída molecular fue 100%, 90% y 70% en los tres grupos, respectivamente. Basado en estas observaciones, los grupos cooperativos GIMEMA y PETHEMA decidieron incorporar este modelo predictivo en el diseño de sus protocolos terapéuticos, adoptando una estrategia de tratamiento adaptado al riesgo. Esto significaba aplicar diferentes intensidades de quimioterapia durante la consolidación según el riesgo de recaída de cada paciente de acuerdo a ese modelo, así como la incorporación de ATRA en esta fase de tratamiento. Un análisis preliminar ya mostró resultados positivos aplicando esa estrategia.⁴⁰ Así, además de confirmar una elevada eficacia antileucémica y una baja toxicidad y alto grado de cumplimiento, éste primer análisis ya mostró que una estrategia de consolidación adaptada al riesgo, basada en la adición de ATRA y el refuerzo de la dosis de antraciclina en los pacientes de riesgo intermedio y alto, disminuyó la tasa de recidiva mejorando los resultados globales en la LPA.

En general, se asume que los pacientes ancianos son más vulnerables a los efectos tóxicos de la quimioterapia, por lo que se tiende a diseñar protocolos que contengan menos dosis de quimioterapia para este subgrupo. Incluso con esquemas terapéuticos que han demostrado ser relativamente poco tóxicos y bien tolerados, como los PETHEMA LPA, la mortalidad en RC en pacientes mayores de 70 años sigue siendo muy elevada (19%) comparada con pacientes menores de 60 años (1%).⁶² En consecuencia, los nuevos protocolos terapéuticos deben ir encaminados a disminuir la toxicidad en este grupo de edad tan sensible, manteniendo al mismo tiempo la eficacia antileucémica.

2.5.5 Tratamiento de mantenimiento

La administración sistemática de un tratamiento de mantenimiento prolongado una vez alcanzada la remisión molecular post-consolidación es aún motivo de controversia, a pesar de que dos estudios aleatorizados han demostrado una reducción de las tasas de recaída en pacientes que recibieron mantenimiento basado en ATRA.^{39,63} Puesto que el estado molecular post-consolidación no fue testado en ninguno de estos estudios, es probable que al menos una proporción de pacientes con persistencia molecular al final de la consolidación se hubieran beneficiado especialmente del mantenimiento. Dos estudios aleatorizados posteriores realizados en pacientes que alcanzaron una remisión molecular al finalizar la consolidación no han demostrado beneficios del mantenimiento.^{64,65} El estudio japonés, usando seis ciclos de mantenimiento consistente en quimioterapia sin ATRA, mostró un aumento de la mortalidad en los pacientes que recibieron mantenimiento. Estos datos contradictorios sobre la conveniencia del mantenimiento indican que la eficacia de éste dependerá del régimen de inducción y consolidación previamente administrado.

A pesar de la incertidumbre sobre los beneficios del mantenimiento, es un hecho que una proporción de pacientes con PCR negativa post-consolidación acabarán recayendo, especialmente aquellos con alto riesgo de recaída al diagnóstico (leucocitos > 10 x 10⁹/L). Algunos estudios han demostrado que una estrecha monitorización de la EMR mediante PCR cuantitativa puede predecir la recaída clínica, ofreciendo una posibilidad para establecer estrategias de tratamiento preventivo basados en esta técnica.^{66,67}

2.6 Caracterización clínica y biológica de la LPA

2.6.1 Confirmación del diagnóstico genético

Aunque sea siempre necesario confirmar el diagnóstico de LPA al nivel genético y/o molecular, no hay que esperar a los resultados de estas técnicas para instaurar la terapia diferenciadora con ATRA y las medidas de soporte oportunas. En la mayoría de los nuevos casos se tendrá una alta sospecha de LPA mediante la observación de la morfología de los blastos leucémicos. También será aconsejable iniciar el tratamiento con ATRA en aquellos casos con blastos de morfología atípica pero que por citometría tengan características de leucemia mieloide granulocítica madura (antígenos HLA-DR y CD34 negativos), sobre todo en presencia de coagulopatía de consumo. El tratamiento con ATRA se mantendría hasta que se confirmase o se descartase el diagnóstico genético de LPA.

Puesto que la eficacia de la terapia con agentes diferenciadores (ATO o ATRA y sus derivados) está ligada a la presencia del gen de fusión PML/RARA en las células leucémicas, la confirmación genética de esta lesión específica es necesaria en todos los casos. El diagnóstico citomorfológico de LPA hipergranular (LMA M3 típica) es altamente predictivo de la presencia del reordenamiento PML/RARA, pero el análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo multiparamétrica puede aumentar la precisión del diagnóstico.^{68,69} La citometría de flujo puede ser especialmente útil en pacientes que muestren blastos con morfología atípica (LMA M3 variante o microgranular, que representa el 15-20% de LPA). En estos casos, la citometría ayudará sobre todo a distinguir los casos de LPA de los casos de LMA con diferenciación monocítica (LMA M4 o LMA M5), que en ocasiones pueden adoptar una morfología similar a la LPA M3 variante (núcleo en hachazo, citoplasma amplio con basofilia y microgranulación). Hay que tener en cuenta que casos de pacientes con rasgos citomorfológicos y/o inmunofenotípicos sugestivos de LPA sin reordenamiento PML/RARA, y viceversa, han sido descritos en la literatura.^{70,71,72}

2.6.2 Pruebas diagnósticas y procesamiento de las muestras

- En todos los pacientes debe realizarse un aspirado de médula ósea (AMO), con biopsia ósea solo en caso de que el aspirado sea seco (punctio sicca). La realización de una extensión de SP también será imprescindible, aunque no es infrecuente que no se observen células blásticas en SP.

- Para el estudio citomorfológico se utilizarán tinciones de Wright, Wright-Giemsa o May-Grunwald Giemsa, complementadas con mieloperoxidasa y negro sudán B. El inmunofenotipaje mediante citometría de flujo multiparamétrico aumenta la precisión diagnóstica (aunque no será nunca prueba de diagnóstico genético definitivo de LPA PML/RARA positiva). El patrón inmunofenotípico habitual de los blastos de la LPA PML/RARA positiva muestra características similares a los promielocitos normales (CD34^{-/+} heterogéneo, CD117^{-/+} dim, HLADR^{-/+} dim, CD13^{+/>+}, CD11b⁻). Sin embargo, al contrario que los promielocitos no patológicos, los blastos de LPA muestran niveles de expresión baja de CD15 (CD15^{-/+} dim vs. CD15^{+/>+}). Los blastos de la LPA microgranular o variante (M3v), con frecuencia muestran coexpresión de marcadores de línea T (como CD2, CD7 o CD56), a la vez que suelen expresar CD34 y HLADR.^{73,74,75}
- La confirmación del diagnóstico genético es necesaria, y debe realizarse, si es posible, en células leucémicas de MO. La identificación de la lesión genética puede realizarse a nivel cromosómico, del DNA, del RNA, o proteínico, mediante cariotipo convencional, fluorescencia por hibridación in situ (FISH), reacción en cadena de polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR), o anticuerpo monoclonal anti-PML. Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y desventajas que describimos a continuación:
 - El cariotipo convencional, se realizará mediante tinción de bandas G en metafases obtenidas en células de MO cultivadas de 24 a 48 horas. Aunque la citogenética convencional es altamente específica para el diagnóstico de LPA, al detectar la alteración t(15;17)(q21;q22), es una técnica relativamente costosa en medios y tiempo, y necesita la presencia de metafases de calidad para su correcta interpretación. Un inconveniente de la citogenética convencional es su relativamente baja sensibilidad. De hecho, en aproximadamente un 20-30% de los casos de LPA no se obtendrán mitosis suficientes, y la técnica no será valorable. Otra causa de falsos negativos, en los que no se detecte la t(15;17), será la presencia de reordenamientos crípticos del gen de fusión PML/RARA, lo que ocurre en un 5-10% de los casos. Por otra parte, la presencia de anomalías citogenéticas adicionales, que se encuentran en aproximadamente un 20-30% de los casos, no parece tener significado pronóstico independiente en la LPA.⁷⁶ Sin embargo, la citogenética puede ser útil para detectar aquellos casos raros de LPA PML/RARA negativas,

como la LPA con t(11;17)(q23;q21), t(11;17)(q13;q21) y t(5;17)(q35;q21), con sus correspondientes contrapartidas moleculares PLZF-RARA,⁷⁷ NuMA-RARA⁷⁸ y NPM1-RARA,⁷⁹ respectivamente.

- La detección del gen de fusión PML/RARA mediante FISH puede realizarse mediante métodos estandarizados y sondas fluorescentes disponibles comercialmente. Aunque la SP puede ser óptima para realizar la FISH (sobre todo en casos de hiperleucocitosis), la muestra idónea es la MO. El protocolo para la detección del PML/RARA por FISH ha sido publicado en detalle por Grimwade et al.⁸⁰ Este método es mucho más sensible, menos caro, y más rápido que el cariotipo convencional, por lo que debe incluirse de rutina entre las pruebas de diagnóstico genético de la LPA.
- El análisis del gen PML/RARA mediante RT-PCR se realizará a partir de RNA extraído de muestras de MO, aunque el reordenamiento también se podrá detectar en muestras de SP, incluso en pacientes con leucopenia al diagnóstico. La técnica de RT-PCR estandarizada para la detección del gen de fusión PML/RARA fue establecida por el "Biomed-1 Concerted Action".⁸¹ La RT-PCR es probablemente la técnica de elección (gold standard) para la confirmación genética de LPA. Además de su alta sensibilidad y especificidad, la RT-PCR es esencial para determinar el punto de ruptura del gen PML (isoforma PML/RARA), que será esencial para la monitorización de EMR. Sin embargo, la posibilidad de falsos negativos (por pobre extracción de RNA), o de falsos positivos (por artefactos), así como el tiempo requerido para la obtención de los resultados (~2 días), son factores limitantes de esta técnica. En consecuencia, para asegurar el correcto diagnóstico de LPA siempre se deberá recurrir a la realización de varias técnicas de diagnóstico genético al mismo tiempo.
- La inmunotinción con anticuerpos monoclonales anti-PML de extensiones (no teñidas y secas) de SP o MO puede ser de gran ayuda para el rápido diagnóstico de LPA (siempre y cuando existan blastos en la muestra). Esta técnica es altamente específica para la detección de la proteína de fusión PML/RARA.⁸² La técnica será diagnóstica de LPA cuando se observe en el microscopio por fluorescencia un patrón micromoteado (>30 motas) en el núcleo de las células leucémicas. La técnica se

considerará negativa cuando se detecten menos de 30 motas (normalmente entre 10 y 15 motas gruesas), llamados cuerpos nucleares PML. Esto ocurrirá en las células normales y en aquellos raros casos de LPA PLZF-RARA y NPM1-RARA. La técnica puede realizarse mediante inmunohistoquímica o mediante inmunofluorescencia, pudiéndose obtener los resultados a las 4 horas de la extracción de la muestra. Esta técnica es altamente recomendable para la rápida identificación de casos potenciales de LPA con morfología atípica, que se beneficiarían inmediatamente de terapia molecular dirigida con ATRA.

- Recomendaciones específicas para el correcto almacenamiento de las muestras han sido publicadas por Cheson et al.⁶⁰ El laboratorio que asuma la responsabilidad del procesamiento y almacenamiento de muestras diagnósticas (así como de monitorización de EMR), deberá recibir las muestras de la siguiente forma:
 - Para estudios de FISH o inmunotinción por anti-PML: 3-4 extensiones de MO y 3-4 de SP al diagnóstico. Enviar a temperatura ambiente. Aquellas extensiones que no se utilicen inmediatamente se deberán cubrir con papel de aluminio y congelar a – 20 °C.
 - Para extracción de RNA y análisis RT-PCR del PML/RARA: un tubo de AMO (2-3 ml) y varios de SP (20-30 ml), en citrato sódico o EDTA. Deberán procesarse en las siguientes 24 horas a la extracción. Las células mononucleares aisladas mediante guanidino de isotiocianato se almacenarán – 20 °C.
 - Para análisis de cariotipo convencional o FISH: un tubo de AMO (1-2 ml) en heparina, enviado a temperatura ambiente. Las muestras se procesarán nada más llegar al laboratorio, y los pellets nucleares fijados con metanol y ácido acético (proporción 3:1) se almacenarán a – 20 °C.
- Otros estudios genéticos de interés. Las mutaciones del gen *fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3) son detectadas con mayor frecuencia en la LPA que en otros tipos de LMA. Así, estas mutaciones podrán observarse en aproximadamente un 30% de los casos (25% con mutación FLT3-ITD, *internal tandem duplication*, 5% con mutación puntual FLT3-D835). Sin embargo, aunque las mutaciones de FLT3 se asocian a un mayor recuento de leucocitos en SP al diagnóstico, no parecen aportar información pronóstica adicional, por lo que su presencia no debería implicar cambios en el manejo del paciente.

2.7 Tratamiento de soporte para la LPA

Es importante la prevención y el manejo de las complicaciones que pueden aparecer, ya sean originadas por el tratamiento o por la misma LPA, como puede ser la toxicidad de la quimioterapia, la coagulopatía o el síndrome de diferenciación. Este último se caracteriza por la aparición de signos y síntomas específicos derivados, la mayoría de las veces, del tratamiento con ATRA o ATO, tales como fiebre, ganancia de peso, hipotensión, disnea con infiltrados pulmonares, derrame pericárdico, edema pleural y/o periférico o insuficiencia renal aguda.

2.7.1 Inicio inmediato de tratamiento con ATRA

El tratamiento con ATRA debe iniciarse ante la sospecha de LPA, sin esperar a la confirmación del diagnóstico genético. Aunque no hay estudios que evidencien el beneficio clínico del inicio precoz de ATRA, parece razonable iniciar la terapia diferenciadora sin esperar al diagnóstico definitivo por dos motivos: 1) si no se confirmara el diagnóstico de LPA, la administración de ATRA no supondría ningún efecto negativo en pacientes con LMA, 2) estudios biológicos y clínicos han demostrado que el inicio de ATRA corrige la actividad de la coagulopatía y puede conducir a una disminución de la mortalidad precoz por hemorragias.⁸³ Aunque el inicio de la quimioterapia en los protocolos actuales suele retrasarse hasta la confirmación diagnóstica de LPA, en aquellos paciente con LPA y leucocitosis en SP la administración de agentes citorreductores (antraciclinas, por ejemplo) no deberá demorarse, ya que de lo contrario existirá un mayor riesgo de desarrollar síndrome de diferenciación grave potencialmente letal.

2.7.2 Inicio inmediato de medidas para corregir la coagulopatía

Las hemorragias intracraneales y/o pulmonares son complicaciones potencialmente letales relativamente frecuentes en pacientes con LPA, al menos mientras la característica coagulopatía de consumo presente actividad. Estas complicaciones son, no solo la causa principal de mortalidad durante el tratamiento de inducción, si no también la causa más frecuente de mortalidad previa al inicio del tratamiento e incluso previa al diagnóstico. De hecho, estudios que analicen la tasa de mortalidad por LPA previa al inicio de la inducción son muy escasos en la literatura científica. Además, las grandes series publicadas generalmente no ofrecen información sobre los pacientes no elegibles para recibir la inducción, ya sea por su

mala condición física y/o comorbilidades, ya sea por que fallecen antes de poder iniciar el tratamiento. El US Intergroup⁶³ y el grupo cooperativo PETHEMA⁴⁸ han descrito alrededor de un 5% de pacientes no elegibles por su mala condición clínica (ECOG mayor de 3), sobre todo debido a hemorragias letales antes de iniciar la terapia. En este contexto, parece razonable iniciar inmediatamente el tratamiento de soporte para contrarrestar la coagulopatía y mejorar la función hemostática nada más conocerse o sospecharse el diagnóstico de LPA. Se recomienda la reposición de factores hemostáticos mediante transfusiones de plaquetas, plasma fresco congelado, y fibrinógeno o crioprecipitado para mantener recuentos de plaquetas $>30 - 50 \times 10^9/L$ y de fibrinógeno $>100-150$ mg/dL. Mientras exista coagulopatía deberán monitorizarse a diario los parámetros hemostáticos en sangre, así como corregir las alteraciones mediante transfusiones.

A pesar de un soporte transfusional intensivo, algunos pacientes seguirán falleciendo debido a complicaciones hemorrágicas derivadas de la coagulopatía asociada a la LPA. Se han identificado algunos factores de riesgo que predicen la probabilidad de muerte hemorrágica: pacientes con síndrome hemorrágico, hipofibrinogenemia (<100 mg/dL), elevación de D-dímeros o productos de degradación de la fibrina combinados con tiempo de protrombina o tiempo de protrombina parcial activada prolongados, recuentos elevados de leucocitos o blastos en SP, insuficiencia renal, síndrome de diferenciación, y mal estado general.^{48,83,84} La identificación de estos factores de riesgo puede ser útil para el diseño de futuros estudios que investiguen el tratamiento de soporte antihemorrágico adaptado al riesgo, usando factores procoagulantes más eficaces en aquellos pacientes con elevado riesgo de muerte hemorrágica. Debido al alto riesgo hemorrágico, la realización de procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasivos, como la implantación de un catéter venoso central, la punción lumbar, o la broncoscopia, debe evitarse durante el periodo de inducción. Por otra parte, la coagulopatía asociada a la LPA activa también se acompaña de un aumento del riesgo de eventos trombóticos e isquémicos. Aunque los datos son muy escasos, la incidencia de trombosis al diagnóstico y durante la inducción podría situarse en torno al 5%.^{85,86} Este riesgo trombótico podría verse exacerbado por el uso de agentes diferenciadores, como el ATRA, especialmente en aquellos pacientes que desarrollen síndrome de diferenciación. El beneficio del uso de heparinas u otros agentes con actividad anticoagulante para corregir la coagulopatía de consumo no ha sido establecido, y, debido al riesgo hemorrágico que conllevan, deberían reservarse al tratamiento de eventos trombóticos en pacientes con LPA siempre que la coagulopatía y la trombopenia estén controladas. El uso profiláctico de

ácido tranexámico u otros antifibrinolíticos para disminuir la incidencia de hemorragias letales se ha mostrado ineficaz,⁴⁸ e incluso podría producir un aumento de eventos trombóticos.⁸⁶ En consecuencia, el uso de heparinas y antifibrinolíticos debería reservarse en el contexto de ensayos clínicos comparativos.

2.7.3 Prevención y manejo del síndrome de diferenciación

El médico que trata al paciente con LPA debe reconocer inmediatamente los signos y síntomas del síndrome de diferenciación con el fin de iniciar precozmente el tratamiento de esta complicación potencialmente letal. El diagnóstico de este síndrome es predominantemente clínico, y se basará en la presencia de al menos dos de los siguientes signos y síntomas no explicados por otra patología subyacente: disnea, fiebre, infiltrados pulmonares intersticioalveolares bilaterales, ganancia de peso (generalmente acompañada de edemas periféricos), hipotensión, fracaso renal agudo (con o sin oliguria), y derrame pleural y/o pericárdico.⁸⁷ Debido a la gravedad del síndrome de diferenciación florido, será esencial iniciar tratamiento con dexametasona intravenosa (10 mg cada 12 horas) ante la mínima sospecha diagnóstica del síndrome. El inicio precoz de dexametasona ante la sospecha de síndrome es muy recomendable, puesto que ninguno de los signos y síntomas arriba descritos es patognomónico, pudiendo ser causados por otras condiciones patológicas, a veces concomitantes, como sepsis bacteriana, neumonía, insuficiencia cardíaca, o hemorragia pulmonar. De hecho, al iniciar tratamiento para el síndrome de diferenciación, muchas veces será necesario cubrir al mismo tiempo otras posibles causas de los signos y síntomas atribuidos al síndrome. La interrupción del ATRA o ATO solo se recomienda en caso de síndrome de diferenciación grave (por ejemplo, en pacientes con fracaso renal agudo o insuficiencia respiratoria que requiera ventilación mecánica). En general, el agente diferenciador no deberá ser suspendido, a no ser que haya progresión del síndrome a pesar del tratamiento con corticoides. En caso de respuesta favorable, la dexametasona intravenosa deberá mantenerse hasta la completa resolución del síndrome, pudiéndose entonces reiniciar el tratamiento con ATRA o ATO si se hubiera suspendido.

2.7.4 Otras medidas de soporte específicas

A parte de las medidas de soporte específicas arriba mencionadas, el tratamiento general de soporte durante la inducción en pacientes con LPA, incluyendo uso de antibióticos, prevención del síndrome de lisis tumoral, y transfusión de concentrados de hematíes, no será diferente del aplicado en pacientes con otros tipos

de LMA. El uso de factores estimulantes de crecimiento de colonias granulocíticas deberá hacerse de forma juiciosa, reservándose para aquellos pacientes con neutropenia e infecciones severas. La leucoaféresis no está recomendada en casos de hiperleucocitosis, puesto que podría exacerbar la coagulopatía, siendo preferible el inicio precoz de ATRA combinado con quimioterapia y profilaxis del síndrome de diferenciación con dexametasona.

2.8 Justificación de la unidad temática del proyecto

La presente tesis doctoral recoge los resultados de 3 estudios publicados en 2 revistas internacionales de alto impacto especializadas en hematología. Todos ellos comparten un nexo común; el análisis de diferentes aspectos de una serie de pacientes tratados con dos protocolos consecutivos del grupo cooperativo Español PETHEMA (LPA96 y LPA99) para el tratamiento de la LPA. Estos trabajos prestan especialmente atención al impacto de un esquema terapéutico adaptado al riesgo (comparación del protocolo LPA99 frente al LPA96, no adaptado al riesgo), o bien intentan identificar nuevos factores de riesgo que permitan refinar la adaptación del tratamiento a estos potenciales factores (análisis del síndrome de diferenciación en inducción y sus factores de riesgo; y análisis del impacto de las mutaciones de FLT3 sobre el riesgo de recaída). Las tres publicaciones se centran en las diferentes fases del tratamiento de la enfermedad sobre las que se puede incidir para mejorar los resultados terapéuticos.

El primer trabajo evalúa los resultados a largo plazo del protocolo terapéutico LPA99, el primero con consolidaciones adaptadas al riesgo de recaída según el índice pronóstico desarrollado conjuntamente en el año 2000 por los grupos PETHEMA y GIMEMA. Este trabajo ofreció unos resultados robustos sobre el impacto positivo de las modificaciones realizadas en la intensidad de la dosificación de las antraciclinas y del ATRA en aquellos pacientes con LPA de riesgo intermedio y alto de recaída. Éste sirvió de base para los siguientes protocolos de tratamiento de la LPA del grupo PETHEMA (protocolos LPA2005 y LPA2012, este último aún en marcha).

El segundo trabajo se centró en el análisis detallado de una complicación propia del tratamiento de inducción con agentes diferenciadores en la LPA: el síndrome de diferenciación. Este síndrome estaba descrito desde los primeros protocolos con ATRA en los años 90, y constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en la fase de inducción a la remisión de la LPA. Este estudio se planteó identificar los factores de riesgo para el desarrollo de este síndrome, con el fin de

adaptar la profilaxis y el manejo del mismo según el riesgo de presentar formas graves del síndrome. Gracias a este trabajo, la prevención del síndrome de diferenciación se implementó de forma adaptada al riesgo en los siguientes protocolos PETHEMA.

El tercer trabajo quiso analizar el impacto pronóstico de un marcador molecular presente en la LMA y en la LPA, las mutaciones de FLT3, cuyo valor para predecir la recaída leucémica estaba firmemente establecido en la LMA. Existiendo controversia sobre el valor pronóstico independiente de FLT3 en la LPA, y por tanto de su posible incorporación a estrategias terapéuticas adaptadas al riesgo, desde el grupo PETHEMA se realizó este estudio de marcado carácter traslacional con la colaboración de prestigiosos biólogos moleculares. Los resultados de dicho estudio ayudaron a conocer mejor la incidencia y las características clínicas y biológicas asociadas a la expresión de FLT3, y sirvieron para tomar la decisión de no realizar modificaciones en los algoritmos terapéuticos basados en la presencia de ese marcador.

El ámbito elegido, la LPA, tiene un especial interés en la medida en que, como se ha comentado previamente, los pacientes con este subtipo de leucemia aguda presentan un pronóstico favorable desde el advenimiento de los agentes diferenciadores, siendo la tasa de supervivencia a largo plazo cercana al 90% con esquemas que combinen ATRA y quimioterapia. Por eso, los pacientes con LPA tienen un alto potencial de curabilidad y resulta crítico el tratamiento optimizado en cualquiera de sus fases: 1) en la fase de inducción a la remisión, donde es vital el correcto tratamiento de soporte identificando y tratando precozmente las complicaciones como el síndrome de diferenciación, y 2) en la fase de consolidación, en la que la administración selectiva de esquemas quimioterápicos según la posibilidad de recaída (adaptados al riesgo) puede ayudar a disminuir la intensidad de dosis en los pacientes de bajo riesgo, previniendo muertes tóxicas en RC, o por el contrario, aumentar la intensidad en los pacientes de alto riesgo que necesiten mayor efecto antileucémico para erradicar definitivamente la LPA. La presente tesis puede contribuir a profundizar en el conocimiento de estos aspectos en la LPA.

Cada uno de estos trabajos aporta información detallada y autónoma sobre un aspecto concreto del tratamiento de la LPA, pero su unión en esta tesis permite una visión global de la importancia de las estrategias adaptadas al riesgo en la LPA.

3 HIPÓTESIS

El tratamiento actual de la leucemia promielocítica con la combinación de ácido *trans*-retinóico y quimioterapia proporciona una tasa muy elevada de curaciones. No obstante, aunque estrecho, hay un margen de mejora mediante la reducción de cada una de las diferentes causas de fracaso terapéutico. Dada la heterogeneidad de estas causas de fracaso, planteamos la hipótesis de que un análisis de dichas causas y la identificación de las variables ligadas al paciente, a su enfermedad y al propio tratamiento, podrían ser de ayuda en la implementación de las medidas apropiadas para mejorar dichos resultados.

La LPA es una enfermedad hematológica con una alta tasa de curación. No obstante, los resultados siempre son mejorables, y es crítico ofrecer las máximas posibilidades a cada paciente con LPA, a sabiendas de que disponen de agentes dirigidos a dianas moleculares (targeted therapy), como el ATRA, que hacen que una vez superadas las fases terapéuticas de inducción y consolidación estos pacientes en gran parte puedan considerarse curados a largo plazo. La identificación de características propias de los pacientes o de su enfermedad, podría ayudar a diseñar esquemas de tratamiento cada vez más adaptados, sin que se por ello observara una disminución de la eficacia terapéutica. El análisis pormenorizado, a corto y a largo plazo, de las diferentes complicaciones y de los resultados de los esquemas quimioterápicos en sus diferentes fases, deberían ayudar a refinar el manejo de las complicaciones y optimizar los futuros protocolos con el fin de ofrecer una menor toxicidad, pero al mismo tiempo manteniendo una incidencia de recaída similar con respecto a los anteriores.

4 OBJETIVOS

Partiendo de la hipótesis de que determinadas variables ligadas al paciente, a su enfermedad y al propio procedimiento, podrían tener un impacto en los resultados terapéuticos de la LPA, y que muchas son potencialmente modulables a través de estrategias adaptadas al riesgo, los objetivos de este trabajo de tesis doctoral son:

- Evaluar y comparar los resultados terapéuticos a largo plazo del protocolo LPA99 (adaptado al riesgo de recaída) frente al protocolo LPA96 (no adaptado al riesgo), ambos consistentes en esquemas basados en ATRA más quimioterapia según:
 - Tasa de RC.
 - Incidencia de recaída.
 - Supervivencia libre de enfermedad.
 - Supervivencia global.
- Evaluar la incidencia del síndrome de diferenciación en la fase de inducción en los pacientes tratados con los protocolos LPA96 y LPA99, y a su vez:
 - Describir las características del síndrome de diferenciación.
 - Identificar los factores pronósticos para el desarrollo de esta complicación a través de los análisis univariante y multivariante.
 - Evaluar el impacto en los resultados terapéuticos en los pacientes que lo desarrollaron.
- Evaluar el impacto de un potencial marcador pronóstico, las mutaciones de FLT3, en los pacientes tratados con los protocolos LPA96 y LPA99, y a su vez analizar las correlaciones clínicas y biológicas de la presencia de estas mutaciones en los pacientes con LPA.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Pacientes

A continuación se detallan los aspectos metodológicos comunes en los tres estudios. Esta similitud deriva de que todos los pacientes incluidos en los tres estudios fueron elegibles y tratados según los protocolos PETHEMA LPA96 y LPA99. Han sido incluidos en estos tres estudios todos aquellos pacientes que fueron reportados al registro multicéntrico y multinacional PETHEMA entre el 1 de noviembre de 1996 y el 15 de mayo de 2005, diagnosticados con LPA y demostración de la t(15;17) o el reordenamiento PML/RAR α , con independencia del tratamiento recibido.

5.2 Criterios de elegibilidad en los estudios

Para el análisis de los resultados terapéuticos de dos protocolos consecutivos (PETHEMA LPA96 y LPA99), se excluyeron aquellos pacientes que presentaron cualquiera de los siguientes criterios:

1. estado basal según Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) mayor de 3
2. disfunción hepática, renal, cardíaca o cualquier otra comorbilidad que limite la administración de quimioterapia en opinión del médico de cada centro
3. antecedentes de neoplasia primaria o tratamiento con algún agente antileucémico anteriormente
4. violación mayor de protocolo

El registro epidemiológico PETHEMA, los protocolos y estos estudios fueron aprobados por el comité ético del hospital de referencia (Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia). Del mismo modo, era necesario el consentimiento informado por escrito según se establece en la declaración de Helsinki.

5.3 Citometría de flujo

La caracterización citomorfológica se realizó al diagnóstico en muestras de MO, según la práctica habitual de cada centro, ya fuera de forma local o centralizada en laboratorios de referencia. El análisis del inmunofenotipo por citometría de flujo se realizó usando diferentes citómetros (FACS Calibur o FACS Canto), dependiendo del momento del diagnóstico de cada paciente y su disponibilidad en cada laboratorio. Para ello, se utilizaron anticuerpos monoclonales contra los antígenos de superficie CD2, CD7, CD9, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD56, CD117 y HLA-DR

según los procedimientos estándar de inmunofluorescencia. Si los blastos expresaban el antígeno de superficie CD34 en una proporción $\geq 10\%$, la muestra se consideraba positiva. Para el resto de antígenos de superficie, para considerarse una muestra positiva era necesario alcanzar una proporción $\geq 20\%$.

5.4 Análisis citogenético y molecular

Al igual que la caracterización citomorfológica, los estudios citogenéticos y moleculares al diagnóstico se realizaron siguiendo los procedimientos estándar según la práctica habitual de cada centro, ya fuera de forma local o centralizada en laboratorios de referencia, previamente establecidos. Para considerar una PCR positiva, debe observarse la banda específica del reordenamiento PML/RARA en un gel de bromuro de etidio mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa, con una sensibilidad de 10^{-4} .

5.5 Registro PETHEMA

Con todos los antecedentes anteriores, la información publicada hasta el momento en referencia a la LPA no representa a la población general. Debido a ello, el grupo cooperativo PETHEMA ha pretendido, en los últimos años, registrar todos los pacientes diagnosticados de LMA, con independencia de la actitud terapéutica adoptada o edad, con el fin de obtener información real sobre las características, resultados y esquemas de tratamiento utilizados. El registro PETHEMA tiene como objetivo principal realizar estudios epidemiológicos para valorar las peculiaridades de los pacientes y su enfermedad. Además, pretende correlacionar los rasgos clínicos y biológicos con los resultados terapéuticos y la evolución de la LMA, tratando de identificar factores de riesgo que puedan ayudar a diseñar protocolos de tratamiento adaptados a cada subgrupo de pacientes.

El desarrollo del registro PETHEMA ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia (centro de referencia).

5.6 Agentes empleados para el tratamiento de la LPA

5.6.1 ATRA

También se le conoce como tretinoína o ácido holo-trans retinoico. Está clasificado como agente inductor de la diferenciación.⁸⁸

El ATRA es un metabolito natural del retinol, estructuralmente relacionado con la vitamina A, que está involucrado en la regulación de varios procesos biológicos. Aunque su mecanismo de acción no es conocido, interviene en la maduración terminal de las células hematopoyéticas, incluidas las células leucémicas de los pacientes diagnosticados con LPA.

De absorción oral, tiene una importante variabilidad inter e intrapaciente y se distribuye rápidamente a los tejidos, alcanzando niveles altos en riñón, hígado e intestino. No atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) y presenta una elevada unión a proteínas plasmáticas (>95%). Su metabolismo es, principalmente, hepático (citocromo P450) y se excreta por orina, sobretodo, y por las heces.

Entre los efectos secundarios específicos que deben tenerse en cuenta están:

- cefalea: es el efecto secundario más frecuente. Suele aparecer horas después de la administración de ATRA, es de intensidad moderada y responde al tratamiento con analgésicos. Generalmente es transitoria y desarrolla tolerabilidad con el tratamiento continuado.
- pseudotumor cerebri: se caracteriza por signos y síntomas de hipertensión intracraneal sin evidencia de lesión ocupante de espacio o infección. Suele aparecer días después de iniciar el tratamiento con ATRA y su frecuencia es mayor en niños.
- síndrome de ATRA: también conocido como síndrome de diferenciación. Suele aparecer días después de iniciar el tratamiento con ATRA y, debido a la severidad y mal pronóstico del desarrollo de esta complicación, debe considerarse su prevención en pacientes de riesgo. Ante la aparición de alguno de sus signos o síntomas característicos (fiebre, disnea, hipotensión, insuficiencia respiratoria, infiltrados pulmonares, derrame pleural o pericárdico, ganancia de peso, edema, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal o fallo multiorgánico), debe iniciarse tratamiento precoz con dexametasona e incluso suspender de forma transitoria el tratamiento con ATRA.

5.6.2 *Idarubicina*

También se le conoce como 4-Demetoxidaunorubicina, 4-DMDR, IMI 30, SC 33428. Se clasifica como antibiótico antitumoral.⁸⁹

Es una molécula altamente lipofílica que se transforma en idarubicinol, su metabolito activo. La idarubicina se intercala entre los pares de bases y provoca la ruptura de las hebras de ADN, inhibiendo la topoisomerasa II e interfiriendo en la replicación del ADN y transcripción del ARN.

Su administración en la LPA es intravenosa. Atraviesa la BHE y presenta una elevada unión a proteínas plasmáticas, tanto la idarubicina (97%) como su metabolito activo (94%). Su metabolismo sigue un modelo bi- o tricompartmental, dependiendo de la dosis, y es rápidamente reducido a idarubicinol en plasma. Presenta un amplio reciclaje enterohepático. Su excreción es variable, siendo principalmente la vía biliar para la idarubicina y la urinaria para el idarubicinol. El metabolito activo presenta una mayor vida media (41-69 h) que la idarubicina (11-25 h).

Entre los efectos secundarios específicos que deben tenerse en cuenta están:

- hiperuricemia: derivado de la lisis celular a consecuencia del efecto citotóxico de la quimioterapia. Se caracteriza por la aparición de alteraciones electrolíticas, con o sin insuficiencia renal aguda (síndrome de lisis tumoral).
- cardiotoxicidad: se cree que es debida al daño que los radicales libres producen en el tejido miocárdico. Puede aparecer durante o inmediatamente después de una sola dosis de antraciclina, ya que no es dosis-dependiente, y su aparición no justifica la suspensión del tratamiento (efectos tempranos). Cuando aparece semanas o años después, se define como tardía y depende de la dosis de antraciclinas administrada, considerándose irreversible y refractaria al tratamiento.

5.6.3 *Mitoxantrone*

También es conocida como DHAD, hidroxiantracenediona dihidrocloruro o mitoxantrona. Está clasificado como antibiótico antitumoral.⁹⁰

Antracenediona sintética de estructura similar a la doxorubicina y daunorubicina, que surgió con el objetivo de reducir la toxicidad por las antraciclinas, en especial la cardiotoxicidad. Al igual que la idarubicina, el mitoxantrone impide la

reparación del ADN mediante la inhibición de la topoisomerasa II, dando como resultado la ruptura de las hebras de ADN.

Su administración en la LPA es intravenosa. No atraviesa la BHE en una cantidad significativa y se distribuye por el líquido pleural, riñón, tiroides, hígado, corazón y glóbulos rojos. Presenta una elevada unión a proteínas plasmáticas (>95%), en su mayoría a la albúmina (76%). Su metabolismo es hepático pero no bien conocido y se excreta por heces y orina, inalterado en una proporción del 65%.

Entre los efectos secundarios específicos que deben tenerse en cuenta están la hiperuricemia (síndrome de lisis tumoral) y cardiotoxicidad, similar a la descrita para la idarubicina.

5.6.4 Metotrexate

También es conocido como ametopterina o MTX y está clasificado como antimetabolito análogo del ácido fólico.⁹¹

Antagonista del folato. El ácido fólico se reduce a su forma activa, el tetrahidrofolato, debido a la acción de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) y así poder intervenir en la síntesis purina y de timidilato. El metotrexate puede inhibir la DHFR debido a su mayor afinidad (disminuyendo la síntesis de ADN, su reparación y la replicación celular), inhibir el timidilato o alterar el transporte del folato reducido (dificultando el transporte al interior celular).

Su administración en la LPA es intramuscular durante el tratamiento de mantenimiento. Se transporta de forma activa a través de la membrana celular a bajas concentraciones y, de forma pasiva, a altas concentraciones. Tiene una amplia distribución a tejidos y fluidos, como riñón, vesícula biliar, bazo, hígado y piel. Atraviesa la BHE y su metabolismo es hepático e intracelular. Principalmente, la excreción es urinaria por filtración glomerular y, activamente, por secreción tubular.

Entre los efectos secundarios específicos, a las dosis utilizadas en LPA, que deben tenerse en cuenta están:

- hepatotoxicidad: aunque su incidencia es superior a dosis altas, también puede aparecer con administraciones bajas y resultar amenazante para la vida. Las enzimas hepáticas pueden elevarse en cada ciclo y volver a sus valores normales un mes después de suspender la administración. La fibrosis y la cirrosis son más frecuentes con administración crónica de bajas dosis de metotrexate.

- toxicidad pulmonar: aunque su incidencia es superior a dosis altas, también puede aparecer con administraciones bajas y resultar amenazante para la vida. Puede ser asintomática o sintomática y manifestarse como enfermedad inflamatoria pulmonar (neumonitis), pudiendo ser clasificada como aguda, subaguda o crónica. La manifestación subaguda es la más frecuente e incluye fiebre, disnea, tos no productiva, crepitantes, cianosis, fibrosis pulmonar y derrame pleural. Su aparición requiere suspender el tratamiento y se recomienda no volver a introducirlo.

5.6.5 6-Mercaptopurina

También es conocida como 6-MP y está clasificada como antimetabolito análogo de purinas.⁹²

Antagonista de las purinas que se activa a tio-inosina monofosfato (TIMP) en el espacio intracelular por la acción de la hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT). El TIMP se metaboliza de forma secuencial a tioguanina monofosfato y, después, a tioguanosina trifosfato. La incorporación de estos nucleótidos al ADN es la responsable del efecto citotóxico de la mercaptopurina.

Su administración en la LPA es oral, con una absorción variable (5-35%) debido al efecto de primer paso hepático. Además, su absorción puede disminuir por la acción de la xantina oxidasa, presente en la leche de vaca. Atraviesa la BHE en una proporción insignificante. Su metabolismo es hepático, tanto activación como eliminación, y su excreción mínima a las dosis convencionales.

Rara vez, se presentan efectos secundarios específicos a las dosis utilizadas en LPA.

5.7 Tratamiento de la LPA

5.7.1 Protocolo PETHEMA LPA96

En la figura 1 se muestra el esquema de tratamiento según el protocolo LPA96 (vigente a partir del 1 de noviembre de 1996). El tratamiento de inducción consistía en ATRA vo (45 mg/m²/día, dividido en 2 dosis) e idarubicina iv (12 mg/m²/día, los días 2, 4, 6 y 8). El tratamiento con ATRA se mantenía hasta alcanzar la RC o hasta 90 días si persistían promielocitos atípicos en la evaluación de la MO. Aquellos pacientes que

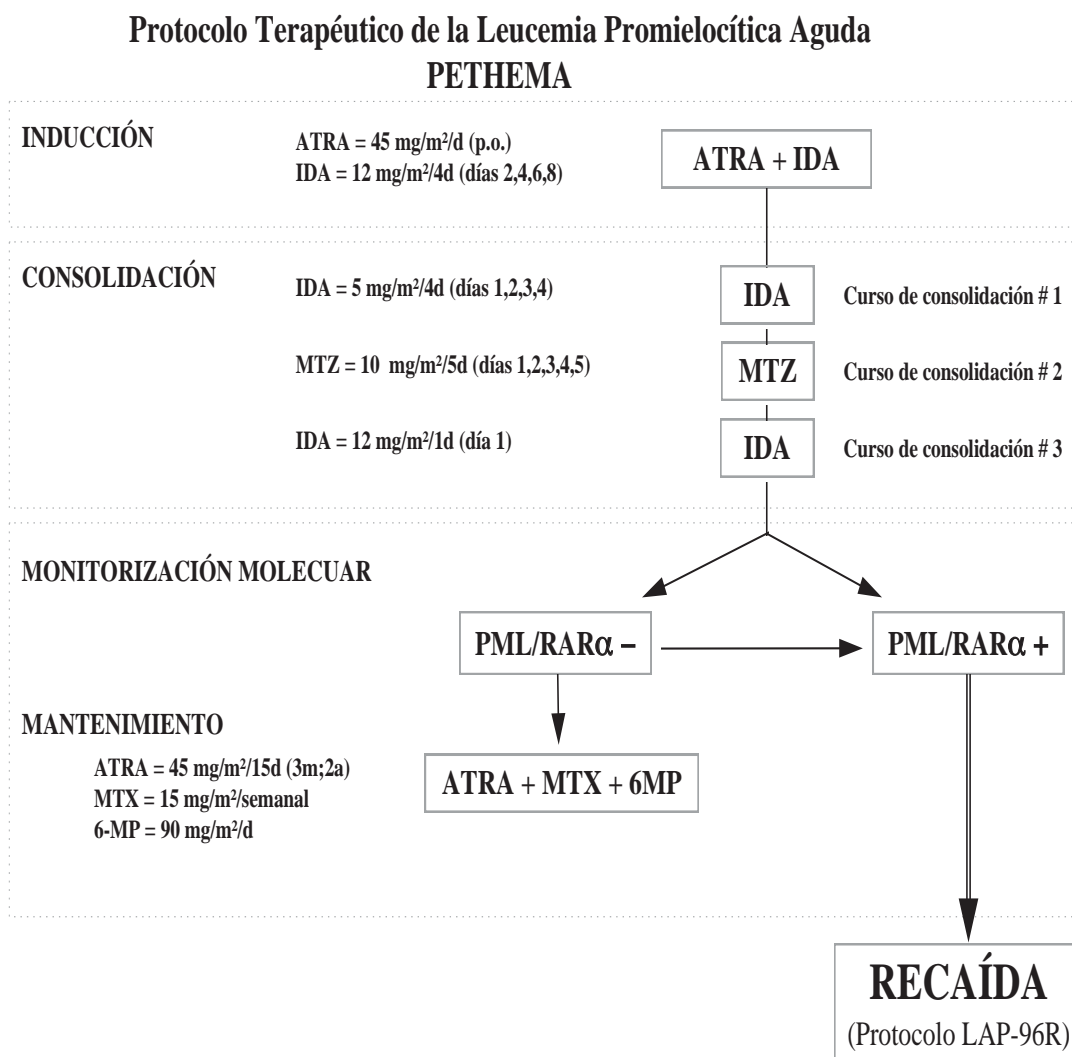
alcanzarón RC, podían recibir hasta 3 ciclos de consolidación basados en antraciclinas en monoterapia:

- consolidación 1: idarubicina iv ($5 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, los días 1 a 4)
- consolidación 2: mitoxantrone iv ($10 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, los días 1 a 5)
- consolidación 3: idarubicina iv ($12 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, el día 1)

Posteriormente, se administraba el tratamiento de mantenimiento, alternando ATRA vo ($45 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, cada 3 meses) con dosis bajas de metotrexate im ($15 \text{ mg/m}^2/\text{semanal}$) y mercaptopurina vo ($90 \text{ mg/m}^2/\text{día}$), durante un periodo de 2 años.

A los pacientes con una edad < 15 años se les administraba una dosis inferior de ATRA ($25 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, dividido en 2 dosis).⁴³

Figura 1. Imagen extraída del protocolo PETHEMA LPA96 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LPA durante el correspondiente periodo de tratamiento.



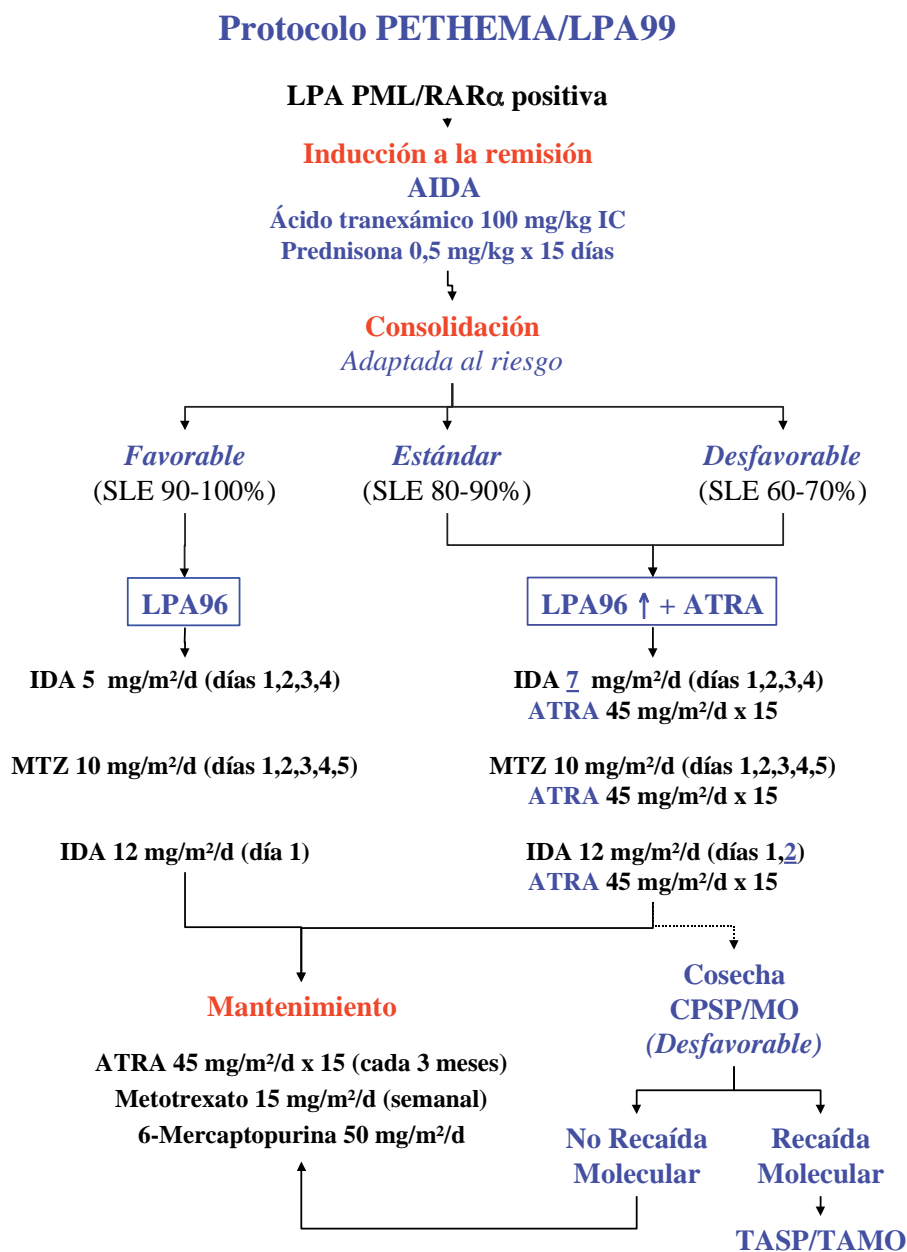
5.7.2 Protocolo PETHEMA LPA99

En la Figura 2 el muestra el esquema de tratamiento según el protocolo LPA99 (vigente a partir del 1 de noviembre de 1999). En el ciclo de inducción, la idarubicina

administrada en el día 8 no se administraba en los pacientes mayores de 70 años, permaneciendo sin cambios para el resto de los pacientes. La estrategia terapéutica post-remisión dependía del grupo de riesgo asignado en el momento del diagnóstico: favorable (recuentos de leucocitos $< 10 \times 10^9/L$ y de plaquetas $> 50 \times 10^9/L$), estándar (recuentos de leucocitos $< 10 \times 10^9/L$ y de plaquetas $< 50 \times 10^9/L$) o desfavorable (recuentos de leucocitos $> 10 \times 10^9/L$). El tratamiento de consolidación no se modificó en los pacientes de riesgo favorable. No obstante, en los pacientes clasificados como riesgo estándar o desfavorable, la idarubicina fue ligeramente aumentada de 5 a 7 $mg/m^2/día$ durante el ciclo 1 y a 2 días en lugar de 1 durante el tercer ciclo. Además, se añadió ATRA (45 $mg/m^2/día$, los días 1-15) en los 3 ciclos de consolidación. No se realizaron cambios en el mantenimiento.

A los pacientes con una edad < 20 años se les administraba una dosis inferior de ATRA (25 $mg/m^2/día$, dividido en 2 dosis).⁴⁰

Figura 2. Imagen extraída del protocolo PETHEMA LPA99 que muestra el esquema terapéutico que recibieron los pacientes diagnosticados de LPA durante el correspondiente periodo de tratamiento.



5.8 Definiciones comunes en los tres estudios

5.8.1 Evaluación de la respuesta

La respuesta al tratamiento se basó en los criterios de Cheson et al.⁶⁰ y se resumen a continuación:

5.8.1.1 Remisión completa

Morfológica

Para que un paciente se considerase que había alcanzado una RC morfológica, se requirieron todos los siguientes criterios:

- En sangre periférica:
 - Recuento de neutrófilos $> 1,5 \times 10^9/L$.
 - Recuento de plaquetas $> 100 \times 10^9/L$
 - Ausencia de blastos y promielocitos atípicos
- En aspirado de MO:
 - Celularidad suficiente (no hipoplásico)
 - El porcentaje de blastos y promielocitos atípicos debía ser $\leq 5\%$
- Ausencia de leucemia extramedular

Molecular

No detección del reordenamiento PML/RARA mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) cuantitativa, con una sensibilidad de 10^{-4} , en una muestra de MO.

5.8.1.2 Fracaso terapéutico

Resistencia:

Persistencia de blastos o promielocitos atípicos en un porcentaje $>5\%$ en MO tras el tratamiento de inducción, teniendo en cuenta que algunos pacientes pueden

presentar un retraso en la diferenciación terminal que puede persistir hasta 40-50 días después de haber iniciado el tratamiento con ATRA.

Fallo por muerte durante la inducción:

Fallecimiento del paciente tras iniciar el tratamiento de inducción sin que se haya valorado la respuesta al tratamiento y, por tanto, no está documentada la RC o la resistencia.

Persistencia molecular:

Requiere la detección del reordenamiento PML/RARA (PCR positiva) en dos muestras consecutivas de MO que se hayan obtenido tras finalizar la consolidación, sin que se haya obtenido previamente RC molecular.

5.8.1.3 Recaída

El concepto de recaída requiere que se haya alcanzado la RC, ya fuera morfológica o molecular. Se puede presentar de tres formas diferentes:

Hematológica

Se requiere que esté documentada la presencia > 5% de blastos o promielocitos atípicos en dos aspirados de MO realizados con, al menos, una semana de separación. Cuando el porcentaje de blastos o promielocitos atípicos sea > 20%, será suficiente una única valoración. Al igual que al diagnóstico, se precisa la demostración de la t(15;17), el reordenamiento PML/RARA o positividad de la tinción con el anticuerpo anti-PML.

Extramedular

Se requiere que esté documentada la presencia de blastos o promielocitos atípicos en un lugar diferente a la MO, ya sea en el líquido cefalorraquídeo, piel, adenopatías u otra localización. Al igual que al diagnóstico, se precisa la demostración de la t(15;17), el reordenamiento PML/RARA o positividad de la tinción con el anticuerpo anti-PML.

Molecular:

Requiere la detección del reordenamiento PML/RARA (PCR positiva) en dos muestras de médula ósea realizadas con 2 semanas de separación, tras alcanzar RC molecular y haber finalizado los ciclos de consolidación.

5.8.2 Riesgo de recaída

Dependiendo de la cifra de plaquetas y leucocitos al diagnóstico, se definen tres grupos de riesgo de recaída que condicionará el tratamiento post-remisión de los pacientes con LPA.⁵³

1. Bajo: leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ y plaquetas $> 40 \times 10^9/L$
2. Intermedio: leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ y plaquetas $\leq 40 \times 10^9/L$
3. Alto: leucocitos $> 10 \times 10^9/L$

5.8.3 Coagulopatía

La valoración de su existencia en un paciente con LPA se establece a partir de las siguientes determinaciones en la hemostasia:

- Tiempo de protrombina (TP) o equivalente (índice de Quick, INR)
- Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)
- fibrinógeno
- Dímeros D o equivalente (productos de degradación de la fibrina)

Para establecer el diagnóstico de coagulopatía era necesario, por un lado, el alargamiento del TP y/o alargamiento del TTPA más, por el otro lado, la disminución de los valores de fibrinógeno y/o aumento de los dímeros D.

5.8.4 Síndrome de diferenciación

Los criterios diagnósticos de síndrome de diferenciación se establecen según los estudios previos publicados por Frankel et al.⁸⁷ y se detallan a continuación:

1. fiebre no relacionada con otras causas
2. disnea
3. hipotensión
4. ganancia de peso mayor a 5 Kg.
5. infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax
6. derrame pleural o pericárdico
7. insuficiencia renal

Para que un paciente fuera diagnosticado de síndrome de diferenciación era necesario que presentara, al menos, 2 signos o síntomas de los especificados anteriormente. Si el paciente presentaba 2 o 3 era clasificado como grado moderado y si presentaba 4 o más era considerado como severo. En el caso de presentar cualquier otra comorbilidad que pudiera explicar los signos o síntomas, el diagnóstico de síndrome de diferenciación se descartaba. Para considerar que el síndrome de diferenciación había sido la causa de la muerte, el paciente debía haber sido diagnosticado de síndrome severo y no presentar ninguna causa que pudiera explicar el desenlace.

5.9 Tratamiento de soporte

5.9.1 Coagulopatía

Cada protocolo disponía de recomendaciones para el manejo de la coagulopatía. En general, si había sospecha, se recomendaba la administración de crioprecipitados, plasma fresco congelado y fibrinógeno según las deficiencias observadas en la hemostasia. Las recomendaciones para la transfusión de plaquetas establecían un valor mínimo de $30 \times 10^9/L$, debiéndose mantener este valor hasta la resolución. Una vez resuelta la coagulopatía, o si no se había presentado, la administración de plaquetas se realizaba según los procedimientos estándar establecidos, es decir, en el caso de que existiesen manifestaciones hemorrágicas, infección o para mantener unos valores entre $10-20 \times 10^9/L$, o $>30 \times 10^9/L$ durante los primeros 10 días. En el protocolo LPA99, se recomendaba el uso profiláctico de ácido tranexámico a una dosis de 100 mg/Kg/día en perfusión iv si el valor de plaquetas era menor a $50 \times 10^9/L$. En el LPA96 el uso de heparina y fibrinolíticos era opcional, mientras que en LPA99 no se recomendaba el uso de heparina pero sí la administración de ácido tranexámico iv (100 mg/Kg/día) hasta que la cifra de plaquetas fuera superior a $50 \times 10^9/L$ y desaparecieran los signos de coagulopatía. En general, la transfusión de concentrados de hematíes se indicaba para mantener un valor superior a 9 g/dL.

5.9.2 Síndrome de diferenciación

Los pacientes incluidos en el protocolo LPA96 recibían durante 7 días, como profilaxis, 10 mg cada 12 horas de dexametasona iv si presentaban una cifra de leucocitos $> 5 \times 10^9/L$. Esta pauta fue modificada en el LPA99, donde los pacientes

recibían una dosis de 0,5 mg/Kg de prednisona vo desde el día 1 hasta el día 15 de tratamiento, con independencia de la cifra de leucocitos. Para el tratamiento, en cualquier paciente que presentara signos o síntomas compatibles con síndrome de diferenciación, se iniciaba tratamiento con dexametasona iv a una dosis de 10 mg cada 12 horas y, en caso de progresión, se acompañaba de la interrupción del ATRA. Estas medidas se mantenían hasta la resolución del cuadro.

5.9.3 Infecciones

Por lo general, los pacientes permanecían hospitalizados durante la inducción hasta la resolución de la neutropenia. Sin embargo, no se establecieron recomendaciones específicas en los diferentes protocolos, por lo que la profilaxis y el tratamiento de las infecciones se realizaron siguiendo los procedimientos estándar establecidos en cada institución.

5.10 Recogida y registro de datos

Los datos fueron recogidos y registrados de forma prospectiva a través de formularios específicos, diseñados para recoger las variables de los pacientes, de la leucemia, particulares o no de la LPA, así como de sus complicaciones. La información era enviada por los centros periódicamente o se les solicitaba cuando se requerían datos para un proyecto de interés científico concreto o, simplemente, cuando se consideraba que había pasado un tiempo de seguimiento suficiente para poder valorar nuevos acontecimientos. Para resolver alguna consulta específica, también se solicitaba información al centro de procedencia. Una vez se había recibido la información, eran introducidos regularmente en el sistema de gestión de bases de datos de Microsoft Access (Microsoft Office®), desde donde se podían realizar consultas SQL para controlar la calidad de los datos introducidos y solventar las posibles incoherencias que pudieran aparecer. Para el análisis posterior, el formato de esta base de datos (Microsoft Access®) podía ser leído directamente por el software estadístico.

5.11 Confidencialidad

La información documentada en el registro, propiedad de la Fundación PETHEMA, se considera confidencial y es tratada como tal. Los pacientes incluidos son identificados con un código numérico de siete cifras, en el que las primeras 4

cifras hace referencia al centro y las 3 últimas al paciente. En el procedimiento de disociación de los datos, solo los investigadores de cada centro conocen los datos personales del paciente y, solo ellos, pueden relacionarlo con el número asignado en el registro PETHEMA. Por tanto, no se han recogido datos personales que pudieran identificar al paciente. En todo momento, la confidencialidad de los datos personales de los pacientes cumple la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

5.12 Análisis estadístico

Para describir los diferentes grupos del estudio se emplearon frecuencias, medias y medianas, con sus correspondientes desviaciones e intervalos.

Para analizar las diferencias en la distribución de variables cualitativas entre los diferentes grupos de pacientes, se usó el test de Chi-cuadrado, aplicando la corrección de Yates cuando era necesario (si la frecuencia esperada en alguna de las casillas de la tabla de contingencia era inferior a 5). Para variables que presentaban una distribución normal, se usó la prueba de t de Student y, para variables que no seguían una distribución normal, la prueba U de Mann-Whitney.

La evaluación de las variables "tiempo hasta que se produce un evento" se estimó mediante el método de Kaplan-Meier.⁹³ La probabilidad de recaída (CIR) se estimó a través del método de incidencia acumulada.⁹⁴ La supervivencia global (SG) se calculó desde la fecha de inicio de tratamiento hasta la fecha de muerte, incluía a causa de la enfermedad o debida a la toxicidad del tratamiento. Para la estimación de la supervivencia libre de enfermedad (SLE), y la CIR, se tomó como momento inicial la fecha de obtención de la RC. El momento final para calcular la SLE fue, al igual que en la SG, la fecha de muerte y en la CIR la fecha en la que se produjo la recaída (clínica o molecular). Para obtener la curva de la SLE, la recaída, el desarrollo posterior de una neoplasia hematológica secundaria o la muerte en RC se consideraron eventos no censurados (uncensored), según lo que ocurriera primero. Para la estimación de la CIR de recaída, se consideraron eventos competitivos la muerte en RC y el desarrollo de una neoplasia hematológica secundaria. Para poder comparar las curvas de supervivencia se usó el test *log-rank*.⁹⁵ Los pacientes que no habían fallecido en el momento de los análisis fueron censurados en la última fecha en la que se tenía constancia de su supervivencia.

Todas aquellas variables que el análisis univariante mostraban una significación estadística o, simplemente, una posible asociación (valor de $P < 0,1$) y

aquellas que habían sido consideradas importantes en estudios previos fueron seleccionadas para el análisis multivariante. Para su realización, se aplicaron modelos de riesgos proporcionales, Cox⁹⁶ para la SG y para la SLE y Fine and Gray⁹⁷ para la CIR.

Todas las pruebas empleadas para el análisis estadístico fueron de dos colas. Los valores no disponibles fueron sustituidos por la media de los valores del resto de pacientes siempre y cuando no representaran más del 15% de los casos.⁹⁸ El análisis estadístico fue realizado con el *software* estadístico BMDP,⁹⁹ excepto el método de Fine and Gray.

6 RESULTADOS

6.1 Artículo 1

Sanz MA, Montesinos P, Vellenga E, Rayón C, de la Serna J, Parody R, Bergua JM, León A, Negri S, González M, Rivas C, Esteve J, Milone G, González JD, Amutio E, Brunet S, García-Laraña J, Colomer D, Calasanz MJ, Chillón C, Barragán E, Bolufer P, Lowenberg B.

Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: long-term outcome of the LPA99 multicenter study by the PETHEMA Group.

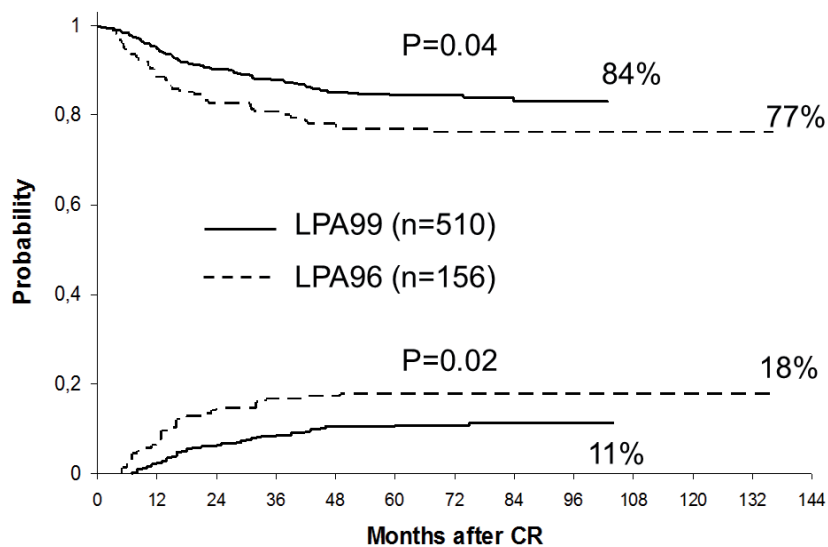
Blood. 2008 Oct 15;112(8):3130-4.

RESUMEN

Un estudio anterior del grupo PETHEMA demostró que una estrategia adaptada al riesgo combinando ATRA y monoquimioterapia con antraciclinas para la inducción y la consolidación en LPA de nuevo diagnóstico (protocolo LPA99), resultó en unos mejores resultados comparados con el esquema anterior (protocolo LPA96). En este estudio se analizó el resultado del tratamiento de una serie ampliada de pacientes con un seguimiento significativamente más prolongado (mediana de 65 meses).

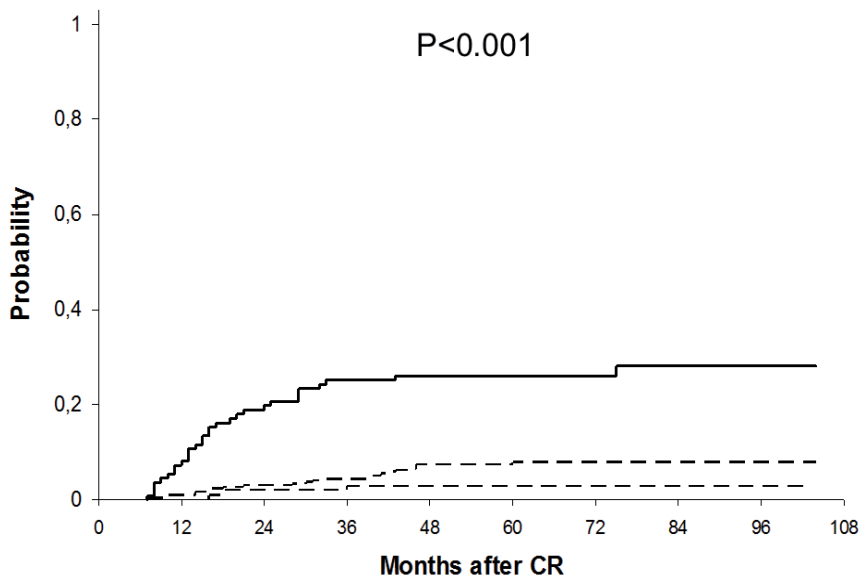
Desde noviembre de 1999 hasta julio de 2005 (ensayo LPA99), 560 pacientes recibieron terapia de inducción con ATRA más idarrubicina. Los pacientes que lograron RC recibieron 3 cursos de consolidación seguida de mantenimiento con ATRA y quimioterapia a dosis bajas. La incidencia acumulada de recaída y supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fueron 11% y 84%, respectivamente. Estos resultados se compararon favorablemente con los obtenidos en el estudio anterior LPA96 ($P = 0,02$ y $P = 0,04$, respectivamente) (Figura 1). El análisis pormenorizado en los pacientes de riesgo intermedio y alto, que fueron aquellos en los que varió el tratamiento respecto al protocolo LPA96, mostraron de la misma forma un beneficio en SLE y CIR.

Figura 1. SLE y CIR en la serie global según el protocolo administrado.



A pesar de la mejoría observada, los pacientes de alto riesgo seguían mostrando un elevada tasa de CIR en el protocolo LPA99 (Figura 2).

Figura 2. CIR en la serie global del protocolo LPA99 según el grupo de riesgo.



Este análisis actualizado confirmó la alta eficacia antileucémica, baja toxicidad y alto grado de cumplimiento de una estrategia adaptada al riesgo con la combinación de ATRA y antraciclina para la terapia de consolidación en pacientes con LPA.

Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: long-term outcome of the LPA99 multicenter study by the PETHEMA Group. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3130-4.

CLINICAL TRIALS AND OBSERVATIONS

Brief report

Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-*trans* retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: long-term outcome of the LPA 99 multicenter study by the PETHEMA Group

Miguel A. Sanz,¹ Pau Montesinos,^{1,2} Edo Vellenga,³ Consuelo Rayón,⁴ Javier de la Serna,⁵ Ricardo Parody,⁶ Juan M. Bergua,⁷ Angel León,⁸ Silvia Negri,⁹ Marcos González,¹⁰ Concha Rivas,¹¹ Jordi Esteve,¹² Gustavo Milone,¹³ José D. González,¹⁴ Elena Amutio,¹⁵ Salut Brunet,¹⁶ J. García-Laraña,¹⁷ Dolors Colomer,¹² María J. Calasanz,¹⁸ Carmen Chillón,¹⁰ Eva Barragán,¹ Pascual Bolufer,¹ and Bob Lowenberg¹⁹

¹Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ²Department of Medicine of Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³University Hospital, Groningen, The Netherlands; ⁴Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain; ⁵Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁶Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; ⁷Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain; ⁸Hospital General, Jerez de la Frontera, Spain; ⁹Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain; ¹⁰Hospital Universitario, Salamanca, Spain; ¹¹Hospital General, Alicante, Spain; ¹²Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ¹³Fundaleu, Buenos Aires, Argentina; ¹⁴Hospital Insular, Las Palmas, Spain; ¹⁵Hospital de Cruces, Baracaldo, Spain; ¹⁶Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain; ¹⁷Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ¹⁸Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; and ¹⁹Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

A previous report of the Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas (PETHEMA) Group showed that a risk-adapted strategy combining all-*trans* retinoic acid (ATRA) and anthracycline monochemotherapy for induction and consolidation in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia results in an improved outcome. Here we analyze treatment outcome of an enlarged series of patients who have been followed up for

a median of 65 months. From November 1999 through July 2005 (LPA99 trial), 560 patients received induction therapy with ATRA plus idarubicin. Patients achieving complete remission received 3 courses of consolidation followed by maintenance with ATRA and low-dose chemotherapy. The 5-year cumulative incidence of relapse and disease-free survival were 11% and 84%, respectively. These results compare favorably with

those obtained in the previous LPA96 study ($P = .019$ and $P = .04$, respectively). This updated analysis confirms the high antileukemic efficacy, low toxicity, and high degree of compliance of a risk-adapted strategy combining ATRA and anthracycline monochemotherapy for consolidation therapy. (*Blood*. 2008;112:3130-3134)

Introduction

The outcome of patients with acute promyelocytic leukemia (APL) has dramatically improved with the combination of all-*trans* retinoic acid (ATRA) and anthracycline-based chemotherapy, which has been adopted as the standard treatment for APL.¹ Using this combination, the cooperative group Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas (PETHEMA) reported that a risk-adapted strategy combining ATRA with anthracycline monochemotherapy for both induction and consolidation, followed by maintenance with ATRA and low-dose methotrexate and mercaptopurine (LPA99 trial), results in a higher antileukemic efficacy than in the previous LPA96 trial.² In this study, the improvement of the antileukemic efficacy was attributed to the novel addition of ATRA to consolidation therapy, combined with a moderate increase in the dose of anthracycline for patients with intermediate- or high risk of relapse.³ This benefit was coupled with a moderate toxicity and a high degree of compliance.

To know if the advantage provided by a risk-adapted strategy including ATRA in consolidation therapy for intermediate- and high-risk APL patients is maintained long term, we have now performed an updated analysis of a significantly enlarged cohort of

patients treated with the LPA99 protocol with more than 5-year median follow-up. The long-term outcome in these patients was compared with those treated with the LPA96 trial.

Methods

The eligibility criteria in this study were a diagnosis of de novo APL with demonstration of the t(15;17) or *PML/RARA* rearrangement, normal hepatic and renal function, no cardiac contraindication to anthracyclines, and Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status less than 4. Informed consent was obtained from all patients. In accordance with the Declaration of Helsinki, the protocols were approved by the Research Ethics Board of each participating hospital.

Details of laboratory studies for diagnosis, assessment of response, and molecular monitoring of minimal residual disease, as well as a complete description of the therapeutic management, are given elsewhere.^{2,4} Briefly, induction therapy consisted of oral ATRA 45 mg/m² per day until morphologic complete remission (CR) and intravenous idarubicin 12 mg/m² on days 2, 4, 6, and 8. The idarubicin on day 8 was omitted for patients older than 70 years in the LPA99 protocol. For patients 20 years of age or younger, the ATRA dose was adjusted to 25 mg/m². Patients in CR received

Submitted May 28, 2008; accepted July 8, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 29, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-05-159632.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

Table 1. Characteristics and postremission outcome of APL patients treated with risk-adapted consolidation in the PETHEMA LPA99 Trial

Characteristic	No. of patients		% CIR		P	% DFS		P	% OS		P
	Overall	CR	at 3 y	at 5 y		at 3 y	at 5 y		at 3 y	at 5 y	
Overall	580	510	9	11		88	84		85	82	
Age, y											
<18	65	62	10	10	.78*	89	89	.09*	91	89	<.001*
18-60	394	369	9	11		89	85		89	86	
61-70	68	53	9	14		83	79		71	68	
>70	33	26	4	4		77	77		61	52	
Sex											
Male	270	238	11	16	.004	86	81	.03	83	81	.20
Female	290	272	7	7		89	88		87	83	
WBC, ×10⁹/L											
<3.5	336	321	3	6	<.001†	92	87	<.001†	90	87	<.001†
3.5-10	85	77	8	8		91	90		87	86	
10-50	99	79	22	23		78	77		74	70	
>50	39	32	34	34		62	62		67	64	
Hemoglobin, g/dL											
≤10	361	329	8	11	.83	88	84	.64	84	82	.65
>10	198	180	9	11		87	85		87	83	
Platelets, ×10⁹/L											
≤40	431	390	9	12	.11	86	83	.33	84	82	.60
>40	128	119	7	7		88	87		88	84	
FAB subtype											
Typical	450	415	7	9	.027	89	86	.07	86	84	.04
Variant	100	85	16	18		81	77		79	75	
ECOG											
≤1	377	352	8	11	.64	89	85	.46	88	84	.004
>1	138	117	11	12		84	82		76	74	
Relapse-risk group											
Low	107	103	3	3	<.001‡	91	90	<.001	91	87	<.001
Intermediate	314	295	4	8		92	87		89	87	
High	138	111	25	26		74	73		72	69	
Protocol (all patients)											
LPA96	172	156	17	18	.017	81	77	.03	78	76	.07
LPA99	560	510	9	11		88	84		85	82	
Protocol (I&H risk patients)											
LPA96	138	123	20	21	.019	76	75	.04	75	75	.07
LPA99	453	407	10	13		87	83		84	81	

I indicates intermediate; and H, high.

*P value compares less than 60 and more than 60 years.

†P value compares WBC less than 10 and more than 10 × 10⁹/L.

‡Low risk versus intermediate risk, P = .11; low versus high, P < .001; intermediate versus high, P < .001.

3 monthly risk-adapted consolidation courses. In the LPA96 protocol, the first course consisted of idarubicin (5 mg/m² per day for 4 days), the second of mitoxantrone (10 mg/m² per day for 5 days), and the third of idarubicin (12 mg/m² per day for 1 day). From November 1, 1999 (LPA99 trial), intermediate- and high-risk patients, as previously defined,³ received ATRA (45 mg/m² per day for 15 days) combined with the reinforced single-agent chemotherapy courses.² This reinforcement consisted of increasing the idarubicin dose in the first course to 7 mg/m² per day and of administering idarubicin for 2 consecutive days instead of 1 in the third course. Patients who tested negative for *PML/RARA* at the end of consolidation were started on maintenance therapy with oral mercaptopurine (50 mg/m² per day), intramuscular methotrexate (15 mg/m² per week), and oral ATRA (45 mg/m² per day for 15 days every 3 months) over 2 years.

Unadjusted time-to-event analyses were performed using the Kaplan-Meier estimate⁵ and, for comparisons, log-rank tests.⁶ The probability of relapse was also estimated by the cumulative incidence method (for marginal probability).^{7,8} For all estimates in which the event "relapse" was considered as an end point, hematologic and molecular relapse, as well as molecular persistence (*PML/RARA* positive by reverse-transcribed-polymerase chain reaction (RT-PCR) at the end of consolidation), were each considered as uncensored events. Patient follow-up was updated on April 15, 2008. Median follow-up of patients is 68 months (range, 34-104 months)

from diagnosis. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards model.⁹

Results and discussion

Between November 1996 and June 2005, 792 patients with APL enrolled in 2 consecutive trials (LPA96 and LPA99) were registered from 82 institutions from Spain, The Netherlands, Belgium, Argentina, Uruguay, and the Czech Republic (see Appendix). Details about noneligible, nonevaluable, and evaluable patients have been reported elsewhere.¹⁰ Briefly, a total of 42 patients (5%) were not eligible because of a severe clinical condition contraindicating the administration of chemotherapy: 8 (4%) and 34 (6%) in the LPA96 and LPA99 trial, respectively. Eighteen additional patients were not evaluated because of protocol violations during induction therapy (8 of 181 and 10 of 570 in the LPA96 and LPA99 trials, respectively). The major clinical and biologic characteristics of the remaining 732 evaluable patients, the percentage and timing of response to induction therapy, and prognostic factors of the

major categories of induction failure have all been previously described.¹⁰

An interim analysis of the postremission outcome of 384 of these patients (updated on April 15, 2003) was reported in 2004.² This study showed a reduction in the cumulative incidence of relapse (CIR), disease-free survival (DFS), and overall survival (OS), with no significant increase of severe toxicity, for patients treated with the LPA99 protocol (227 patients) compared with the LPA96 (157 patients). In the present study, we have performed an updated analysis of a considerably enlarged cohort of 560 patients treated under the LPA99 trial with a more mature median follow-up of 68 months (21 months in the previous analysis). The clinical and hematologic characteristics of these patients are shown in Table 1.

Except for one 81-year-old patient, who died from volvulus before starting consolidation, and another 42-year-old patient, who developed severe cardiac toxicity during induction and was given directly maintenance therapy, all the remaining 508 patients who achieved CR proceeded to consolidation therapy. Because of the occurrence of severe complications, 7 patients received only 1 or 2 consolidation courses (2 and 5 patients, respectively). After a median follow-up of almost 5.5 years, all these patients with incomplete consolidation and the one not receiving consolidation continue in first CR. These observations may suggest that at least some APL patients receiving what is currently considered a state-of-the-art treatment (ie, up-front ATRA and intensive chemotherapy) may actually be overtreated. An accurate identification of this particular population of patients who could be cured with reduced chemotherapy intensity is a challenge that warrants further investigation. Seven toxic deaths occurred during consolidation, and 6 additional patients died after consolidation (3 on maintenance therapy and 3 off therapy). The total rate of death in remission was 2.3%. Probability of death correlated with age: 0.9% (4 of 428), 5.4% (3 of 56), and 23.1% (6 of 26) of patients younger than 60, between 60 and 70, and older than 70 years of age, respectively ($P < .001$). All patients alive after completing consolidation therapy proceeded to receive maintenance therapy.

RT-PCR tests for *PML/RARA* were carried out in 448 cases at the end of consolidation, with only 3 high-risk patients being PCR-positive at this time. These data compare favorably with the LPA96 trial ($P = .028$), in which 5 of 138 evaluable patients (4 of 44 high-risk and 1 of 97 intermediate-risk patients) showed molecular persistence at the end of consolidation.² As in previous reports of the PETHEMA trials,^{2,4} the molecular status at the end of induction has no predictive value on patient outcome, being the 5-year CIR 11% and 12% in patients testing PCR-positive (49%) and PCR-negative (51%), respectively.

In addition to the 3 cases of molecular disease persistence, 52 patients relapsed (13 molecular and 39 clinical relapse), including 6 isolated in central nervous system. The median time to relapse was 16 months (range, 5-74 months), with only 2 relapses occurring beyond 45 months. Nine additional patients died after developing other malignancies (6 acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome, 1 acute lymphoblastic leukemia, 1 lung cancer, and 1 pancreatic cancer). The median interval from diagnosis of APL to that of therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome was 41 months (range, 16-54 months).

The overall 5-year CIR, DFS, and OS rates of patients under the LPA99 protocol were 11%, 84%, and 82%, respectively. These results compare favorably with those obtained in the previous LPA96 study (Figure 1A). When we exclude the low-risk patients to better evaluate the impact of risk-adapted consolidation, the

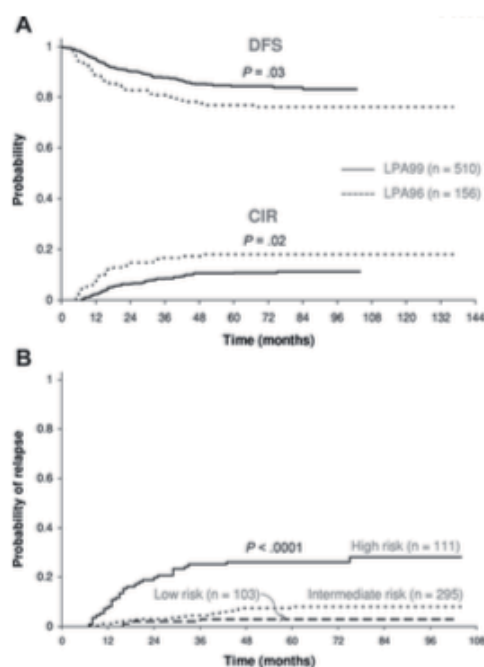


Figure 1. Disease-free survival and cumulative incidence of relapse according to treatment protocol and relapse risk group. (A) Kaplan-Meier product-limit estimate of disease-free survival (DFS) and cumulative incidence of relapse (CIR) according to whether they received anthracycline monochemotherapy consolidation (LPA96 study) or risk-adapted consolidation (LPA99 study). (B) CIR of patients in the LPA99 trial according to the relapse risk group.

5-year CIR, DFS, and OS rates were 21%, 75%, and 75%, respectively, in the LPA96 study and 13%, 83%, and 81%, respectively, in the LPA99 study. Univariate analysis of CIR, DFS, and OS is shown in Table 1. Relapse-risk score and male gender were identified in multivariate analysis as the only independent adverse factors for relapse-free survival in the LPA99 trial ($P < .001$ and $P = .003$, respectively). Despite the improved outcome of non-low-risk patients treated with the modified consolidation, the originally defined risk score³ maintained its predictive value (Figure 1B). The relationship between male sex and increased risk of relapse, which has been widely recognized in children with acute lymphoblastic leukemia,^{11,12} has been previously reported in an independent series of 806 APL patients included in 3 multicenter trials of the European APL Group (APL91, APL93) and PETHEMA Group (LPA96).¹³ The significance of this finding is at present unclear and deserves further investigation.

In conclusion, the antileukemic benefit previously reported with the reinforcement of idarubicin and the addition of ATRA to consolidation therapy² has been confirmed in a significantly enlarged series of APL patients with longer follow-up. Although we cannot discern the relative contribution to this benefit by the addition of ATRA, as it has been established for induction and maintenance therapy, it is reasonable that the safe combination of this agent with chemotherapy may also apply to the consolidation

phase. Risk-adapted strategies focusing on patients with high risk of relapse should be a major focus of future studies.

Acknowledgments

The authors thank Miguel Priego for data collection and management.

This study was supported in part by the Fundación para la Investigación Hospital Universitario La Fe-Ayudas Bancaja (2006/0137), Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD06/0020/0031), Fondo de Investigación Sanitaria, and Ministerio de Sanidad of Spain (PI030400 and PI060657).

A complete list of participating institutions appears in the Appendix.

Authorship

Contribution: M.A.S. and P.M. conceived the study and analyzed and interpreted the data; M.A.S., P.M., and B.L. wrote the paper; P.M. performed the statistical analyses; M.G., D.C., M.J.C., C.C., E.B., and P.B. performed the RT-PCR analyses; and E.V., C. Rayón, J.d.I.S., R.P., J.M.B., A.L., S.N., M.G., C. Rivas, J.E., G.M., J.D.G., E.A., S.B., and J.G.-L. included data of patients treated in their institutions, reviewed the manuscript, and contributed to the final draft.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Miguel A. Sanz, Department of Hematology, University Hospital La Fe, Avenida Campanar 21, 46009 Valencia, Spain; e-mail: msanz@uv.es.

Appendix

The following institutions and clinicians participated in the study: Argentina (Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda)—Complejo Médico Policía Federal, La Plata: L. Palmer; Fundaleu, Buenos Aires: S. Pavlovsky, G. Milone, I. Fernández; Hospital Clemente Álvarez, Rosario: S. Ciarlo, F. Bezares; Hospital de Clínicas, Buenos Aires: H. Longoni; Hospital General San Martín, La Plata: M. Gelemur, P. Fazio; Hospital Rossi, La Plata: C. Canepa, S. Saba; Hospital San Martín de Paraná, Entre Ríos: P. Negri; Instituto Privado de Hematología, Paraná: M. Giunta; Instituto de Trasplante de Médula Ósea, La Plata: J. Milone, V. Prates; Czech Republic—Faculty Hospital, Brno: M. Protivankova; Spain (Programa Español de Tratamiento de las Hemopatías Malignas)—Basurtuko Ospitalea, Bilbao: J. M. Beltrán de Heredia; Complejo Hospitalario de Segovia: J. M. Hernández; Complejo Hospitalario Xeral-Calde, Lugo: J. Arias; Complejo Hospitalario, León: F. Ramos; Fundación Jiménez Díaz, Madrid: A. Román; Hospital 12 de Octubre, Madrid: J. de la Serna; Hospital Carlos Haya, Málaga: S. Negri; Hospital Central de Asturias, Oviedo: C. Rayón; Hospital Clinic, Barcelona: J. Esteve, D. Colomer; Hospital Clínico de Valladolid: F.J. Fernández-Calvo; Hospital Clínico San Carlos, Madrid: J. Díaz Mediavilla; Hospital Clínico San Carlos (H. Infantil), Madrid: C. Gil; Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela: M. Pérez; Hospital Clínico Universitario,

Valencia: M. Tormo; Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza: M. Olave; Hospital de Cruces, Baracaldo: E. Amutio; Hospital del Mar, Barcelona: C. Pedro; Hospital de Navarra, Pamplona: A. Gorosquieta; Hospital Dr Negrín, Las Palmas: T. Molero; Hospital Dr Peset, Valencia: M. J. Sayas; Hospital Dr Trueta, Girona: R. Guardia; Hospital General de Albacete: J. R. Romero; Hospital General de Alicante: C. Rivas; Hospital General de Alicante (Oncología Pediátrica): C. Esquembre; Hospital General de Castellón: R. García; Hospital General de Especialidades Ciudad de Jaén: A. Alcalá; Hospital General de Jerez de la Frontera: A. León; Hospital General de Murcia: M. L. Amigo; Hospital General de Valencia: M. Linares; Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona: J. M. Ribera; Hospital Insular de Las Palmas: J. D. González San Miguel; Hospital Juan Canalejo, A Coruña: G. Debán; Hospital Joan XXIII, Tarragona: L. Escoda; Hospital La Princesa, Madrid: R. de la Cámara; Hospital Materno-Infantil de Las Palmas: A. Molines; Hospital do Meixoeiro, Vigo: C. Loureiro; Hospital Montecelo, Pontevedra: M. J. Allegue; Hospital Mutua de Terrasa: J. M. Martí; Hospital Niño Jesús, Madrid: L. Madero; Hospital Ntra. Sra. de Sonsoles, Ávila: M. Cabezedo; Hospital Ramón y Cajal, Madrid: J. García-Laraña; Hospital Reina Sofía, Córdoba: R. Rojas, J. Román; Hospital Río Carrión, Palencia: F. Ortega; Hospital Río Hortega, Valladolid: M. J. Peñarrubia; Hospital San Jorge, Huesca: F. Puente; Hospital San Rafael, Madrid: B. López-Ibor; Hospital Sant Pau, Barcelona: S. Brunet; Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres: J. M. Bergua; Hospital Santa María del Rosell, Cartagena: J. Ibáñez; Hospital Severo Ochoa, Leganés: P. Sánchez; Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca: A. Novo; Hospital de Tortosa: L. L. Font; Hospital Txagorritxu, Vitoria: J. M. Guinea; Hospital Universitario del Aire, Madrid: A. Montero; Hospital Universitario de Salamanca: M. González, C. Chillón; Hospital Universitario La Fe, Valencia: M. A. Sanz, P. Montesinos, J. Martínez, P. Bolufer, E. Barragán; Hospital Universitario La Fe (Hospital Infantil), Valencia: A. Verdeguer; Hospital Universitario La Paz (Hospital Infantil), Madrid: P. García; Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander: E. Conde; Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares: J. García; Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz: F. J. Capote; Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid: I. Krsnik; Hospital Universitario Vall D'Hebron, Barcelona: J. Bueno; Hospital Universitario Materno-Infantil Vall D'Hebron, Barcelona: P. Bastida; Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia: P. Rosique; Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Pediatria), Murcia: J. L. Fuster; Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla: R. Parody; Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga: I. Pérez; Hospital Virgen del Camino, Pamplona: J. Molina; Hospital Xeral Cies, Vigo: C. Poderós; Institut Català d'Oncologia, Hospitalet de Llobregat: R. Duarte; Universidad de Navarra: M. J. Calasanz; The Netherlands (The Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group, HO-VON)—VU Medical Center Amsterdam: G. J. Ossenkoppele; Academic Medical Center, University of Amsterdam: J. van der Lelie; Erasmus University Medical Center, Rotterdam: B. Lowenberg, P. Sonneveld, M. Zijlmans; University Medical Center, Groningen: E. Vellenga; Gasthuisberg Hospital, Leuven: J. Maertens; OLVG Hospital, Amsterdam: B. de Valk; Den Haag Hospital, Leyenburg: P.W. Wijermans; Medical Spectrum Twente Hospital, Enschede: M. R. de Groot; Academic Hospital Maastricht: H. C. Schouten; St. Antonius Hospital, Nieuwegein: D.H. Biesma; Sophia Hospital, Zwolle: M. van Marwijk Kooy; Uruguay—Hospital Maciel, Montevideo: E. de Lisa.

References

1. Sanz MA. Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;147-155.
2. Sanz MA, Martín G, González M, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monotherapy: a multicenter study by the PETHEMA Group. *Blood*. 2004;103:1237-1243.
3. Sanz MA, Lo Coco F, Martín G, et al. Definition of relapse risk and role of non-anthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*. 2000;96:1247-1253.
4. Sanz MA, Martín G, Rayón C, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARA-positive acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:3015-3021.
5. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-481.
6. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*. 1966;50:163-170.
7. Gray RJ. A class of K-sample test for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat*. 1988;16:1141-1154.
8. Pepe MS, Mori M. Kaplan-Meier, marginal or conditional probability curves in summarizing competing risk failure time data? *Stat Med*. 1993;12:737-751.
9. Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc B*. 1972;34:187-220.
10. de la Serna J, Montesinos P, Vellenga E, et al. Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin. *Blood*. 2006;111:3395-3402.
11. Shuster JJ, Wacker P, Pullen J, et al. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1998;16:2854-2863.
12. Pui CH, Boyett JM, Relling MV, et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1999;17:818-824.
13. De Botton S, Sanz MA, Chevret S, et al. Extramedullary relapse in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. *Leukemia*. 2006;20:35-41.

6.2 Artículo 2

Montesinos P, Bergua JM, Vellenga E, Rayón C, Parody R, de la Serna J, León A, Esteve J, Milone G, Debén G, Rivas C, González M, Tormo M, Díaz-Mediavilla J, González JD, Negri S, Amutio E, Brunet S, Lowenberg B, Sanz MA.

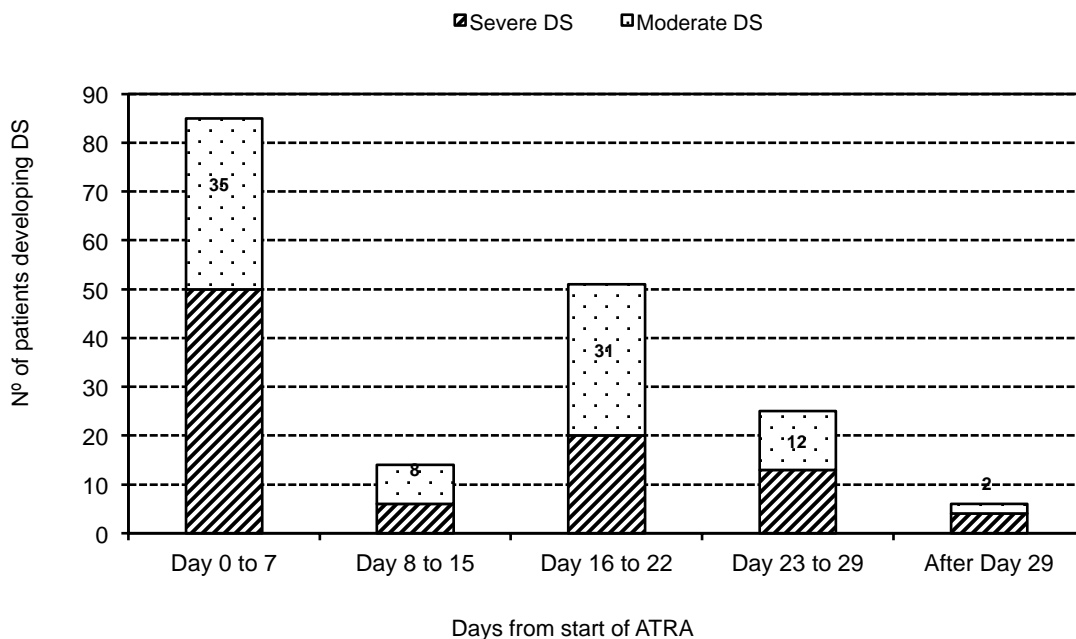
Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: characteristics, outcome, and prognostic factors.

Blood. 2009 Jan 22;113(4):775-83.

RESUMEN

El síndrome de diferenciación puede ser una complicación potencialmente mortal en pacientes con LPA sometidos a terapia de inducción con ATRA y quimioterapia. Existen escasos estudios que analicen y describan en profundidad esta complicación. En este estudio se presenta un análisis de la incidencia, características, factores pronósticos y resultados de 739 pacientes con LPA de nuevo diagnóstico tratados con ATRA más idarrubicina en 2 ensayos consecutivos (PETHEMA LPA96 y LPA99). En total, 183 pacientes (24,8%) experimentaron el síndrome durante la inducción, 93 de ellos con una forma severa (12,6%) y 90 con una forma moderada (12,2%). Entre los pacientes que desarrollaron casos severos (4 o más criterios clínicos), un 15% fallecieron directamente por el síndrome de diferenciación. Sin embargo, la forma moderada del síndrome no se asoció con un incremento en la mortalidad en inducción. Se observó una incidencia bimodal, con picos que se producen en la primera y tercera semana después del comienzo de la terapia con ATRA (Figura 1).

Figura 1. Cronología de la presentación del síndrome de diferenciación.



El análisis multivariante indicó que un recuento de leucocitos en SP > 5 x 10⁹/L y un nivel de creatinina sérica anormal se correlacionaron con un mayor riesgo de padecer un síndrome de diferenciación severo. Los pacientes que recibieron profilaxis sistemática con prednisona (ensayo LPA99) tuvieron una menor incidencia de síndrome severo, en contraste con los que recibieron profilaxis selectiva con dexametasona (ensayo LPA96).

Aproximadamente el 80% de los pacientes con criterios de síndrome de diferenciación recibió dexametasona intravenosa, el ATRA se suspendió en el 60% de los casos, un 65% recibió tratamiento con diuréticos, y menos del 10% requirió diálisis o ventilación mecánica.

Los pacientes que desarrollaron una forma severa del síndrome tuvieron una menor supervivencia libre de recaída a los 7 años en el protocolo LPA96 (60% vs 85%, P = 0,003), pero esta diferencia no fue evidente en el ensayo LPA99 (86% vs 88%). Esto pudo ser debido a que, a diferencia del ensayo LPA96, la mayoría de los pacientes del ensayo LPA99 recibieron ATRA en consolidación. Se puede especular que los pacientes del protocolo LPA96 en los que se suspendió el ATRA en inducción por culpa del síndrome de diferenciación, pudieron recibir dosis insuficientes de esta droga, afectando a la tasa de recaídas.

Figura 2. Supervivencia libre de recaída en el protocolo LPA96 según el desarrollo de síndrome de diferenciación severo.

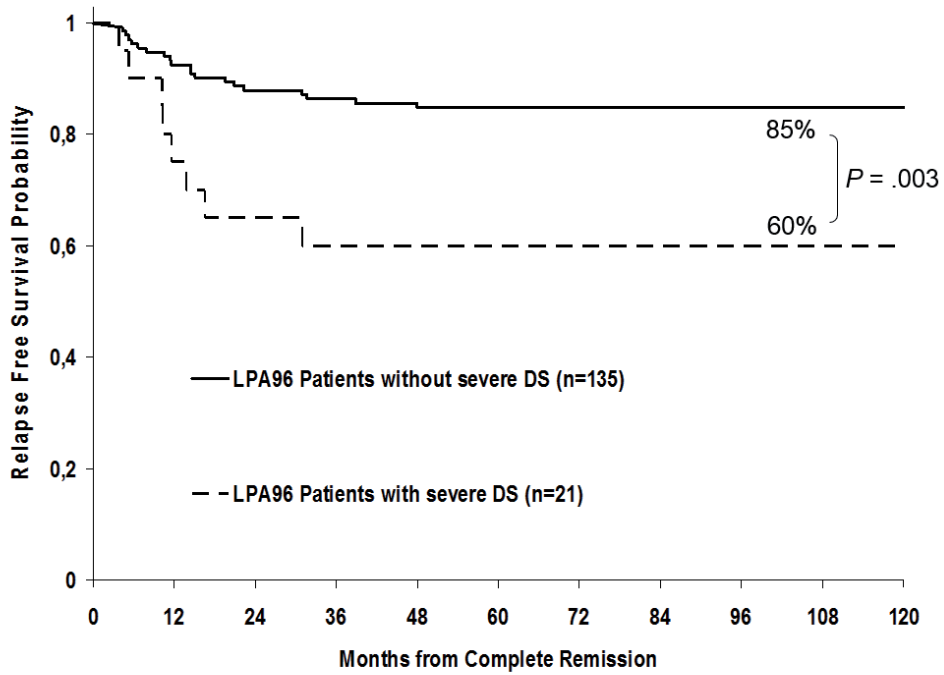
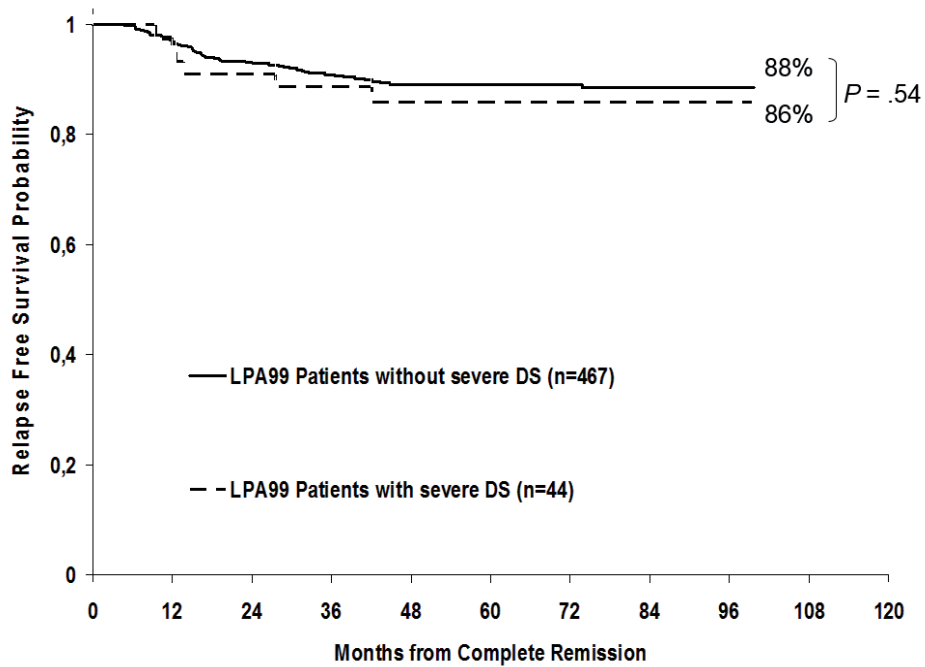


Figura 3. Supervivencia libre de recaída en el protocolo LPA99 según el desarrollo de síndrome de diferenciación severo.



Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: characteristics, outcome, and prognostic factors. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):775-83.

CLINICAL TRIALS AND OBSERVATIONS

Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: characteristics, outcome, and prognostic factors

Pau Montesinos,^{1,2} Juan M. Bergua,³ Edo Vellenga,⁴ Chelo Rayón,⁵ Ricardo Parody,⁶ Javier de la Serna,⁷ Angel León,⁸ Jordi Esteve,⁹ Gustavo Milone,¹⁰ Guillermo Debón,¹¹ Concha Rivas,¹² Marcos González,¹³ Mar Tormo,¹⁴ Joaquín Díaz-Mediavilla,¹⁵ Jose D. González,¹⁶ Silvia Negri,¹⁷ Elena Amutio,¹⁸ Salut Brunet,¹⁹ Bob Lowenberg,²⁰ and Miguel A. Sanz¹

¹Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ²Department of Medicine of the Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain; ⁴University Hospital, Groningen, The Netherlands; ⁵Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain; ⁶Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; ⁷Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁸Hospital General, Jerez de la Frontera, Spain; ⁹Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ¹⁰Fundaleu, Buenos Aires, Argentina; ¹¹Hospital Juan Canalejo, La Coruña, Spain; ¹²Hospital General, Alicante, Spain; ¹³Hospital Universitario, Salamanca, Spain; ¹⁴Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ¹⁵Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; ¹⁶Hospital Insular, Las Palmas, Spain; ¹⁷Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain; ¹⁸Hospital de Cruces, Baracaldo, Spain; ¹⁹Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain; and ²⁰Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Differentiation syndrome (DS) can be a life-threatening complication in patients with acute promyelocytic leukemia (APL) undergoing induction therapy with all-trans retinoic acid (ATRA). Detailed knowledge about DS has remained limited. We present an analysis of the incidence, characteristics, prognostic factors, and outcome of 739 APL patients treated with ATRA plus idarubicin in 2 consecutive trials (Programa Español de Tratamientos en Hematología [PETHEMA] LPA96 and

LPA99). Overall, 183 patients (24.8%) experienced DS, 93 with a severe form (12.6%) and 90 with a moderate form (12.2%). Severe but not moderate DS was associated with an increase in mortality. A bimodal incidence of DS was observed, with peaks occurring in the first and third weeks after the start of ATRA therapy. A multivariate analysis indicated that a WBC count greater than $5 \times 10^9/L$ and an abnormal serum creatinine level correlated with an increased risk of developing severe

DS. Patients receiving systematic prednisone prophylaxis (LPA99 trial) in contrast to those receiving selective prophylaxis with dexamethasone (LPA96 trial) had a lower incidence of severe DS. Patients developing severe DS showed a reduced 7-year relapse-free survival in the LPA96 trial (60% vs 85%, $P = .003$), but this difference was not apparent in the LPA99 trial (86% vs 88%). (*Blood*. 2009;113:775-783)

Introduction

Differentiation syndrome (DS), formerly known as retinoic acid syndrome, can be a life-threatening complication in patients with acute promyelocytic leukemia (APL) undergoing induction therapy with all-trans retinoic acid (ATRA) or arsenic trioxide. The full-blown syndrome is characterized by unexplained fever, weight gain, peripheral edema, dyspnea with interstitial pulmonary infiltrates, pleuropericardial effusion, hypotension, and acute renal failure.¹ The reported incidence of this syndrome of uncertain pathogenesis ranges from 2% to 27%.¹⁻¹⁰ This wide range is probably because of the different criteria used for the diagnosis of DS, and to the effects on the incidence and severity of the syndrome due to differences in induction therapy and supportive measures. In this regard, the early addition of chemotherapy to ATRA and the administration of high-dose dexamethasone at the onset of the first symptoms appear to have reduced the DS-related mortality to 1% or less in the most recent trials.⁹⁻¹¹

Although the mortality associated with DS is now relatively low, the development of this complication has additional implications, such as an increase in morbidity leading to an increased use of hospital resources, and it has been suggested that this is associated with an increased risk of relapse independent of the

white blood cell (WBC) count.¹¹ However, this interesting finding reported by the European APL Group has not yet been confirmed in other studies.

Apart from a peak WBC count frequently observed at the onset of DS symptoms,² very little is known about other factors predictive of DS when patients are treated with ATRA combined with chemotherapy. In this context, only one published study included a significant number of patients and examined possible prognostic factors, including pretreatment WBC count, associated with the development of DS.¹⁰ This study found that none of the examined variables had prognostic value. Furthermore, the Programa Español de Tratamientos en Hematología (PETHEMA) group has recently analyzed the causes and prognostic factors of induction failure, including death due to DS, but the incidence, time of occurrence, and prognostic factors of the development of this syndrome were not analyzed.¹²

This study was designed to analyze the incidence, clinical manifestations, and prognostic factors associated with DS, as well as the short- and long-term outcomes for patients developing this syndrome in a large series of patients with newly diagnosed APL treated with ATRA and idarubicin (AIDA regimen) who were

Submitted July 14, 2008; accepted September 18, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 22, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-07-168617.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

enrolled in 2 consecutive studies by the PETHEMA Group (LPA96 and LPA99). We also analyzed the impact of the different regimens of corticosteroid prophylaxis used in these trials on the development and severity of DS.

Methods

Eligibility

For enrollment in the consecutive PETHEMA LPA96 and LPA99 trials, patients were required to have a diagnosis of de novo APL with demonstration of the t(15;17) or promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor- α (*PML-RARA*) rearrangements, normal hepatic and renal function, no cardiac contraindications to anthracycline chemotherapy, and an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of less than 4. Informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Research Ethics Board of each participating hospital.

Induction therapy

Treatment with ATRA was started as soon as a diagnosis of APL by morphologic criteria was made.^{13,14} Induction therapy consisted of oral ATRA (45 mg/m² per day) divided into 2 daily doses, which was maintained until complete hematologic remission or for a maximum of 90 days, and idarubicin (12 mg/m² per day) given as an intravenous bolus on days 2, 4, 6, and 8 (AIDA regimen). For patients 20 years of age or younger, the ATRA was adjusted to 25 mg/m² per day. Since November 1999 (LPA99 trial), the dose of idarubicin on day 8 has been omitted for patients more than 70 years of age.

Postremission therapy

Details of the consolidation and maintenance therapy have been described elsewhere.¹⁵ Briefly, the first consolidation course consisted of idarubicin (5 mg/m² per day for 4 days), the second of mitoxantrone (10 mg/m² per day for 5 days), and the third of idarubicin (12 mg/m² per day for 1 day). From November 1999 (LPA99 study), intermediate- and high-risk patients, as previously defined,¹⁶ received ATRA (45 mg/m² per day for 15 days) combined with the reinforced single-agent chemotherapy courses. Patients who tested negative for *PML-RARA* at the end of consolidation were started on maintenance therapy with oral mercaptopurine (50 mg/m² per day), intramuscular methotrexate (15 mg/m² per week), and oral ATRA (45 mg/m² per day for 15 days every 3 months) over 2 years.

Management of DS and other supportive measures

Treatment with intravenous dexamethasone at a dose of 10 mg twice daily was started promptly at the very earliest symptom or sign of DS. ATRA was discontinued in cases where there was progression of the clinical symptoms of DS. In the LPA96 trial, patients with a WBC count greater than $5 \times 10^9/L$ (before or during treatment with ATRA) received prophylaxis with dexamethasone (10 mg/12 hours intravenously for 7 days), while in the LPA99 study all patients, regardless of WBC count, received DS prophylaxis with prednisone (0.5 mg/kg per day orally) from days 1 through 15. Diuretics were usually administered to treat acute renal failure and weight gain, and dialysis or venous continuous ultrafiltration was performed at the physicians' discretion. Mechanical ventilation was indicated in some patients with severe acute respiratory failure. Details about the management of coagulopathy, transfusion policy, and other supportive measures have been described elsewhere.¹⁷

Study definitions and endpoints

The remission induction response was assessed according to the criteria recently revised by Cheson et al.¹⁷ A morphologic complete remission (CR) designation requires a patient to have less than 5% blasts and atypical promyelocytes in an aspirate sample, an absolute neutrophil count of more than $10^9/L$ and a platelet

count of more than $100 \times 10^9/L$. The treatment failure group included those patients for whom treatment had failed to achieve a CR. The primary end point of the study was the incidence of DS. Diagnosis of this syndrome was made according to the presence of the following signs and symptoms described by Frankel et al¹: dyspnea, unexplained fever, weight gain greater than 5 kg, unexplained hypotension, acute renal failure, and, particularly, a chest radiograph demonstrating pulmonary infiltrates or pleuropericardial effusion. Patients with 4 or more of the above signs or symptoms were classified as having severe DS, while those with 2 or 3 signs or symptoms were considered to have moderate DS. No single sign or symptom was considered sufficient to make a diagnosis of the syndrome. Patients with alternative explanations for the clinical complex, such as pulmonary hemorrhage, septic shock, pneumonia, or cardiac failure, were considered to not have DS. Death was attributed to DS when death occurred in patients with severe DS and was not explained by infection, hemorrhage, or other causes. DS was defined as "early" when it occurred within 7 days of the start of ATRA, or "late" when it occurred more than 7 days after the start of ATRA.

Data collection and prognostic factors

Data were collected and registered prospectively. Thirty-six patient and disease characteristics documented at the initial evaluation were examined for prognostic factor analysis to establish their relationship to the development of DS. Basic demographic data and clinical characteristics at presentation included age, sex, ECOG score, fever, total body surface, and liver and spleen enlargement. Serum biochemical parameters were creatinine, uric acid, lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase, total bilirubin, and albumin. Peripheral blood (PB) features included hemoglobin level, platelet count, WBC count, and blast cell percentage. Bone marrow aspirate parameters evaluated were cellularity, peroxidase reactivity, blast cell percentage, French-American-British (FAB) subtype, cytogenetics, FLT3-internal tandem duplication (FLT3-ITD) mutations, and *PML-RARA* isoforms. The following surface antigen markers were evaluated by multiparametric flow immunocytometry: CD2, CD7, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD19, CD34, CD56, and CD117. Positivity for a specific antigen was defined as expression of the corresponding surface marker by more than 20% of blast cells. Other variables such as PETHEMA LPA trial (LPA96 vs LPA99), fibrinogen level, and the presence of coagulopathy were also included. Coagulopathy was defined as a prolonged prothrombin time and/or activated partial thromboplastin time in addition to hypofibrinogenemia and/or increased levels of fibrin degradation products or D-dimer. The prognostic impact of DS on induction mortality and risk of relapse was also analyzed.

Statistical methods

Chi-square with Yates' correction, when appropriate, was used to analyze differences in the distribution of variables among patient subsets. The Student *t* test and Mann-Whitney U test were used to compare continuous variables with normal and nonnormal distribution, respectively. *P* values were calculated using the 2-tailed test. Characteristics selected for inclusion in the multivariate analysis were those for which there was some indication of a significant association with DS in univariate analysis ($P < .1$) and, if available, those for which prior studies had suggested a possible relationship. Multivariate analysis was performed using a logistic regression model.¹⁸ Missing data were substituted by the mean values from patients for whom data were available.¹⁹ For univariate comparison, unadjusted time-to-event analyses (relapse-free survival [RFS]) were performed using the Kaplan-Meier estimate,²⁰ as well as log-rank tests and their generalizations.²¹ Patient follow-up was updated in February 2008 and the median follow-up of the cohort was 80 months (range, 29-133 months). Computations were performed using 4F, 3D, LR, 1L, and 2L programs from the BMDP statistical library (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA).²²

Results

Accrual and patient characteristics

Between November 1996 and June 2005, 793 consecutive patients with a genetic diagnosis of APL were registered from 82 institutions in Spain, The Netherlands, Belgium, Argentina, Uruguay, and

Table 1. Initial characteristics of patients with and without differentiation syndrome (DS)

Characteristic	DS		No DS		P	Total	
	Median (range)	No. (%)	Median (range)	No. (%)		Median (range)	No. (%)
Overall		183 (100)		556 (100)			739 (100)
Protocol							
LPA96		53 (29)		122 (22)	.05		175 (24)
LPA99		130 (71)		434 (78)			564 (76)
Age, y	43 (3-78)		39 (2-83)		.04	40 (2-83)	
Younger than 19		17 (9)		67 (12)			84 (11)
19-50		103 (56)		326 (58)			429 (58)
51-60		24 (13)		71 (13)			95 (13)
61-70		24 (13)		63 (11)			87 (12)
Older than 70		15 (8)		29 (5)			44 (6)
Sex							
Male		100 (55)		274 (49)	.21		374 (51)
Female		83 (45)		282 (51)			365 (49)
ECOG performance status	1 (0-3)		1 (0-3)		.32	1 (0-3)	
0-1		123 (72)		389 (76)			512 (75)
2		37 (22)		86 (17)			123 (18)
3		10 (6)		36 (7)			46 (7)
Fever							
No		109 (60)		338 (61)	.71		447 (61)
Yes		73 (40)		212 (38)			285 (39)
WBC count, ×10⁹/L	3.3 (0.4-133)		2.0 (0.2-460)		<.001	2.2 (0.2-460)	
Less than 2		69 (38)		281 (51)			350 (47)
2-5		35 (19)		105 (19)			140 (19)
5-10		16 (9)		46 (8)			62 (8)
10-50		48 (26)		85 (15)			133 (18)
More than 50		15 (8)		38 (7)			53 (7)
Platelet count, ×10⁹/L	20 (1-207)		23 (1-207)		.19	22 (1-207)	
Less than 10		32 (17)		102 (18)			134 (18)
10-40		116 (59)		318 (57)			434 (59)
More than 40		35 (19)		135 (24)			170 (23)
Hemoglobin, g/dL	9.5 (4-16.9)		9.0 (3-15.9)		.12	9.3 (3-16.9)	
Less than or equal to 10		112 (61)		357 (64)			469 (64)
More than 10		71 (39)		196 (36)			269 (36)
Creatinine, mg/dL	1.0 (0.2-2)		0.9 (0.2-2.4)		.03	0.9 (0.2-2.4)	
Less than or equal to 1.4		170 (96)		532 (99)			702 (98)
More than 1.4		7 (4)		7 (1)			14 (2)
Albumin, mg/dL	4.0 (2.3-6.7)		4.0 (1.7-6.2)		.99	4.0 (1.7-6.7)	
Less than or equal to 3.5		34 (23)		93 (21)			127 (21)
More than 3.5		134 (77)		356 (79)			470 (79)
Coagulopathy							
No		31 (17)		140 (25)	.02		171 (23)
Yes		151 (83)		412 (75)			563 (77)
FAB subtype							
Hypergranular		143 (78)		455 (83)	.11		598 (82)
Microgranular		40 (22)		91 (17)			131 (18)
PML-RARA isoform							
BCR1/BCR2		90 (55)		292 (59)	.35		382 (58)
BCR3		73 (45)		200 (41)			271 (42)

the Czech Republic (the names of the institutions and clinicians involved are listed in the Appendix, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Forty-two patients (5%, 8 [4%] in the LPA96 and 34 [6%] in the LPA99 trials) were considered ineligible for the treatment because their severe clinical condition contraindicated the administration of chemotherapy. Thus, 751 patients who met the previously defined entry criteria were enrolled in the LPA96 and LPA99 studies. Twelve patients (5 of 180 in the LPA96 trial and 7 of 571 in the LPA99 trial) were not evaluated because of protocol violations during induction therapy. Details of ineligible and nonevaluable patients are described elsewhere.¹² LPA96 and LPA99 patients were comparable for all the baseline characteristics except for sex

and serum albumin levels (female sex and low albumin levels were more frequent in the LPA99 trial; both $P = .01$).

Incidence and characteristics of patients with DS

Overall, 183 of 739 patients (24.8%) experienced DS; 93 (12.6%) were severe cases and 90 (12.2%) were moderate cases. In 33 patients (4.5%) with possible DS, an unambiguous diagnosis of DS could not be made. This was due to the presence of concurrent medical problems that could explain the clinical manifestations. These problems were pulmonary hemorrhage in 13 patients, pneumonia in 8, congestive heart failure in 6, renal failure in 3, and septic shock in 3.

Table 2. Clinical signs and symptoms of moderate and severe DS

Clinical signs and symptoms	Frequency of the different clinical signs and symptoms according to the type of DS					P†
	Moderate DS (n = 90), no. (%)	Severe DS (n = 93), no. (%)	P*	Early severe DS (n = 43), no. (%)	Late severe DS (n = 43), no. (%)	
Dyspnea	53 (59)	88 (95)	<.001	48 (96)	40 (93)	.53
Pulmonary infiltrates per X-ray	34 (38)	75 (81)	<.001	43 (86)	32 (74)	.16
Edema	48 (53)	75 (81)	.001	42 (84)	33 (77)	.38
Unexplained fever	48 (53)	69 (74)	.003	34 (68)	35 (81)	.14
Weight gain of more than 5 kg	34 (38)	63 (68)	<.001	37 (80)	26 (67)	.15
Pleural effusion	24 (27)	54 (58)	<.001	32 (64)	22 (51)	.21
Renal failure	8 (9)	43 (46)	<.001	19 (40)	24 (57)	.12
Hypotension	11 (12)	36 (39)	<.001	13 (26)	23 (53)	.007
Pericardial effusion	10 (11)	21 (23)	.04	8 (16)	13 (30)	.10

*P value comparing severe DS versus moderate DS.

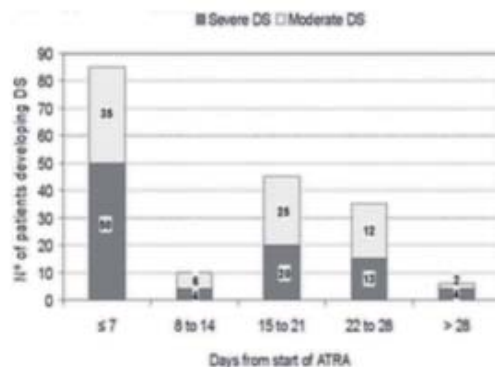
†P value comparing early severe DS versus late severe DS.

Table 1 shows that age, serum creatinine levels, and WBC counts were higher among patients who developed DS than among those who did not ($P = .04$, $P = .03$, and $P < .001$, respectively). Patients with DS presented more frequently with coagulopathy ($P = .02$).

Clinical manifestations and timing of DS

The most frequent clinical manifestations of severe DS were dyspnea (95%), pulmonary infiltrates (81%), unexplained fever (74%), weight gain of more than 5 kg (68%), pleural effusion (58%), and renal failure (46%). The frequencies of these symptoms were considerably lower in moderate than in severe DS (Table 2). As shown in Table 2, the frequency of hypotension in late severe DS was significantly higher than in early severe DS ($P = .007$), whereas the frequencies of other signs and symptoms did not differ significantly between patients with late and early severe DS.

DS occurred at a median of 12 days after starting ATRA treatment (range, 0-46 days). Severe DS occurred comparatively early, at a median of 6 days, while moderate DS appeared after a median of 15 days. A bimodal time distribution of the peak incidence of DS was observed (Figure 1) in both moderate and severe DS. The first peak occurred during the first week of ATRA treatment in 47% of patients, and the second peak of new cases of DS was seen in the third week (25% of patients). During the second week, only 5% of new cases of DS were noted. DS continued to develop in some patients in the fourth week (19%) and after day 29 (3%).

**Figure 1. Time to occurrence of moderate and severe differentiation syndrome.**

Outcomes of DS

A total of 667 of the 739 evaluable patients achieved morphologic CR (90.3%; 95% confidence interval [CI], 88.0%-92.4%). Of the 72 induction failures, 66 patients died during induction and the remaining 6 patients were registered by their physicians as having resistant leukemia. These 6 patients were prematurely assessed as having disease refractory to induction treatment (on days 18-33 after chemotherapy), according to the classical morphologic criteria for AML. In the 6 patients, DS had been noted late (onset on days 12, 13, 15, and 15) and early (in 2 patients on day 5).

The development of moderate DS had no impact on the death rate during induction (6% with moderate DS vs 7% with no DS, $P = .82$), but severe DS was associated with a higher death rate during induction (26% with severe DS vs 7% with no DS, $P < .001$). The induction mortality was 40% in patients with early severe DS (Table 3). The DS-associated mortality was 11% in patients with severe DS, while no deaths resulted from moderate DS. Ten deaths related to DS occurring during induction have been described in detail elsewhere.¹² Hemorrhage-associated mortality was also higher in patients who developed severe DS than in those with moderate DS or no DS (11% vs 6% vs 4%, respectively, $P = .02$).

Intravenous dexamethasone was administered in 90% of patients with severe DS and 82% of patients with moderate DS (Table 3). ATRA was temporarily discontinued in 64% of patients with severe DS and 60% of patients with moderate DS. Diuretics, dialysis, and mechanical ventilation were more frequently used in patients with severe DS than in those with moderate DS. Patients with severe DS required more plasma, platelet, and red blood cell transfusions during induction.

Table 3 shows that severe DS was significantly associated with higher frequencies of thrombosis and grade 3 or 4 hepatotoxicity during induction, as compared with no DS or moderate DS cases ($P = .008$ for thrombosis and $P = .01$ for grade 3 or 4 hepatotoxicity). Time to neutrophil recovery was significantly shorter in patients with severe DS ($P = .003$). Patients with severe DS, especially those with late DS, spent more days in the hospital during induction treatment ($P = .06$).

Prognostic factors for DS

Factors predicting moderate DS. The univariate analysis of prognostic factors identified the following characteristics as significantly associated with moderate DS: high WBC count at presentation, with $10 \times 10^9/L$ as the most significant cutoff point; LDH

Table 3. Management, complications, and outcomes of moderate and severe DS

	No DS (n = 556)	Moderate DS (n = 90)	Overall (n = 93)	P*	Early severe DS (n = 50)	Late severe DS (n = 43)	P†
Management of DS							
ATRA withdrawal, no. (%)	87 (16)	54 (60)	60 (64)	< .001	39 (78)	21 (49)	.003
ATRA duration shorter than 30 days, no. (%)‡	100 (26)	36 (49)	36 (60)	< .001	11 (48)	15 (68)	.87
Intravenous dexamethasone, no. (%)	90 (16)	74 (82)	84 (90)	< .001	46 (92)	38 (88)	.55
Diuretics, no. (%)	NA	60 (67)	61 (67)	.001	43 (86)	38 (88)	.73
Dialysis, no. (%)	NA	1 (1)	11 (12)	.003	8 (16)	3 (7)	.18
Mechanical ventilation, no. (%)	NA	7 (8)	24 (26)	.002	18 (36)	6 (14)	.02
Outcome and complications of DS							
Death during induction, no. (%)	37 (7)	5 (6)	24 (26)	< .001	20 (40)	4 (9)	.001
Death due to DS, no. (%)	0 (0)	0 (0)	10 (11)	< .001	8 (16)	2 (5)	.08
Death due to hemorrhage, no. (%)	22 (4)	5 (6)	10 (11)	.02	9 (18)	1 (2)	.04
Death due to infection, no. (%)	14 (2)	0 (0)	3 (3)	.27	2 (4)	1 (2)	.99
Thrombosis during induction, no. (%)	18 (3)	3 (3)	9 (10)	.008	5 (10)	4 (9)	.91
Grade 3-4 hepatotoxicity,§ no. (%)	24 (5)	5 (6)	11 (14)	.01	5 (12)	6 (15)	.65
Hospital days during induction, mean‡	35.7	34.4	38.2	.06	35.6	40.4	.06
Days to PMNs greater than $1 \times 10^9/L$, mean‡	23.5	21.6	20.0	.003	20.5	19.7	.61
Days to platelets greater than $50 \times 10^9/L$, mean‡	18.7	17.8	19.9	.11	19.3	20.5	.35
Transfused platelet units during induction, mean‡	40.7	44.5	58.9	.007	60.2	57.8	.98
Transfused plasma units during induction, mean‡	4.4	10.1	12.7	< .001	19.1	6.5	.01
Transfused RBC units during induction, mean‡	9.2	10.3	12.3	< .001	13.1	11.7	.92

PMNs indicates neutrophils; RBC, red blood cell; and NA, not available.

*P value comparing severe DS versus moderate DS versus no DS.

†P value comparing early severe DS versus late severe DS.

‡Excluding patients who did not achieve complete remission.

§World Health Organization gradation scale.

greater than the upper laboratory normal (ULN) values; and PB blasts greater than 70% (Table 4).

Multivariate analysis identified a WBC count greater than $10 \times 10^9/L$ as an independent prognostic factor for moderate DS ($P = .039$; Table 5).

Factors predicting severe DS. Univariate analysis identified the following prognostic factors as regards severe DS: high WBC count at presentation, with $5 \times 10^9/L$ as the most significant cutoff point; abnormal levels of serum creatinine; FLT3-ITD mutations; microgranular FAB subtype; short *PML-RARA* isoform; and male sex (Table 4).

Upon multivariate analysis, abnormal levels of serum creatinine ($P = .004$), WBC count greater than $5 \times 10^9/L$ ($P = .021$), and treatment with the LPA96 protocol ($P = .044$) remained independent prognostic factors for severe DS (Table 5).

Risk of relapse of APL in patients developing DS

The overall 7-year RFS in patients with and without DS was 85% and 87%, respectively ($P = .31$; Figure 2A). Patients developing severe DS showed a significantly lower 7-year RFS in the LPA96 trial (60% vs 85%, $P = .003$; Figure 2B). This difference was not apparent for patients treated on the LPA99 trial (86% vs 88%; $P = .54$; Figure 2C). None of the 10 patients who had central nervous system relapse had previously experienced DS.

Discussion

This study shows that roughly one quarter of patients with APL undergoing induction therapy with the AIDA regimen develop DS, with an equal distribution of the moderate and severe forms of DS. Patients with moderate DS showed the same treatment outcome in terms of mortality during induction and relapse probability. Severe DS was associated with increased mortality during induction. A bimodal time

distribution of incidence of both moderate and severe DS was observed, with peaks in the first and third week of ATRA treatment. A lower overall incidence of severe DS was observed in patients enrolled in the LPA99 trial, who systematically received prophylaxis with prednisone from the initiation of ATRA treatment for 15 days, as compared with those treated in the LPA96 trial, who received selective prophylaxis with intravenous dexamethasone when the WBC count was more than $5 \times 10^9/L$ (before or during treatment with ATRA). A WBC count greater than $5 \times 10^9/L$ and serum levels of creatinine greater than 1.4 mg/dL at diagnosis were identified as 2 independent factors predicting the development of severe DS. The development of severe DS correlated with a higher risk of relapse, but evidence of this relationship was restricted entirely to patients treated in the LPA96 trial, as it was not apparent in patients treated with the LPA99 protocol. It should be noted that patients with intermediate and high risks of relapse in the latter protocol received ATRA and a reinforced dose of idarubicin for consolidation, which may have contributed to the reduced relapse rate.

The variation in the incidence of DS associated with induction therapy in APL that has been previously reported is quite wide with a range from 2% to 27%.¹⁻¹⁰ The impact of DS on the treatment outcomes as reported has also varied. Differences in the effects of DS between studies could be a result of several factors. The most likely explanation for different results relates to the lack of consensus in the definition, grading, and classification of the syndrome. Furthermore, the concurrent use of chemotherapy with ATRA in some but not other studies has probably determined differences in the incidence and severity of DS. In this respect, the results of a randomized study that focused on patients with low WBC counts ($\leq 5 \times 10^9/L$)¹¹ and several nonrandomized studies^{9,23,24} strongly suggest that the concurrent use of ATRA and chemotherapy decreases the incidence of DS. The GIMEMA group,⁹ using the AIDA regimen, reported the low incidence of DS of 2.5% (6 of 240 patients) but their definition of DS was notably different. They established a diagnosis of severe DS according to

Table 4. Incidence of moderate and severe DS according to baseline characteristics of patients (univariate analysis)

Characteristic	No. of patients	Moderate DS		Severe DS	
		No. (%)	P	No. (%)	P
Overall	739	90 (12.2)		93 (12.6)	
Protocol					
LPA 96	175	24 (13.7)	.48	29 (16.6)	.07
LPA 99	564	66 (11.7)		64 (11.3)	
Age, y					
Younger than 19	84	9 (10.7)	.16*	8 (9.5)	.29†
19-50	429	54 (12.6)		49 (11.4)	
51-60	95	6 (6.3)		18 (18.9)	
61-70	87	12 (13.8)		12 (13.8)	
Older than 70	44	9 (20.5)		6 (13.6)	
Sex					
Male	374	44 (11.8)	.74	56 (15.0)	.05
Female	365	46 (12.6)		37 (10.1)	
ECOG performance status					
0-1	512	62 (12.1)	.74	61 (11.9)	.31
2	123	16 (13.0)		21 (17.1)	
3	46	4 (8.7)		6 (13.0)	
Fever					
No	447	56 (12.4)	.81	53 (11.8)	.47
Yes	285	34 (11.9)		39 (13.7)	
WBC count, ×10⁹/L					
Less than 2	350	37 (10.6)	.15‡	32 (9.1)	.06§
2-5	140	16 (11.4)		19 (13.6)	
5-10	62	6 (9.7)		10 (16.1)	
10-50	133	25 (18.8)		23 (17.4)	
More than 50	53	6 (11.3)		9 (17.0)	
Platelets, ×10⁹/L					
Less than 10	134	14 (10.4)	.64	18 (13.4)	.36
10-40	434	57 (13.1)		59 (13.6)	
More than 40	170	19 (11.2)		16 (9.4)	
Coagulopathy					
No	171	14 (8.2)	.08	17 (9.9)	.24
Yes	563	76 (13.5)		75 (13.3)	
Creatinine, mg/dL					
Less than or equal to 1.4	702	86 (12.3)	.87	84 (12.0)	.002
More than 1.4	14	1 (7.1)		6 (42.9)	
Albumin, mg/dL					
Less than or equal to 3.5	127	14 (11.0)	.68	20 (15.7)	.32
More than 3.5	470	58 (12.3)		56 (11.9)	
LDH × ULN					
Less than or equal to 1	347	29 (8.4)	.004	36 (11.0)	.21
More than 1	347	59 (15.9)		49 (14.1)	
FAB subtype					
Hypergranular	598	74 (12.4)	.99	69 (11.5)	.05
Microgranular	131	16 (12.3)		24 (18.3)	
PML-RARA isoform					
BCR1/BCR2	382	51 (13.4)	.45	39 (10.2)	.05
BCR3	273	31 (11.4)		42 (15.4)	
Blasts, % of PB					
Less than or equal to 70	494	52 (10.5)	.02	61 (12.3)	.33
More than 70	184	31 (16.8)		28 (15.2)	
FLT3-ITD					
Negative	224	29 (12.9)	.86	26 (12.6)	.05
Positive	66	8 (12.1)		14 (24.6)	
CD2					
Negative	107	44 (13.1)	.29	43 (12.8)	.61
Positive	337	19 (17.8)		11 (10.3)	

ULN indicates upper laboratory normal (values).

*Age > 70 years versus age ≤ 70 years (20.6% versus 11.7%, *P* = .09).†Age > 50 years versus age ≤ 50 years (15.9% versus 11.1%, *P* = .07).‡WBC > 10 × 10⁹/L versus WBC ≤ 10 × 10⁹/L (16.7% versus 10.7%, *P* = .03).§WBC > 5 × 10⁹/L versus WBC ≤ 5 × 10⁹/L (16.9% versus 10.4%, *P* = .01).||Platelets > 40 × 10⁹/L versus platelets ≤ 40 × 10⁹/L (13.6% versus 9.4%, *P* = .15).

Table 4. Incidence of moderate and severe DS according to baseline characteristics of patients (univariate analysis) (continued)

Characteristic	No. of patients	Moderate DS		Severe DS	
		No. (%)	P	No. (%)	P
CD11b					
Negative	296	33 (11.1)	.69	34 (11.5)	.74
Positive	41	6 (14.6)		6 (14.6)	
CD13					
Negative	38	5 (13.2)	.99	3 (7.9)	.49
Positive	478	62 (13.0)		63 (13.2)	
CD15					
Negative	322	46 (14.3)	.50	37 (11.5)	.59
Positive	140	16 (11.4)		13 (9.3)	
CD56					
Negative	352	49 (13.9)	.99	39 (11.1)	.45
Positive	43	6 (14.0)		7 (16.3)	
CD34					
Negative	439	56 (12.8)	.18	52 (11.8)	.64
Positive	91	17 (18.7)		13 (14.3)	

ULN indicates upper laboratory normal (values).

*Age > 70 years versus age ≤ 70 years (20.0% versus 11.7%, *P* = .06).

†Age > 50 years versus age ≤ 50 years (15.9% versus 11.1%, *P* = .07).

‡WBC > 10 × 10⁹/L versus WBC ≤ 10 × 10⁹/L (16.7% versus 10.7%, *P* = .03).

§WBC > 5 × 10⁹/L versus WBC ≤ 5 × 10⁹/L (16.9% versus 10.4%, *P* = .01).

||Platelets > 40 × 10⁹/L versus platelets ≤ 40 × 10⁹/L (13.6% versus 9.4%, *P* = .15).

the presence of 5 of the 7 signs and symptoms as originally described by Frankel et al.¹ As a matter of fact, when we apply the same definition to our series of 739 patients, we calculate a similar incidence of 2.6%. In other published studies of concurrent ATRA/chemotherapy regimens, greater incidences of DS have been reported (11% to 16%), but the diagnostic criteria for the syndrome often were not specifically defined^{23,24} or the diagnostic criteria were less strict (3 of 7 signs and symptoms).¹⁰ In the present study, we first assessed the most discriminating cutoff value for predicting outcomes. We then classified the DS as moderate or severe according to the presence of 2 to 3, or more than 3 of the 7 signs and symptoms, respectively. This distinction allowed for the assessment of the different prognostic significance of severe DS. The development of severe but not moderate DS appeared to be associated with an increased mortality. Interestingly, apart from a proportion of patients who died in the context of severe DS with apparently no other contributing cause of death, this complication was also associated with death resulting from hemorrhage. In line with this finding, a Japanese group²⁵ reported that patients with DS were more prone to develop severe hemorrhage during induction. In the present study, we found that severe DS, especially early DS, was associated with coagulopathy and a higher use of plasma, platelet, and red blood cell transfusions during induction. The exacerbation of the procoagulant state of APL that can be observed with the development of DS²⁶⁻²⁹ may lead not only to an increased risk of hemorrhage but also to a higher incidence of thrombosis. This association of DS and activated procoagulation is also evident in the present study. On the other hand, as far as we know, a shorter

period of neutropenia has not previously been reported, while the association of severe DS with an increased rate of grades 3 and 4 hepatotoxicity was also noted in the early study by Frankel et al.¹ The bimodal peak of incidence that we observed in the first and third week of ATRA treatment in both moderate and severe DS is remarkable. It should be noted that cases of early severe DS more frequently required mechanical ventilation and were associated with higher mortality during induction than those occurring during the third week or beyond. In addition, early severe DS was characterized by a higher frequency of pulmonary infiltrates and weight gain, probably related to an initial rise in leukocytosis and fluid overload. In contrast, hypotension, unexplained fever, pericardial effusion, and renal failure were more frequent in late severe DS. We should emphasize that in this situation distinguishing between DS and other clinical complications, particularly sepsis, may be difficult. Therefore, in these cases, treatment of DS should be complemented with therapeutic measures addressing alternative diagnoses that could also explain the symptoms.

The study of prognostic factors for DS in patients treated with ATRA plus chemotherapy has scarcely been addressed in the literature. A study by the European APL Group¹⁰ analyzed prognostic factors of DS in a significant number of patients who were randomized to receive either ATRA followed by chemotherapy or both simultaneously. That study did not reveal any significant prognostic factor for DS (defined as the presence of at least 3 of 7 clinical manifestations) in any of the treatment arms. In the current study, we report several pretreatment variables predictive of the severe form of the syndrome,

Table 5. Multivariate analysis of factors predicting the occurrence of DS

Covariate	Unfavorable category	Overall DS		Moderate DS		Severe DS	
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
WBC count	> 5 × 10 ⁹ /L					1.8 (1.1-2.7)	.021
WBC count	> 10 × 10 ⁹ /L	1.85 (1.3-2.7)	.012	1.7 (1.04-2.7)	.039		
Creatinine	> 1.4 mg/dL					5.8 (1.9-16.9)	.004
Protocol	LPA96					1.7 (1.04-2.7)	.044

OR indicates odds ratio

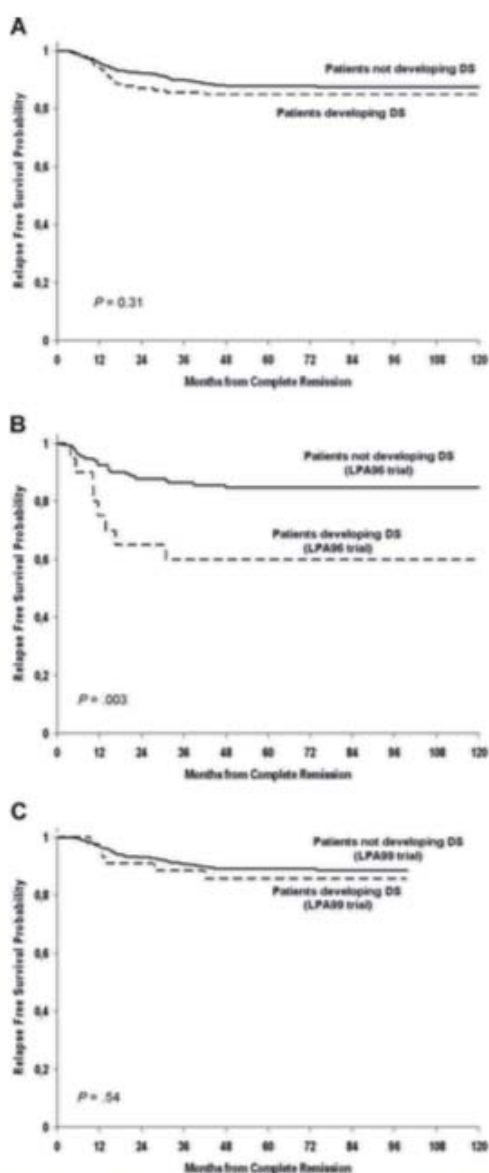


Figure 2. Kaplan-Meier estimates of relapse-free survival depending on development of differentiation syndrome during induction. (A) In both PETHEMA LPA96 and LPA99 trials; (B) in the PETHEMA LPA96 trial; (C) in the PETHEMA LPA99 trial.

including WBC count ($> 5 \times 10^9/L$), abnormal serum creatinine levels, the FLT3-ITD mutation, the microgranular FAB subtype, the short *PML-RARA* isoform, and male sex. The significant variables were reduced to WBC counts and serum creatinine levels in multivariate analysis. None of these factors have been previously reported as predictive of DS. With regard to an abnormal levels of serum creatinine as an independent predictive factor of severe DS, this finding should be cautiously

interpreted due to the small proportion of patients who had this clinical complication (6 of 90 patients with this data available who developed the severe form of the syndrome). Renal failure due, in part, to the capillary leak syndrome caused by cytokine release in DS may explain the association between high serum creatinine and severe DS. On the other hand, results of the US Intergroup study indicated that the microgranular subtype of APL protected against the development of DS.⁹ Patients in that study, however, had been treated with ATRA alone. With respect to presenting WBC counts, the European APL trial showed that patients with greater than $5 \times 10^9/L$ and DS tended to need mechanical ventilation more frequently than those with lower WBC counts and DS, but this was not statistically significant and the WBC count was not associated with the development of DS.¹⁰ Apart from a mere statistical finding, we have no explanation for the paradoxical lower cutoff point of presenting WBC counts to predict severe DS ($5 \times 10^9/L$) compared with moderate DS ($10 \times 10^9/L$). Clinical and experimental studies have suggested an association between the development of DS and the expression of adhesion molecules such as CD13² and CD11b.^{30,31} We found no relationship between the expression of any of the surface markers analyzed and the development of DS.

Although the preemptive use of corticosteroids at the earliest clinical manifestations of DS has been adopted as the standard management,³² their use as prophylaxis is more controversial. The only available evidence supporting the use of corticosteroid prophylaxis is based on a study by Wiley and Firkin⁷ that was performed in 19 patients treated with ATRA alone. This study showed a reduction in pulmonary toxicity by administration of prednisone when the WBC count rose above $10 \times 10^9/L$. Probably based on these results, several trials have included prophylaxis with dexamethasone in patients with more than 5 to $10 \times 10^9/L$.^{23,33} We compared the outcome following a preemptive prophylactic strategy as used in the PETHEMA LPA96 trial with the systematic prophylactic approach of the LPA99 trial, in which all patients received prednisone from the start of ATRA, regardless of WBC count. The retrospective analysis demonstrated a statistically significant reduction in the incidence of severe DS, but not in DS-related mortality,¹² in relation to the systematic use of prednisone during an early 15 day interval.

The European APL Group has reported an increased relapse rate in patients developing DS.^{10,11} We have confirmed this finding in patients developing severe DS treated according the LPA96 trial, but not in those enrolled in the LPA99 trial. In the latter trial, however, patients with intermediate and high risks of relapse received ATRA and a reinforced dose of idarubicin for consolidation, which may have contributed to the reduced relapse rate. Finally, we found no association between DS and central nervous system relapse, as suggested by others.^{10,34}

In conclusion, DS is a relatively frequent and serious complication in patients with APL undergoing induction with ATRA plus chemotherapy. Prophylaxis with prednisone has no impact on reducing mortality resulting from DS, but it is likely to reduce the incidence of severe DS. Although the question of whether the use of corticosteroid prophylaxis is advantageous should be definitively settled in randomized studies, this strategy can be considered in patients treated with ATRA plus chemotherapy, particularly taking into account that infectious mortality was not apparently increased when prednisone prophylaxis was systematically used.¹² Due to the association of severe DS with an increase in morbidity and mortality during induction, risk-adapted strategies focused on patients with adverse

risk factors (WBC counts $> 5 \times 10^9/L$; abnormal levels of serum creatinine) deserve further research.

Acknowledgments

The authors thank Miguel Priego for data collection and management.

This study was supported in part by the Fundación para la Investigación Hospital Universitario La Fe-Ayudas Bancaja (grant 2006/0137), Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD06/0020/0031) Valencia, Spain.

A complete list of the institutions and clinicians involved in this study can be found in the Appendix, available on the *Blood* website.

References

- Frankel SR, Eardley A, Lauwers G, Weiss M, Warrell R. The 'retinoic acid syndrome' in acute promyelocytic leukemia. *Ann Intern Med*. 1982; 117:292-296.
- Vahdat L, Maslak P, Miller WH Jr, et al. Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RAR-alpha isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid. *Blood*. 1994;84:3843-3849.
- Cortes JE, Kantarjian H, O'Brien S, et al. All-trans retinoic acid followed by chemotherapy for salvage of refractory or relapsed acute promyelocytic leukemia. *Cancer*. 1994;73:2946-2952.
- Avvisati G, Lo Coco F, Diverio D, et al. AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. *Blood*. 1996;88:1390-1396.
- Kanamaru A, Takemoto Y, Tanimoto M, et al. All-trans retinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: Japan Adult Leukemia Study Group. *Blood*. 1995;85:1202-1206.
- Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S, et al. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: results of a multicenter randomized trial. *European APL 91 Group*. *Blood*. 1993;82:3241-3249.
- Wiley JS, Firkin FC. Reduction of pulmonary toxicity by prednisolone prophylaxis during all-trans retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia: Australian Leukemia Study Group. *Leukemia*. 1995;9:774-778.
- Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al. Clinical description of 44 patients with acute promyelocytic leukemia who developed the retinoic acid syndrome. *Blood*. 2000;95:90-95.
- Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, et al. Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy: Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood*. 1997;90:1014-1021.
- De Botton S, Dombret H, Sanz M, et al. Incidence, clinical features, and outcome of all-trans retinoic acid syndromes in 413 cases of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1996;82:2712-2718.
- De Botton S, Chevret S, Coiteux V, et al. Early onset of chemotherapy can reduce the incidence of ATRA syndrome in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) with low white blood cell counts: results from APL 93 trial. *Leukemia*. 2003;17:339-342.
- De la Serna J, Montesinos P, Vellenga E, et al. Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin. *Blood*. 2008;111:3395-3402.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*. 1976;33:451-461.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. A variant form of hypergranular promyelocytic leukemia (M3). *Ann Intern Med*. 1980;92:280-288.
- Sanz MA, Martín G, González M, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monotherapy: a multicenter study by the PETHEMA Group. *Blood*. 2004;103:1237-1243.
- Sanz MA, Lo Coco F, Martín G, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*. 2000;96:1247-1253.
- Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:4642-4649.
- Cox DR. *Analysis of Binary Data*. London, United Kingdom: Methuen; 1970.
- Lee ET. *Statistical Methods for Survival Data Analysis*. Belmont, CA: Wadsworth; 1980.
- Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-481.
- Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B*. 1972;34:187-220.
- Dixon WJ. *BMDP Statistical Software*. Berkeley, CA: University of California Press; 1990.
- Adès L, Chevret S, Raffoux E, et al. Is cytarabine useful in the treatment of acute promyelocytic leukemia? Results of a randomized trial from the European Acute Promyelocytic Group. *J Clin Oncol*. 2006;24:5703-5710.
- Lengfelder E, Reichert A, Schoch C, et al. Double induction strategy including high dose cytarabine in combination with all-trans retinoic acid: effects in patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: German AML Cooperative Group. *Leukemia*. 2000;14:1362-1370.
- Yanada M, Matsushita T, Asou N, et al. Severe hemorrhagic complications during remission induction therapy for acute promyelocytic leukemia: incidence, risk factors, and influence on outcome. *Eur J Haematol*. 2007;78:213-219.
- Falanga A, Rickles FR. Pathogenesis and management of the bleeding diathesis in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003;16:463-482.
- Tallman MS, Lefebvre P, Baine RM, et al. Effects of all-trans retinoic acid or chemotherapy on the molecular regulation of systemic blood coagulation and fibrinolysis in patients with acute promyelocytic leukemia. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1341-1350.
- Di Noto R, Schiavone EM, Ferrara F, et al. All-trans retinoic acid promotes a differential regulation of adhesion molecules on acute myeloid blast cells. *Br J Haematol*. 1996;88:247-255.
- Larson RS, Brown DC, Sklar LA. Retinoic acid induces aggregation of the acute promyelocytic leukemia cell line NB-4 by utilization of LFA-1 and ICAM-2. *Blood*. 1997;90:2747-2756.
- Wu JJ, Cantor A, Moscinski LC. $\beta 2$ Integrins are characteristically absent in acute promyelocytic leukemia and rapidly upregulated in vivo upon differentiation with all-trans retinoic acid. *Leuk Res*. 2007;31:49-57.
- Cunha De Santos G, Tamarozzi MB, Sousa RB, et al. Adhesion molecules and differentiation syndrome: phenotypic and functional analysis of the effect of ATRA, As2O3, phenylbutyrate, and G-CSF in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2007;92:1615-1622.
- Sanz MA, Tallman MS, Lo-Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005;10:3019-3025.
- Sanz MA, Martín G, Rayón C, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RAR α -positive acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:3015-3021.
- Ko BS, Tang JL, Chen YC, et al. Extramedullary relapse after all-trans retinoic acid treatment in acute promyelocytic leukemia: the occurrence of retinoic acid syndrome is a risk factor. *Leukemia*. 1999;13:1406-1408.

Authorship

Contribution: P.M., M.S., and J.B. conceived the study and analyzed and interpreted the data; P.M., M.S., J.B., and B.L. wrote the manuscript; P.M. performed the statistical analyses; and E.V., C.R., R.P., A.L., J.E., J.S., G.M., G.D., C.R., M.G., M.T., J.D.M., J.D.G., S.N., E.A., and S.B. included data of patients treated in their institutions, reviewed the manuscript, and contributed to the final draft.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Miguel A. Sanz, Head of Hematology Department, University Hospital La Fe, Avenida Campanar 21, 46009 Valencia, Spain; e-mail: msanz@uv.es.

6.3 Artículo 3

Barragán E, Montesinos P, Camos M, González M, Calasanz MJ, Román-Gómez J, Gómez-Casares MT, Ayala R, López J, Fuster Ó, Colomer D, Chillón C, Larrayoz MJ, Sánchez-Godoy P, González-Campos J, Manso F, Amador ML, Vellenga E, Lowenberg B, Sanz MA.

Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy.

Haematologica. 2011 Oct;96(10):1470-7.

RESUMEN

Las mutaciones del gen Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3) son frecuentes en la LPA, pero su valor pronóstico no está establecido. En este estudio se evaluaron las características clínicas y biológicas asociadas a las mutaciones FLT3-internal tandem duplication (FLT3-ITD) y FLT3-D835, así como su impacto pronóstico, en pacientes con LPA de nuevo diagnóstico. Los pacientes recibieron inducción y consolidación con esquemas basados en la combinación de ATRA y antraciclina en el contexto de dos ensayos consecutivos del grupo PETHEMA entre 1996 y 2005 (LPA96 y LPA99).

Las mutaciones de FLT3-ITD y de FLT3-D835 se analizaron en 306 (41%) y 213 (29%) de los 739 pacientes incluidos, respectivamente. Sesenta y ocho (22%) y 20 (9%) de los pacientes presentaron mutaciones FLT3-ITD y FLT3-D835, respectivamente. La mutación FLT3-ITD se correlacionó con mayor recuento de leucocitos y de blastos, lactato deshidrogenasa elevada, fiebre, hemorragia, coagulopatía, isoforma BCR3, morfología M3v y expresión de los siguientes antígenos de superficie en los blastos leucémicos: CD2, CD34, HLA-DR y CD11b. La mutación de FLT3-D835 no se asoció significativamente con ninguna característica clínica o biológica.

El análisis univariante mostró mayor recaída y peor supervivencia en pacientes con mutación FLT3-ITD (Figura 1), mientras que no se observó ningún efecto en relación con FLT3-D835. El valor pronóstico de la FLT3-ITD no se mantuvo en el análisis multivariante. Tampoco se observó ningún efecto peyorativo en la supervivencia libre de recaída respecto a la ratio o a la longitud de las mutaciones FLT3-ITD, como algunos estudios previos habían sugerido (Figura 2).

Figura 1. Análisis univariante: efecto de las mutaciones FLT3-ITD sobre la supervivencia libre de recaída.

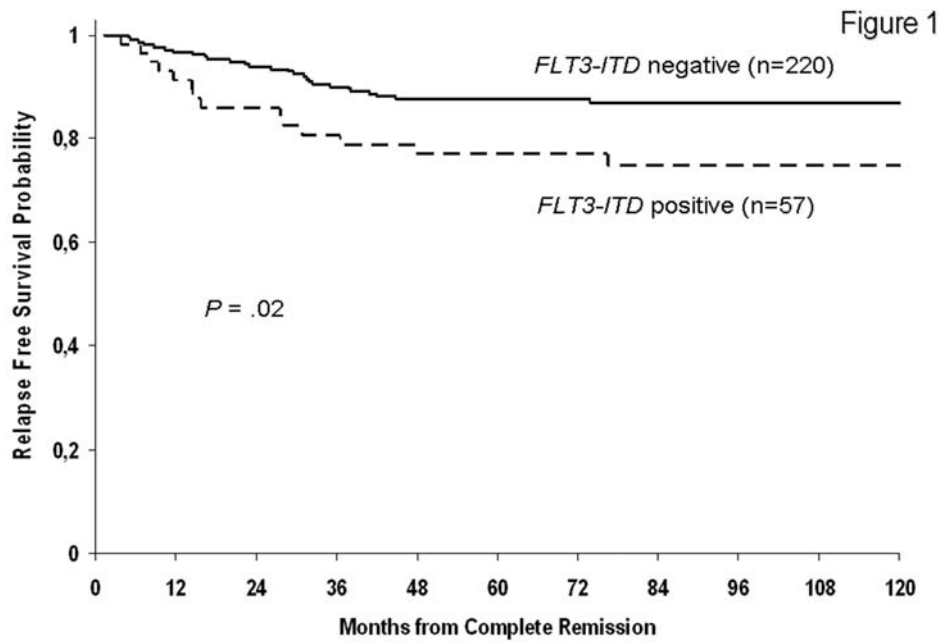
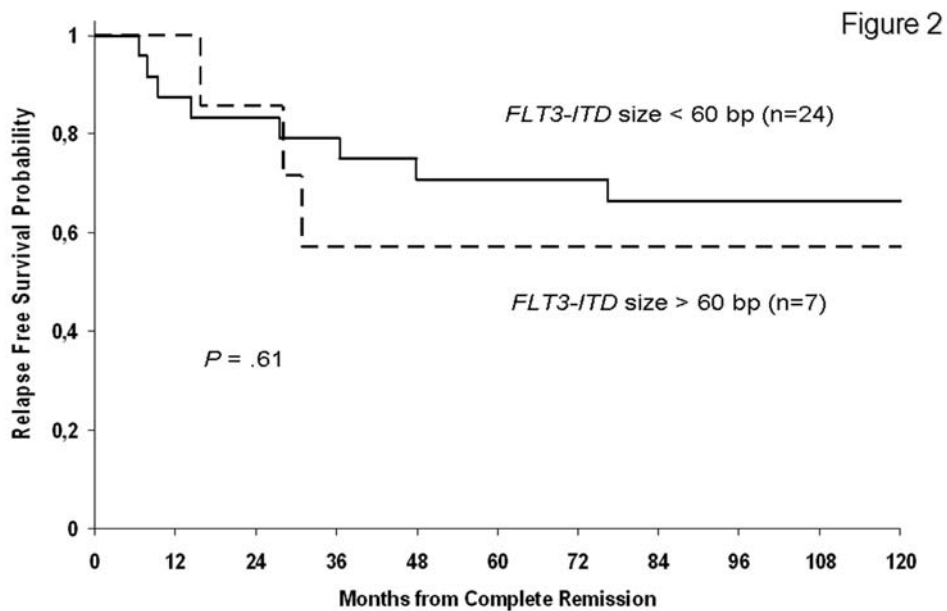


Figura 2. Efecto de la longitud en pares de bases de la mutación FLT3-ITD sobre la supervivencia libre de recaída.



Las mutaciones FLT3-ITD se asociaron con varias características hematológicas en la LPA, en particular con leucocitosis, pero no se pudo demostrar un valor pronóstico independiente en pacientes con LPA tratada con regímenes basados en ATRA más antraciclina.

Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. *Haematologica*. 2011 Oct;96(10):1470-7.

Original Articles

Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy

Eva Barragán,¹ Pau Montesinos,^{1,2} Mireia Camos,³ Marcos González,⁴ María J. Calasanz,⁵ José Román-Gómez,⁶ María T. Gómez-Casares,⁷ Rosa Ayala,⁸ Javier López,⁹ Óscar Fuster,¹ Dolores Colomer,¹ Carmen Chillón,⁷ María J. Larrayoz,⁸ Pedro Sánchez-Godoy,¹⁰ José González-Campos,¹¹ Félix Manso,¹² María L. Amador,¹³ Edo Vellenga,¹⁴ Bob Lowenberg,¹⁵ and Miguel A. Sanz,^{1,16} on behalf of the PETHEMA and HOVON Groups

¹Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ²Department of Medicine of the Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁴Hospital Universitario, Salamanca, Spain; ⁵Hospital Universitario Navarra, Pamplona, Spain; ⁶Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain; ⁷Hospital Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ⁸Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁹Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ¹⁰Hospital Severo Ochoa, Leganés, Spain; ¹¹Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; ¹²Hospital General, Albacete, Spain; ¹³Hospital Montecelo, Pontevedra, Spain; ¹⁴University Hospital, Groningen, The Netherlands; ¹⁵Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands; ¹⁶Department of Medicine, University of València, Spain

ABSTRACT

Background

Fms-like tyrosine kinase-3 (*FLT3*) gene mutations are frequent in acute promyelocytic leukemia but their prognostic value is not well established.

Design and Methods

We evaluated *FLT3*-internal tandem duplication and *FLT3*-D835 mutations in patients treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy enrolled in two subsequent trials of the *Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas* (PETHEMA) and *Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland* (HOVON) groups between 1996 and 2005.

Results

FLT3-internal tandem duplication and *FLT3*-D835 mutation status was available for 306 (41%) and 213 (29%) patients, respectively. Sixty-eight (22%) and 20 (9%) patients had internal tandem duplication and D835 mutations, respectively. Internal tandem duplication was correlated with higher white blood cell and blast counts, lactate dehydrogenase, relapse-risk score, fever, hemorrhage, coagulopathy, BCR3 isoform, M3 variant subtype, and expression of CD2, CD34, human leukocyte antigen-DR, and CD11b surface antigens. The *FLT3*-D835 mutation was not significantly associated with any clinical or biological characteristic. Univariate analysis showed higher relapse and lower survival rates in patients with a *FLT3*-internal tandem duplication, while no impact was observed in relation to *FLT3*-D835. The prognostic value of the *FLT3*-internal tandem duplication was not retained in the multivariate analysis.

Conclusions

FLT3-internal tandem duplication mutations are associated with several hematologic features in acute promyelocytic leukemia, in particular with high white blood cell counts, but we were unable to demonstrate an independent prognostic value in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based regimens.

Key words: acute promyelocytic leukemia, *FLT3* mutations, prognostic factors, all-trans retinoic acid, anthracyclines.

Citation: Barragán E, Montesinos P, Camos M, González M, Calasanz MJ, Román-Gómez J, Gómez-Casares MT, Ayala R, López J, Fuster O, Colomer D, Chillón C, Larrayoz MJ, Sánchez-Godoy P, González-Campos J, Manso F, Amador ML, Vellenga E, Lowenberg B, and Sanz MA, on behalf of the PETHEMA and HOVON Groups. Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. *Haematologica* 2011;96(10):1470-1477. doi:10.3324/haematol.2011.044933

©2011 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Acknowledgement: the authors thank Carlos Pastorini for data collection and management.

This study was supported in part by the Fundación para la Investigación Hospital Universitario La Fe-Ayudas Bancaria (grant 2006/0137), Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD06/0020/0031).

The first two authors contributed equally to the manuscript

Manuscript received on March 29, 2011. Revised version arrived on June 10, 2011. Manuscript accepted on June 13, 2011.

Correspondence: Miguel A. Sanz, Hospital Universitario La Fe, Department of Medicine, University of València, Avenida Campanar, 21. 46009 Valencia, Spain. Phone: +34 961973057; FAX: +34 961973281; E-mail: msanz@uv.es

Introduction

Constitutive activation of the *fms*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) receptor due to internal tandem duplication (*FLT3*-ITD) and a point mutation in the activation loop (*FLT3*-D835) may confer proliferative and survival advantages to acute myeloid leukemia blasts.^{1,2} The presence of *FLT3* mutations, in particular of the ITD, has been consistently associated with a worse outcome in patients with acute myeloid leukemia with normal cytogenetics or intermediate-risk cytogenetics.^{3,4} However, the prognostic value of *FLT3* mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL), a form of acute myeloid leukemia characterized by the specific t(15;17), is still a matter of controversy. Although several studies in APL have reported an association between *FLT3*-ITD and various characteristics, including elevated white blood cell (WBC) count, BCR3 isoform, and microgranular morphology (M3v),⁵⁻²² the prognostic value of these mutations remains to be established. Two previous studies used multivariate analysis including both WBC count, a well-known poor risk factor in APL,²³ and ITD in order to assess the independent value of each one. The study by Gale *et al.*¹² showed that the WBC count was the sole independent prognostic factor for relapse and survival. In contrast, Chillón *et al.*¹⁷ analyzed the prognostic value of the ratio and size of ITD and found that both the length of the duplications and WBC count were independent prognostic factors in APL. With regards to the *FLT3*-D835 mutation, most authors were unable to demonstrate that this mutation has an impact on prognosis,^{7,9,11} although in some studies patients with the D835 mutation were found to have worse outcomes.^{13,14}

To provide new insights into the characterization of *FLT3* mutations in APL, we set out to evaluate the frequencies of ITD and D835 mutations, as well as the size and ratio of ITD, and their relationships with a broad variety of clinical and biological features. We also assessed the prognostic value of these mutations in a large cohort of APL patients enrolled in two successive trials of the Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas (PETHEMA) and Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland (HOVON) groups (LPA96 and LPA99).

Design and Methods

Patients and eligibility

Between November 1996 and June 2005, 739 patients enrolled in the consecutive multicenter PETHEMA LPA96 and PETHEMA/HOVON LPA99 trials were required to have a diagnosis of *de novo* APL with demonstration of the t(15;17) or *PML/RARA* rearrangement. More details about the general exclusion and inclusion criteria for these trials are reported elsewhere.^{18,20} According to the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all patients, and the protocol was approved by the Research Ethics Board of each participating hospital.

Therapy for acute promyelocytic leukemia

The induction regimen consisted of oral all-trans retinoic acid (ATRA, 45 mg/m²/day) divided into two daily doses, which was maintained until morphological complete remission was achieved, and intravenous idarubicin (12 mg/m²/day) on days 2, 4, 6, and 8. For patients 20 years of age or younger, the dose of ATRA was adjusted to 25 mg/m²/day. From November 1999, the idarubicin on day 8 was omitted for patients older than 70 years. Patients in

complete remission received three monthly consolidation courses. The detailed consolidation schedule has been reported elsewhere. Briefly, the first and the third courses consisted of idarubicin and the second of mitoxantrone. From November 1999 (LPA99 study), intermediate- and high-risk patients, as previously defined,²¹ received ATRA (45 mg/m²/day for 15 days) combined with the three chemotherapy courses,^{23,24} and the idarubicin dose was slightly increased. Patients who tested negative for *PML/RARA* at the end of consolidation were started on maintenance therapy with oral mercaptopurine, intramuscular methotrexate, and intermittent oral ATRA over 2 years. Details of the supportive therapy have been described elsewhere.^{18,22}

Analysis of *FLT3*-ITD and *FLT3*-D835 mutations

Analyses for *FLT3*-ITD and *FLT3*-D835 mutations were performed on bone marrow samples collected at the time the APL had been diagnosed. Samples were sent to reference laboratories, in sodium citrate or EDTA vials, and processed within 24 h. DNA was obtained using QIAmp DNA Blood Mini Kit extraction kits (QIAGEN GmbH Hilden, Germany) and UltraClean[™] extraction kits (MO BIO Carlsbad, CA, USA). RNA was obtained using RNeasy Mini kits (QIAGEN GmbH Hilden, Germany) or Trizol reagent (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Then 0.5 µg of RNA were reverse transcribed into cDNA in a 25 µL reaction volume with the TaqMan Gold RT-PCR Kit (PE Applied Biosystems Branchburg, NJ, USA).

FLT3-ITD and *FLT3*-D835 mutations were studied qualitatively in DNA or cDNA samples using the methods described by Nakao *et al.*²⁵ and Moreno *et al.*²⁶ In selected cases, the presence of *FLT3*-ITD and *FLT3*-D835 mutations was confirmed by sequencing the amplified products.

Quantitative assessment of *FLT3*-ITD mutations was performed only in patients with available genomic DNA, by Genescan analysis using a fluorescently labeled primer with 6-FAM to determine the allelic *FLT3*-ITD ratio and size, following the method described by Thiede *et al.*²⁷ If several mutant alleles were detected by Genescan, the mutant allele with the highest allelic ratio was selected for the size analyses.

Definitions and study endpoints

Induction of remission was assessed according to the recently revised criteria described by Cheson *et al.*²⁸ For morphological assessment of leukemia resistance, sufficient time had to have passed to allow for full terminal differentiation of the malignant promyelocytes (up to 40-50 days). Molecular remission was defined as the disappearance on an ethidium bromide gel of the *PML/RARA*-specific band visualized at diagnosis, using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assays with a sensitivity level of one cell in 10⁴, or as the disappearance of the *PML/RARA* rearrangement detected by real-time quantitative PCR (RQ-PCR).²⁷ Molecular persistence was defined as PCR positivity in two consecutive bone marrow samples collected at the end of consolidation therapy. The positive cases with a very low number of copies (<5 copies) by RQ-PCR were confirmed to be positive using a low sensitivity method (nested RT-PCR assay). Molecular relapse was defined as the reappearance of PCR positivity in two consecutive bone marrow samples at any time after consolidation therapy.²³ A genetic diagnosis of APL using PCR, anti-PML staining or cytogenetic tests was required for the diagnosis of overt hematologic relapse.

Differentiation syndrome was diagnosed and graded according to previously defined criteria.²⁹ Coagulopathy was defined as a prolonged prothrombin time and/or activated partial thromboplastin time in addition to hypofibrinogenemia and/or increased levels of fibrin degradation products or D-dimers. Patients were

classified as having t(15;17) with or without additional chromosomal abnormalities in accordance with previously defined criteria.²⁰ The patients' performance status at diagnosis was measured using the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale. The risk of relapse was estimated at diagnosis using a predictive model based on the patients' leukocyte and platelet counts at diagnosis, as reported elsewhere.²¹ Relapse-risk groups were defined as reported elsewhere²⁰ and summarized here: low-risk patients had a WBC count less than $10 \times 10^9/L$ and a platelet count more than $40 \times 10^9/L$; intermediate-risk patients had a WBC count less than $10 \times 10^9/L$ and a platelet count less than $40 \times 10^9/L$; and high-risk patients had a WBC count of $10 \times 10^9/L$ or more.

Statistical methods

The χ^2 test, with Yates' correction if necessary, was used to analyze differences in the distribution of categorical variables between subsets of patients. The Student's t-test was used to analyze continuous variables with a normal distribution and Mann-Whitney's U test for data that failed the normality test. Thirty-four characteristics of the patients and the disease were examined to establish their relationship to FLT3-ITD and FLT3-D835 mutations. These characteristics are listed in Tables 1 and 2. In addition we analyzed the following variables: total body surface, levels of serum creatinine, uric acid, albumin, total bilirubin, and fibrinogen, peripheral blood platelet count and hemoglobin levels, peroxidase reactivity of bone marrow blasts, and CD9, CD13, CD33, CD56 and CD117 surface antigen markers. For comparison, unadjusted time-to-event analyses were performed using the Kaplan-Meier estimate,²¹ log-rank tests and their generalizations.²² For all estimates in which the event "relapse" was considered as an endpoint, hematologic and molecular relapse, as well as molecular persistence (*PML/RARA* positive by RT-PCR at the end of consolidation), were each considered as uncensored events. Overall survival was calculated from the time of diagnosis to the time of death from any cause, and relapse-free survival from the date of achieving complete remission to the time of relapse. All *P* values reported are two-sided. The patients' follow-up was updated on March 15, 2010. The characteristics selected for inclusion in the multivariate analysis, using the Cox proportional hazards model, were those for which there was some indication of a significant association in univariate analysis ($P < 0.1$) and, if available, those for which prior studies had suggested a possible relationship. Computations were performed using the 4F, 3D, 1L and 2L programs from the BMDP statistical library (BMDP Statistical Software Inc, Los Angeles, CA, USA).

Results

Incidence of FLT3 mutations

We were able to perform an analysis of FLT3-ITD mutations at diagnosis in 306 (41%) patients (57 patients in the LPA96 and 249 in the LPA99 trial), and FLT3-D835 in 213 (29%) of 739 patients with APL. The following characteristics were observed more frequently in the patients tested for FLT3 mutations than in those who were not tested ($n=433$): LPA99 trial ($P=0.01$), fibrinogen concentration less than 170 mg/dL ($P=0.04$), and hemoglobin concentration less than 10 g/dL ($P=0.06$). The patients came from 53 institutions in Spain and The Netherlands (see Appendix), and FLT3 analyses were routinely performed in eight reference laboratories (see Appendix). The median follow-up of the series was 97 months (range, 15-158 months) from diagnosis.

Overall, 68/306 patients (22%) had a FLT3-ITD muta-

tion and 20/213 patients (9%) had a FLT3-D835. One patient presented with both mutations concomitantly.

Genescan analysis and sequencing of FLT3 mutations

Genescan analysis to determine size and ratio was conducted in 39 patients with FLT3-ITD. The ratio of the FLT3-ITD mutations ranged from 0.06 to 1.3 with a median of 0.66, and the length varied from 6 to 180 bp with a median of 40 bp. Thirty-five patients showed only one mutant allele, and four showed two mutant alleles of different sizes.

Sequence analysis performed in 20 FLT3-ITD positive and 10 FLT3-D835 positive APL samples showed that in all cases ITD mutations consisted of in-frame duplications involving exon 11, while D835 mutations consisted of replacement of aspartic residue by tyrosine (8 cases) or histidine (2 cases).

Patients' characteristics according to FLT3 mutation status

The main clinical and biological characteristics of the patients according to FLT3 mutation status are summarized in Tables 1 and 2. FLT3-ITD was significantly associated with higher WBC count, higher relapse-risk score, more than 70% blasts in peripheral blood, BCR3 isoform, M3v subtype ($P < 0.001$ for all), lactate dehydrogenase levels greater than 600 U/L ($P=0.005$), presence of fever or coagulopathy at diagnosis (both $P=0.02$), more than 70% blasts in the bone marrow ($P=0.03$), and hemorrhage ($P=0.04$). FLT3-ITD was also associated with expression of the following surface markers: CD2, CD34 (both $P < 0.001$), HLA-DR ($P=0.03$), and CD11b ($P=0.04$).

By contrast, FLT3-D835 was not significantly associated with higher WBC count or any other hematologic characteristic (Table 2).

Induction outcome

The overall induction death rate in the series was 8.8%. As shown in Table 3, there was a significantly higher induction death rate in patients with FLT3-ITD than in patients without FLT3-ITD mutations (16% versus 7%, $P=0.03$). The incidence of severe differentiation syndrome was 22% among patients with FLT3-ITD mutations and 13% among those without FLT3-ITD ($P=0.05$). Multivariate analysis identified a WBC count greater than $10 \times 10^9/L$ ($P < 0.001$), age greater than 60 years ($P=0.001$), and creatinine levels greater than 1.4 mg/dL ($P=0.02$) as independent prognostic factors for induction death.

No significant associations were found with induction outcomes according to the FLT3-D835 mutation status (Table 4).

Post-remission outcomes

Relapse-free survival

Fourteen relapses, 11 overt and 3 molecular, occurred among the FLT3-ITD positive cohort at a median time of 16 months (range, 4-75 months) after achievement of complete remission; and 27 relapses, 17 overt and 10 molecular, occurred among the FLT3-ITD negative cohort at a median time of 23 months (range, 4-85 months) after attainment of complete remission.

Univariate analysis showed a lower 5-year relapse-free survival rate in FLT3-ITD-positive patients than in FLT3-ITD-negative ones (77% versus 88%; $P=0.02$) and no impact of FLT3-D835 mutation status (93% versus 84%; $P=0.29$) (Figure 1 and Tables 3 and 4). We did not find sig-

Table 1. Disease and patients' characteristics according to *FLT3*-ITD mutations.

Characteristic	<i>FLT3</i> -ITD positive		<i>FLT3</i> -ITD negative		P
	Median (range)	N. (%)	Median (range)	N. (%)	
Overall		68 (100)		238 (100)	
PETHEMA trial					
LPAS6		15 (22)		42 (18)	0.41
LPAS9		53 (78)		196 (82)	
Age, years	40 (6-72)		41 (2-81)		
≤ 18		5 (7)		23 (10)	0.81
19-40		31 (46)		89 (37)	
41-60		21 (31)		81 (34)	
> 60		11 (16)		45 (19)	
Gender					
Male		34 (50)		121 (51)	0.91
Female		34 (50)		117 (49)	
ECOG score (n=284)	1 (0-3)		1 (0-3)		
0-1		45 (78)		173 (71)	0.26
2-3		18 (22)		48 (29)	
Fever (n=305)					
No		33 (49)		155 (65)	0.02
Yes		34 (51)		83 (35)	
Hemorrhage					
No		5 (7)		45 (19)	0.04
Yes		63 (93)		193 (81)	
Hepatosplenomegaly (n=299)					
No		58 (88)		218 (94)	0.13
Yes		8 (12)		15 (6)	
WBC count, ×10 ⁹ /L	16.9 (0.6-148)		1.2 (0.2-133)		<0.001*
≤ 5		16 (23)		176 (74)	<0.001
5-10		8 (12)		20 (8)	
10-50		32 (47)		35 (15)	
> 50		12 (18)		7 (3)	
Relapse-risk group					
Low		5 (7)		52 (22)	<0.001
Intermediate		19 (28)		144 (60)	
High		44 (65)		52 (18)	
Blasts in PB, % (n = 276)	82 (0-98)		32 (0-100)		
≤ 70		22 (34)		160 (76)	<0.001
> 70		42 (66)		52 (24)	
Blasts in BM, % (n = 287)	90 (30-100)		89 (6-100)		
≤ 70		6 (10)		48 (21)	0.03
> 70		57 (90)		176 (79)	
Coagulopathy					
No		9 (13)		66 (28)	0.02
Yes		59 (87)		172 (72)	
LDH, IU/L (n = 297)	778 (225-2904)		505 (205-3950)		
≤ 600		21 (32)		121 (48)	0.005
> 600		44 (68)		111 (52)	
Morphological subtype					
Hypergranular		39 (57)		210 (88)	<0.001
Microgranular		29 (43)		28 (12)	
Cytogenetics (n = 223)					
t (15;17)		32 (73)		124 (69)	0.65
t (15;17) plus other**		12 (27)		55 (31)	
PML/RARα isoform (n = 298)					
BCR1/BCR2		13 (19)		158 (68)	<0.001
BCR3		54 (81)		73 (32)	
CD2 (n = 201)					
Positive		20 (44)		26 (37)	< 0.001
Negative		25 (56)		130 (83)	

continued in the next column

continued from the previous column

CD11b (n = 164)			
Positive		0 (0)	19 (15)
Negative		33 (100)	112 (85)
CD34 (n = 233)			
Positive		29 (45)	26 (86)
Negative		24 (55)	154 (14)
HLA-DR (n = 215)			
Positive		6 (3)	5 (12)
Negative		43 (97)	161 (88)

*P compares continuous variables (mean WBC count 28.4 versus 7.4); **plus other additional chromosomal abnormalities; PB: peripheral blood; BM: bone marrow; LDH: lactate dehydrogenase.

nificant differences in relapse-free survival according to several levels of *FLT3*-ITD ratio (0.5, 0.66, and 0.8) or size (40, 50, and 60 bp) (Table 3 and Figure 2).

Multivariate analysis was performed including the following variables: age, gender, WBC count, relapse-risk score, protocol, M3 morphology, BCR isoform, *FLT3*-ITD positive (versus negative), and *FLT3*-ITD size greater than 60 bp (versus <60 bp and negative together). A WBC count greater than 10×10⁹/L was the only independent prognostic factor for relapse (P<0.001).

Overall survival

Univariate analysis showed a lower 5-year overall survival rate in *FLT3*-ITD-positive patients than in *FLT3*-ITD-negative ones (71% versus 81%; P=0.05). In contrast, similar 5-year overall survival rates were observed when comparing *FLT3*-D835-positive with *FLT3*-D835-negative patients (80% versus 80%; P=0.80) (Tables 3 and 4).

Multivariate analyses showed that a WBC count greater than 10×10⁹/L and age over 60 years were independent prognostic factors for survival (both, P<0.001).

Discussion

This study shows that *FLT3*-ITD mutations, but not *FLT3*-D835 ones, are associated with notable hematologic and clinical features, such as high WBC counts, high percentages of peripheral blood and bone marrow blasts, coagulopathy, M3v subtype, BCR3 isoform, and expression of CD2, CD34, HLA-DR, and CD11b surface antigens. Although univariate analyses showed higher induction death and lower relapse-free survival rates among *FLT3*-ITD-positive patients, multivariate analyses revealed that the *FLT3*-ITD had no independent prognostic value in patients with APL treated with ATRA and anthracycline-based chemotherapy.

As far as we know, our study represents the largest single series addressing the clinical significance of *FLT3* mutations in APL. It should be noted that, although patients came from 53 institutions, the *FLT3* analyses were performed in a limited number of reference laboratories. Since not all centers performed the *FLT3* analyses, which were not compulsory in the initial diagnostic set, we cannot definitely exclude a selection bias. Activating mutations of *FLT3* have been reported in APL at frequencies within the range of 12% to 39% for *FLT3*-ITD (median 21%),^{3,5-23,27,33,34} and 6% to 22% for *FLT3*-D835 (median 9%).^{6,13,14,15,17} The incidence of these mutations in our

Table 2. Disease and patients' characteristics according to FLT3-D835 mutations.

Characteristic	FLT3-D835 positive		FLT3-D835 negative		P
	Median (range)	N. (%)	Median (range)	N. (%)	
Overall		20 (100)		193 (100)	
PETHEMA trial					
LPA96		3 (15)		39 (20)	0.79
LPA99		17 (85)		154 (80)	
Age, years	34 (8-71)		41 (2-81)		0.35
≤ 18		4 (20)		15 (8)	
19-40		9 (45)		84 (44)	
41-60		5 (25)		55 (28)	
> 60		2 (10)		39 (20)	
Gender					0.59
Male		9 (45)		99 (51)	
Female		11 (55)		94 (49)	
ECOG score (n=194)	1 (0-2)		1 (0-3)		0.99
0-1		12 (80)		140 (78)	
2-3		3 (20)		39 (22)	
WBC count, ×10 ⁹ /L	4.7 (0.6-40)		2.6 (0.3-118)		0.25*
≤ 5		10 (50)		120 (62)	0.29
5-10		3 (15)		19 (10)	
10-50		7 (35)		41 (21)	
> 50		0 (0)		13 (7)	
Relapse-risk group					0.79
Low		3 (15)		36 (19)	
Intermediate		10 (50)		103 (53)	
High		7 (35)		54 (28)	
Blasts in PB, % (n = 192)	73 (0-100)		46 (0-100)		0.07
≤ 70		8 (44)		120 (69)	
> 70		10 (56)		54 (31)	
Blasts in BM, % (n = 201)	89 (59-100)		89 (7-100)		0.85
≤ 70		3 (16)		32 (18)	
> 70		16 (84)		150 (82)	
Morphological subtype					0.46
Hypergranular		14 (70)		154 (80)	
Microgranular		6 (30)		39 (20)	
PML/RARα isoform (n = 205)					0.75
BCR1/BCR2		12 (60)		104 (56)	
BCR3		8 (40)		81 (44)	

*P compares continuous variables (mean WBC count 10.2 versus 11.8); PB peripheral blood; BM bone marrow.

study, 22% and 9%, respectively, are consistent with the reported data. As in previous studies,^{9,11,12,14} in our series the simultaneous presence of both FLT3-ITD and FLT3-D835 mutations was extremely rare.

The mutant allelic ratio of FLT3-ITD in APL has been analyzed in two studies in which median ratios of 1.0 (range, 0.11 to 6.55),¹¹ and 0.66 (range, 0.3 to 1.0),¹⁷ were found in 30 and 19 patients, respectively. In our series of 39 patients for whom the mutant allelic ratio was known, the median was 0.66 (range, 0.06 to 1.3) which was the same as that reported by Chillón *et al.*¹⁷ Unlike in the study by Xue *et al.*,¹¹ patients with a ratio greater than 2, indicating loss of wild-type allele, were not observed.

In line with previous studies,^{9,7,9,11-13} we found a strong association between ITD and high WBC counts. We also found a clear correlation between ITD and M3v and BCR3, as has previously been reported by others.^{8-10,12,15} However, the relationship found between ITD and CD34, CD2, and HLA-DR expression had not been previously

Table 3. Treatment results according to FLT3-ITD mutations in the study population.

	FLT3-ITD negative		FLT3-ITD positive		P value
	N. of patients	%	N. of patients	%	
Overall	238	100	68	100	
Induction outcome					
Complete remission	220*	92	57	84	0.06
Induction death	16	7	11	16	0.03
Positive PCR after induction** (n=249)	111	56	28	56	0.97
Differentiation syndrome					0.06
Severe	30	13	15	22	
Moderate/absent	208	87	53	78	
Post-remission outcomes at 5 years					
Overall survival		81		71	0.05
Relapse-free survival		88		77	0.02
ITD size > 60 bp. (n=7)		NA		57	0.61
ITD size < 60 bp. (n=24)		NA		71	
ITD ratio > 0.66 (n=16)		NA		63	0.74
ITD ratio ≤ 0.66 (n=15)		NA		73	

*Two patients among the FLT3-ITD negative cohort were considered as resistant; **Positive PCR of PML/RARα in a bone marrow sample after induction; NA, Not applicable.

Table 4. Treatment results according to FLT3-D835 mutations in the study population.

	FLT3-D835 negative		FLT3-D835 positive		P value
	N. of patients	%	N. of patients	%	
Overall	193	100	20	100	
Induction outcome					
Complete remission	176*	91	15*	75	0.06
Induction death	16	8	4	20	0.19
Differentiation syndrome					0.62
Severe	33	17	2	10	
Moderate/absent	160	83	18	90	
Post-remission outcomes at 5 years					
Relapse-free survival		84		53	0.29
Overall survival		80		80	0.80

*Two patients were considered as having resistant disease (1 among the FLT3-D835 negative cohort and 1 among the positive cohort).

noted. This relationship could be explained by the association of the ITD with M3v and BCR3 APL which, in turn, have been shown to express the CD34, CD2, and HLA-DR surface markers more frequently.^{20,24} We confirm that high WBC counts, like elevated lactate dehydrogenase levels and coagulopathy, are more frequent in FLT3-ITD-positive APL.⁹ The increased frequency of hemorrhage and high percentages of peripheral blood and bone marrow blasts that we report here have not been described previously. In contrast to Xue *et al.*,¹¹ and Gale *et al.*,¹² we were unable to show an association between FLT3-D835 and elevated WBC counts or any other clinical or biological characteristic.

As previously reported,^{11,13,14,20} patients with ITD had an increased risk of induction death also in our study. However, the multivariate analysis made clear that this was due to the association with hyperleukocytosis, a well-established risk factor for induction death.²⁵ One study suggested that there is an inverse relationship between molecular remission rate and ITD in patients treated with arsenic trioxide.¹⁵ An association between FLT3-ITD and molecu-

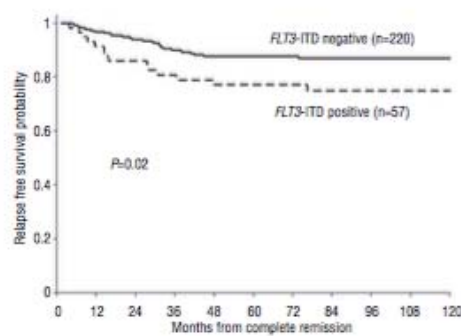


Figure 1. Relapse-free survival in APL patients according to *FLT3*-ITD mutation status.

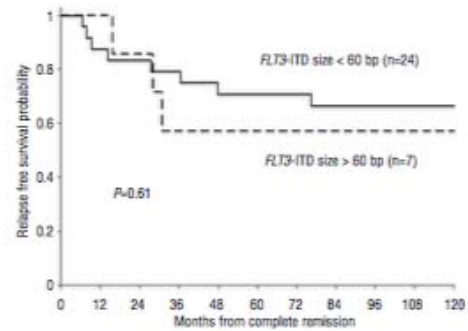


Figure 2. Relapse-free survival in *FLT3*-ITD positive APL patients according to ITD size.

lar remissions was not apparent in the present study.

The associations reported between ITD and overall survival and relapse-free survival rates have previously been established by univariate but not by multivariate analysis.^{9,17} In our study, *FLT3*-ITD status was removed from the regression equation when WBC count was included in the multivariate analysis, showing that the adverse long-term outcome of *FLT3*-ITD mutations is attributable to its relationship with elevated WBC count. Furthermore, in a much larger series, we were unable to demonstrate the adverse prognostic impact of the ratio and length of *FLT3*-ITD mutations reported by Chillón *et al.*¹⁷ We should, however, be very cautious when interpreting the potential prognostic impact of the ratio and size of *FLT3*-ITD mutations because of the low number of datasets available. Regarding the *FLT3*-D835, unlike Gale *et al.*,¹² we found no prognostic significance of this mutation in our series.

In conclusion, *FLT3*-ITD mutations, but not *FLT3*-D835 ones, are associated with characteristic diagnostic hematologic features of APL, in particular with high WBC counts. However, in a large series of APL patients treated with ATRA and anthracycline-based chemotherapy, we were unable to demonstrate an independent prognostic value of *FLT3* mutations. Given the relationship between *FLT3*-ITD and high WBC count, targeted therapy with *FLT3* inhibitors could be an attractive strategy to improve long-term outcome in high-risk patients.¹²

Appendix

The following institutions and clinicians participated in the study: Spain (Programa Español de Tratamiento de las Hemopatías Malignas, PETHEMA)—Basurtuko Ospitalea, Bilbao: J. M. Beltrán de Heredia; Complejo Hospitalario de Segovia: J.M. Hernández; Complejo Hospitalario Xeral-Calde, Lugo: J. Arias; Complejo Hospitalario, León: F. Ramos; Fundación Jiménez Díaz, Madrid: A. Román; Hospital 12 de Octubre, Madrid: J. de la Serna; Hospital Carlos Haya, Málaga: S. Negri; Hospital Central de Asturias, Oviedo: C. Rayón; Hospital Clinic, Barcelona: J. Esteve; Hospital Clínico de Valladolid: F.J. Fernández-Calvo; Hospital Clínico San Carlos, Madrid: J. Díaz-Mediavilla; Hospital Clínico San Carlos (H. Infantil), Madrid:

C. Gil; Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela: M. Pérez-encinas; Hospital Clínico Universitario, Valencia: M. Tormo; Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza: M. Olave; Hospital de Cruces, Barakaldo: E. Amutio; Hospital del Mar, Barcelona: C. Pedro; Hospital de Navarra, Pamplona: A. Gorosquieta; M. Viguria; M. Zudaire; Hospital Dr Negrín, Las Palmas: T. Molero; Hospital Dr Peset, Valencia: M. J. Sayas; Hospital Dr Trueta, Girona: R. Guardia; Hospital General de Albacete: F. Manso; Hospital General de Alicante: C. Rivas; Hospital General de Alicante (Oncología Pediátrica): C. Esquembre; Hospital General de Castellón: R. García; Hospital General de Especialidades Ciudad de Jaén: A. Alcalá; J.A. López; Hospital General de Jerez de la Frontera: V. Rubio; Hospital General de Murcia: M.L. Amigo; Hospital General de Valencia: M. Linares; Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona: J. M. Ribera; Hospital Insular de Las Palmas: J. D. González San Miguel; Hospital Juan Canalejo, A Coruña: G. Debén; Hospital Joan XXIII, Tarragona: L. Escoda; Hospital La Princesa, Madrid: R. de la Cámara; Hospital Materno-Infantil de Las Palmas: A. Molines; Hospital do Meixoeiro, Vigo: C. Loureiro; Hospital Montecelo, Pontevedra: M.J. Allegue; L. Amador; Hospital Mutua de Terrasa: J.M. Martí; Hospital Niño Jesús, Madrid: L. Madero; A. Lassaletta; Hospital Ntra. Sra. de Sonsoles, Ávila: M. Cabezedo; Hospital Ramón y Cajal, Madrid: J. García-Laraña; Hospital Reina Sofía, Córdoba: R. Rojas; Hospital Río Carrión, Palencia: F. Ortega; Hospital Río Hortega, Valladolid: M. J. Peñarubia; Hospital San Jorge, Huesca: F. Puente; Hospital San Rafael, Madrid: B. López-Ibor; Hospital Sant Pau, Barcelona: S. Brunet; Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres: J. M. Bergua; Hospital Santa María del Rosell, Cartagena: J. Ibáñez; Hospital Severo Ochoa, Leganés: P. Sánchez; Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca: A. Novo; Hospital de Tortosa: L.L. Font; Hospital Txagorritxu, Vitoria: J. M. Guínea; Hospital Universitario del Aire, Madrid: A. Montero; Hospital Universitario de Salamanca: M. González; Hospital Universitario La Fe, Valencia: M. A. Sanz, G. Martín, J. Martínez, P. Montesinos; Hospital Universitario La Fe (Hospital Infantil), Valencia: A. Verdeguez; Hospital Universitario La Paz (Hospital Infantil), Madrid: P. García; Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander: E. Conde; Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares: J. García; Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz: F.J. Capote;

Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid: I. Krsnik; Hospital Universitario Vall D'Hebron, Barcelona: J. Bueno; Hospital Universitario Materno-Infantil Vall D'Hebron, Barcelona: P. Bastida; Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia: A. Rubio; Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Pediatria), Murcia: J.L. Fuster; Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla: J. González; Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga: I. Pérez; Hospital Virgen del Camino (Infantil), Pamplona: J. Molina; Hospital Virgen del Camino (Adultos), Pamplona: M.C. Mateos; M.A. Ardaiz; Clínica San Miguel, Pamplona: M. Rodríguez-calvillo; Hospital Xeral Ctes, Vigo: C. Poderós; Institut Català d'Oncologia, Hospitalet de Llobregat; M. Arnán, R. Duarte; Hospital de Fuenlabrada, Fuenlabrada: J.A. Hernández; Hospital General de Guadalajara, Guadalajara: M. Díaz-Morfa; Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva: E. Martín-Chacón; Hospital Doctor José Molina Orosa, Lanzarote: J.M. Calvo-Villas; Hospital Madrid Norte Sanclinarro, Madrid: D. García-Belmonte; Hospital U. La Paz, Madrid: D. Hernández-Maraver; The Netherlands (The Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group, HOVON) —VU Medical Center Amsterdam: G. J. Ossenkoppele; Academic Medical Center, University of Amsterdam: J. van der Leij; Erasmus University Medical Center, Rotterdam: B. Lowenberg, P. Sonneveld, M. Zijlman, G. de Greef, M. Jongen-Lavrencic; University Medical Center, Groningen: E. Vellenga; Gasthuisberg Hospital,

Leuven: J. Maertens; OLVG Hospital, Amsterdam: B. de Valk; Den Haag Hospital, Leyenburg: P.W. Wijermans; Medical Spectrum Twente Hospital, Enschede: M.R. de Groot; Academic Hospital Maastricht: H.C. Schouten; St. Antonius Hospital, Nieuwegein: D.H. Biesma; Sophia Hospital, Zwolle: M. van Marwijk Kooy

The following reference laboratories participated in the study: Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain; Hospital Clínic Universitario, Salamanca, Spain; Departamento de Genética Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain; Hospital Nuestra Señora del Pino, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; and Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Authorship and Disclosures

The information provided by the authors about contributions from persons listed as authors and in acknowledgments is available with the full text of this paper at www.haematologica.org.

Financial and other disclosures provided by the authors using the ICMJE (www.icmje.org) Uniform Format for Disclosure of Competing Interests are also available at www.haematologica.org.

References

- Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Dwyer J, FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*. 2005;105(12):4792-9.
- Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*. 2005;106(1):265-73.
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. 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*. 2001;61(19):7233-9.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Höhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-18.
- Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, et al. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho)*. *Leukemia*. 1997;11(10):1447-52.
- Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, et al. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia* 2002;16(11):2185-9.
- Callens C, Chevret S, Cayuela JM, Cassinat B, Raffoux E, de Botton S, et al. Prognostic implication of FLT3 and Ras gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. *Leukemia*. 2005;19(7):1153-60.
- Kuchenbauer F, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukaemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2005;130(2):196-202.
- Au WY, Fung A, Chim CS, Lie AK, Liang B, Ma ES, et al. FLT-3 aberrations in acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological associations and prognostic impact. *Br J Haematol*. 2004;125(4):463-9.
- Shih LY, Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Lin TL, Wu JH, et al. Internal tandem duplication and Asp835 mutations of fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene in acute promyelocytic leukemia. *Cancer*. 2003;98(6):1206-16.
- Xue MX, Qiu HY, Feng YF, Zhu ZL, Chang WR, Liang JY, et al. Prevalence and clinical significance of FLT3 mutations in acute promyelocytic leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2008;29(11):757-61.
- Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AJ, et al. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(12):3768-76.
- Hasan SK, Sazawal S, Dutta P, Pillai LS, Kumar B, Chaubey R, et al. Impact of FLT3 internal tandem duplications on Indian acute promyelocytic leukemia patients: prognostic implications. *Hematology*. 2007;12(2):99-101.
- Yoo SJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Lee KH, Chi HS. Inferior prognostic outcome in acute promyelocytic leukemia with alterations of FLT3 gene. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(9):1788-93.
- Mathews V, Thomas M, Srivastava VM, George B, Srivastava A, Chand M. Impact of FLT3 mutations and secondary cytogenetic changes on the outcome of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with a single agent arsenic trioxide regimen. *Haematologica* 2007;92(7):994-5.
- Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009;113(9):1875-91.
- Chillón MC, Santamaría C, García-Sanz R, Balanzategui A, María Eugenia S, Alcoceba M, et al. Long FLT3 internal tandem duplications and reduced PML-RARalpha expression at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica*. 2010;95(5):745-51.
- Sanz MA, Martín G, Rayón C, Esteve J, González M, Díaz-Mediavilla J, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARa-positive acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(9):3013-21.
- Sanz MA, Martín G, González M, León A, Rayón C, Rivas C, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA Group. *Blood*. 2004;103(4):1237-43.
- Sanz MA, Montesinos P, Vellenga E, Rayón C, de la Serna J, Parody R, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and

- anthracycline monochemotherapy: long-term outcome of the LPA 99 multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*. 2006;112(8):3130-4.
21. Sanz MA, Lo Coco F, Martín G, Avvisati G, Rayón C, Barbui T, et al. Definition of relapse risk and role of non-anthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*. 2000;96(4):1247-55.
 22. De la Serna J, Montesinos F, Vellenga E, Rayón C, Parody R, León A, et al. Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin. *Blood*. 2008;111(7):3398-402.
 23. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Honike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplications of the *FLT3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-8.
 24. Moreno I, Martín G, Bolufer P, Barragán E, Rueda E, Roman J, et al. Incidence and prognostic value of *FLT3* internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukaemia. *Haematologica*. 2003;88(1):19-24.
 25. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326-35.
 26. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky K, Büchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21(24):4642-9.
 27. Gabbert J, Beillard E, Van Der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer Program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318-57.
 28. Bolufer P, Barragán E, Sanz MA, Martín G, Bornstein R, Colomer D, et al. Preliminary experience in external quality control of RT-PCR PML-RAR alpha detection in promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 1996;12(12):2024-8.
 29. Montesinos F, Bergua JM, Vellenga E, Rayón C, Parody R, de la Serna J, et al. Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: characteristics, outcome, and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(4):775-83.
 30. Cervera J, Montesinos F, Hernández-Rivas JM, Calasanz MJ, Avenín A, Ferró MT, et al. Additional chromosome abnormalities in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. *Haematologica*. 2010;95(3):424-31.
 31. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-81.
 32. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*. 1966;50(3):163-70.
 33. Schnitger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib F, Wuchter C, et al. Analysis of *FLT3* length mutations in 1008 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002;100(1):59-66.
 34. Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzinger I, Sperr W, Le T, et al. Variable prognostic value of *FLT3* internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J*. 2002;3(6):283-9.
 35. Albano F, Mestice A, Panunzio A, Lanza F, Martino B, Fatore D, et al. The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. *Haematologica*. 2006;91(3):311-6.
 36. Paletta E, Goloubeva O, Neuberg D, Bennett JM, Gallagher R, Racevskis J, et al. A surrogate marker profile for PML/RAR alpha expressing acute promyelocytic leukemia and the association of immunophenotypic markers with morphologic and molecular subtypes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;59(1):1-9.
 37. Beitinjaneh A, Jang S, Roukoz H, Majhail NS. Prognostic significance of *FLT3* internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: a systematic review. *Leuk Res*. 2010;24(4):531-6.

7 DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo de Tesis muestran que una estrategia de tratamiento adaptado al riesgo puede significar una mejoría en los resultados terapéuticos de la LPA, permitiendo optimizar las pautas de quimioterapia y ATRA para tratar a los pacientes en su justa medida. Los resultados actualizados del protocolo PETHEMA LPA99 demostraron que el uso de un modelo predictivo para recaída con el fin de adaptar la intensidad de la quimioterapia, se tradujo en una mejoría de la CIR, SLE y SG en una amplia serie de pacientes. El análisis pormenorizado del síndrome de diferenciación, una seria y frecuente complicación durante la fase de inducción con ATRA, permitió conocer la magnitud y las características del síndrome, además de los factores pronósticos asociados a su desarrollo. Ese estudio ayudó a establecer pautas de profilaxis adaptada al riesgo en los siguientes protocolos PETHEMA LPA. Finalmente, el estudio de una amplia serie de pacientes homogéneamente tratados con los protocolos PETHEMA LPA96 y LPA99, en los que el estado mutacional de FLT3 al diagnóstico estuvo disponible, concluyó que esta mutación carecía de valor pronóstico independiente, y por lo tanto no debía usarse en los siguientes protocolos para modular la intensidad de la quimioterapia en función de su presencia. Estos tres estudios son un ejemplo de la metodología usada por el grupo cooperativo PETHEMA para la planificación de los esquemas terapéuticos en la LPA: 1) resulta fundamental conocer los resultados de un protocolo, y compararlo con el anterior (en ausencia de la posibilidad de realizar un ensayo aleatorizado), antes de diseñar el siguiente; 2) el profundo conocimiento de las complicaciones derivadas de la enfermedad y de la quimioterapia es esencial para el correcto manejo, tanto profiláctico como terapéutico, de las mismas. En enfermedades raras como la LPA, esto solo se puede lograr mediante el análisis de los datos de amplias series de pacientes tratados homogéneamente en el contexto de un grupo cooperativo; y 3) con el fin de optimizar el tratamiento de la LPA, se procede a la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo para desarrollar las diferentes complicaciones que conducen al fracaso terapéutico (mortalidad en inducción, muerte en remisión, y recaída).

El estudio de los resultados definitivos del protocolo LPA99 fue una confirmación del análisis preliminar publicado en el año 2004,⁴⁰ pero con casi el doble de pacientes y con mucho más tiempo de seguimiento. Se corroboró la aceptable tolerabilidad, toxicidad, y alta tasa de cumplimentación de un esquema de inducción y consolidación basado en la combinación de antraciclina y ATRA, seguido de un mantenimiento prolongado. El éxito de este protocolo, comparado con el anterior (LPA96), se debió, al menos en parte, a una estrategia de consolidación adaptada al

riesgo según el modelo predictivo basado en los recuentos de leucocitos y plaquetas en SP al diagnóstico, desarrollado en el año 2000.⁵³ Se procedió a intensificar la dosis de antraciclina y al mismo tiempo añadir ATRA en la consolidación solo en los pacientes con riesgo intermedio y alto de recaída. Mediante esta estrategia, los pacientes de bajo riesgo siguieron sin presentar apenas recaídas (CIR <5%), mientras que los de riesgo intermedio y alto disminuyeron significativamente su tasa de recaídas. Aunque, lógicamente, los efectos tóxicos fueron mayores en los pacientes de riesgo intermedio y alto tratados con consolidaciones intensificadas, la mejoría de la eficacia antileucémica del nuevo régimen supuso un aumento global en la SLE de estos subgrupos. De hecho, este régimen pasó a ser uno de los estándares en el tratamiento de la LPA, y prueba de ello es que fue seleccionado como rama de comparación en el ensayo clínico MRC15 llevado a cabo por el grupo cooperativo Británico.⁴⁶

Una crítica fundamental a los estudios del grupo PETHEMA en LPA es que su diseño no fue aleatorizado, y que los datos fueron monitorizados a distancia sin visitas “in situ” a los centros para verificar la información desde los documentos fuente (historia clínica y otros). Sin embargo, este tipo de ensayo clínico era, y desafortunadamente sigue siendo, prácticamente imposible en el contexto actual de la investigación clínica independiente en nuestro medio, por varios motivos: 1) los costes derivados de un estudio con monitorización según los estándares de “good clinical practice” son muy elevados, especialmente si se tiene que recurrir a empresas especializadas en monitorización “in situ” para verificar todos los documentos fuente en todos los pacientes; 2) los trámites administrativos para realizar un ensayo clínico aleatorizado también tienen un elevado impacto económico, además de requerir una ingente cantidad de tiempo por una oficina de investigación especializada en cuestiones regulatorias con estrecho contacto con la agencia estatal del medicamento y los comités éticos. En consecuencia, este tipo de estudios solo podrán desarrollarse directamente por compañías farmacéuticas con holgada capacidad económica, o bien cuando: 1) exista un sufragio por parte de alguna compañía farmacéutica interesada en el desarrollo de un compuesto a través de un grupo de investigación independiente, generalmente una sociedad científica o un grupo cooperativo, actuando estos como promotores (“Investigator Initiated Trials”); o 2) existan unas condiciones favorables por parte de la legislación y las agencias reguladoras estatales, junto a un apoyo económico de entidades públicas para la investigación clínica independiente, y por supuesto una buena organización de las sociedades científicas para poder desarrollar este tipo de ensayos. Por desgracia, en el ámbito en el que se llevaron a cabo los

estudios PETHEMA para la LPA, no se daba ninguna de las condiciones necesarias para realizar unos ensayos fase III aleatorizados: ni el tratamiento de la enfermedad contenía fármacos en desarrollo por una compañía farmacéutica, ni existía una legislación favorable para la investigación clínica, ni probablemente el grupo científico tuviera la mentalidad apropiada para por lo menos intentar superar todos estos obstáculos y promover un estudio tan complejo. Aún así, los estudios del grupo cooperativo PETHEMA en LPA tenían algunas virtudes respecto a los ensayos clínicos “puros”. Por un lado, eran protocolos más inclusivos, con el objetivo de tratar al máximo número de pacientes con el esquema investigado, puesto que se trataba de la mejor recomendación que el grupo científico podía hacer con el armamentario terapéutico disponible en ese momento. Por eso, los criterios de exclusión eran pocos, e incluso a los pacientes no elegibles por algunas causas (por ejemplo, aquellos con LPA secundaria), se les recomendaba seguir el mismo protocolo aunque luego no fueran incluidos en el análisis. A diferencia de los ensayos clínicos clásicos, todos los pacientes podían beneficiarse del protocolo, a no ser, obviamente, que hubiera una contraindicación para administrarlo a juicio del investigador. Como consecuencia directa, los protocolos PETHEMA LPA tuvieron una alta capacidad de reclutamiento y los resultados que ofrecían gozaban de la virtud de ser un reflejo de la práctica clínica habitual (“real life”), y por ello, aún no hallándose las condiciones experimentales óptimas, su validez externa y reproducibilidad era aceptable. Por otro lado, el hecho de que no hubiera una gran sobrecarga a la hora de reportar la información clínica de los pacientes, porque se solicitaba solo la que finalmente serviría para los análisis, hizo que esta fuera reportada de primera mano por los hematólogos sin ningún tipo de remuneración económica (“investigator fee”). Se puede especular que la información que se trató tenía una alta calidad.

Una vez analizados los resultados del estudio LPA99, se diseñó y se puso en marcha un nuevo estudio observacional de un solo brazo, el protocolo PETHEMA LPA2005. Siguiendo la misma estrategia de adaptar el tratamiento al riesgo de recaída, se decidió añadir citarabina en la consolidación de los pacientes de alto riesgo, mientras que en los pacientes de riesgo bajo e intermedio se disminuyó la dosis de mitoxantrone en el segundo ciclo de consolidación, y se añadió ATRA en la consolidación de los pacientes de bajo riesgo. Los motivos para llevar a cabo estos cambios respecto al protocolo LPA99 fueron: 1) un estudio conjunto comparativo entre el grupo PETHEMA y el European APL group sugería que la adición de citarabina podía ser beneficioso para los pacientes de alto riesgo al disminuir el riesgo de recaída (Artículo Anexo I); 2) el segundo ciclo de consolidación con mitoxantrone se había

demostrado especialmente tóxico,⁵⁰ y esto conllevaba un alto riesgo de mortalidad en RC; y 3) parecía razonable añadir ATRA en consolidación en los pacientes de bajo riesgo, puesto que la toxicidad de este agente era mínima y podía aumentar la eficacia antileucémica al combinarse con la quimioterapia. Además, el protocolo LPA2005 incluyó el concepto de adaptar la quimioterapia al riesgo de mortalidad tóxica, y no solo al riesgo de recaída leucémica. Así, se omitió la administración de citarabina con independencia del grupo de riesgo de recaída en todos los pacientes de edad mayor de 60 años, más vulnerables y con mayor mortalidad tóxica en consolidación en los protocolos previos.¹⁰⁰ Los resultados preliminares del protocolo LPA2005 fueron publicados recientemente, demostrando que esa nueva estrategia adaptada al riesgo conllevaba una disminución significativa del riesgo de recaída en los pacientes menores de 60 años con LPA de alto riesgo. Aunque en este subgrupo la consolidación fue más tóxica (por contener dosis intermedias de citarabina), y se produjo un discreto aumento de la mortalidad tóxica en RC, la disminución de las recaídas condujo a una mejoría en la SLE. En los pacientes de riesgo intermedio y bajo, la disminución de la intensidad de la consolidación no se tradujo en un aumento de la tasa de recaídas (Artículo Anexo 2).

Respecto a las complicaciones amenazantes para la vida durante la inducción con ATRA y antraciclinas, el síndrome de diferenciación representa, junto a las hemorragias y la coagulopatía, una de las más frecuentes en la LPA. En un análisis realizado en 739 pacientes incluidos en los protocolos LPA96 y LPA99, se describieron las causas de muerte en inducción y los factores pronósticos específicos para cada una de ellas (Artículo Anexo 3). Ese estudio mostró un mortalidad en inducción cercana al 10%, siendo la principal causa de muerte la hemorragia, sobre todo de localización cerebral y de presentación precoz, seguida de las infecciones. A diferencia del resto de las LMA, en la LPA las infecciones no fueron la causa más frecuente de mortalidad relacionada con la quimioterapia de inducción, y no se observaron casos de resistencia terapéutica. El síndrome de diferenciación fue causa de muerte en casi el 2% de los pacientes, observándose mayor mortalidad por esta causa en pacientes con peor ECOG al diagnóstico. Dentro de esta Tesis Doctoral, el artículo que analiza la incidencia y factores de riesgo para el desarrollo del síndrome de diferenciación es el más citado de los tres, con más 100 citaciones en 5 años. Este estudio sigue siendo el que analiza este síndrome en un mayor número de pacientes y con más detalle en la literatura científica. Se reportó la incidencia (25%), la cronología (bimodal, con un primer pico en la primera semana y un segundo en la tercera), la severidad (50% de las formas fueron severas), y la frecuencia de cada uno de los síntomas asociados al

síndrome. Además, se identificaron los factores de riesgo para el síndrome de diferenciación, siendo una creatinina basal elevada y una cifra de leucocitos en SP $> 5 \times 10^9/L$ los factores de riesgo independientes asociados al desarrollo de las formas severas del mismo. Con estos datos, en el protocolo PETHEMA LPA2012 se decidió intensificar la profilaxis del síndrome con dexametasona en los pacientes que presentaran estos factores de riesgo. Por otra parte, en este estudio también se investigaron las consecuencias derivadas del desarrollo del síndrome, observándose una mayor morbilidad y mortalidad en los pacientes con formas severas. Cabe decir que la frecuencia del síndrome de diferenciación no está establecida en los pacientes que reciben tratamiento con el otro agente diferenciador activo en la LPA, el ATO, pero se recomienda administrar agentes citorreductores para prevenir su aparición en pacientes con leucocitosis a la presentación. Por otro lado, se exploró el papel de la profilaxis universal con prednisona, administrada en el LPA99, observándose una disminución de la incidencia de las formas severas en ese protocolo. Sin embargo, la profilaxis universal con prednisona no se considera el estándar en el manejo del síndrome por la ausencia de datos sobre el posible incremento en las complicaciones infecciosas durante la inducción. Por este motivo, tanto en los protocolos LPA2005 como LPA2012, se optó por tratamiento precoz con dexametasona ante la aparición de los primeros síntomas, y por una profilaxis con dexametasona adaptada al riesgo. Sin duda, el análisis detallado del síndrome de diferenciación en estos dos últimos protocolos aportará información sobre el impacto de estas estrategias preventivas sobre la incidencia y severidad del síndrome, así como sobre la morbilidad y mortalidad asociadas.

El estudio de los factores predictivos de la recaída leucémica es el tercer pilar de este proyecto de Tesis. Como se ha mencionado antes, el conocimiento de nuevos factores podrían ayudar a refinar las estrategias de tratamiento adaptado al riesgo en la LPA. El interés del análisis de las mutaciones de FLT3 radicaba en aclarar su impacto en la supervivencia y recaída en la LPA, puesto que ya era un marcador pronóstico adverso consolidado en la LMA. Por otra parte, también se pretendía establecer las características clínicas y biológicas asociadas a la LPA FLT3 positiva. De hecho, las LMA no promielocíticas con mutación FLT3 son consideradas una entidad diagnóstica diferenciada en la clasificación de la WHO para las neoplasias hematológicas.¹⁰¹ En nuestro estudio se encontraron asociaciones biológicas con marcadores de inmadurez leucémica, pero no se demostró un peor pronóstico en los pacientes con estas mutaciones, por lo que se desestimó realizar tratamientos a medida para los pacientes con LPA FLT3 positiva. Sin embargo, con la irrupción de

inhibidores potentes y selectivos de FLT3, con demostrada actividad antileucémica en LMA,¹⁰² no cabe descartar que los pacientes con LPA FLT3 positiva puedan beneficiarse en el futuro de esquemas adaptados con estas nuevas drogas.

El grupo cooperativo PETHEMA también ha estudiado otras características biológicas potencialmente asociadas a un mayor riesgo de recaída en la LPA. En concreto, se analizó el impacto de las anomalías cromosómicas adicionales a la t(15;17) en una amplia serie de pacientes tratados con los protocolos LPA96 y LPA99 (Artículo Anexo 4). Hasta la realización de este estudio, el valor pronóstico de la presencia de estas anomalías genéticas era motivo de controversia. En este análisis se demostró que, a diferencia de las LMA, la mayor complejidad en el cariotipo de la LPA no se correlacionaba con una mayor tasa de recaídas. Otro estudio de factores pronósticos, esta vez realizado junto al North American cooperative group, consistió en el análisis de los resultados terapéuticos en las LPA con morfología M3 variante (Artículo Anexo 5). Este estudio tenía como gran defecto la definición de la LPA M3v, basada exclusivamente en la visión y descripción de las células por morfológicos en laboratorios no centralizados, siendo esta clasificación más o menos reproducible por la falta de claros criterios para la definición de la M3v. Aún así, el análisis mostró datos interesantes, corroborando la fuerte asociación de la morfología atípica con la leucocitosis al diagnóstico, y sobre todo mostrando que la LPA M3v no tenía un valor pronóstico independiente de la cifra de leucocitos para predecir la recaída leucémica. Otro marcador controvertido en la LPA era la expresión del antígeno CD56 (factor de adhesión neural) en la superficie de los blastos leucémicos. Aunque este se había asociado a infiltración y recaída extramedular en la LMA, y en la LPA había dos estudios que sugerían una mayor tasa de recaídas en la LPA CD56 positiva, el número de pacientes estudiados era relativamente escaso y en ningún estudio se realizó un análisis multivariante junto a otros potenciales factores de riesgo. El trabajo del grupo PETHEMA, realizado en una amplia serie de pacientes homogéneamente tratados, demostró que la expresión de CD56 era un factor pronóstico independiente para la recaída hematológica (tanto medular como extramedular) (Artículo Anexo 6). Se concluyó que la expresión de CD56 podía ser útil para diseñar esquemas terapéuticos adaptados al riesgo de recaída, y, de hecho, el actual protocolo PETHEMA LPA2012 tiene en cuenta la expresión de este marcador a la hora de estratificar los pacientes. Así, cuando un paciente con LPA de riesgo bajo de recaída, según el modelo predictivo basado en leucocitos y plaquetas, tiene blastos CD56 positivos, se le indica la consolidación del grupo de riesgo intermedio. De la misma forma, los pacientes de riesgo intermedio con LPA CD56 positiva serán tratados con el esquema de alto

riesgo. El futuro análisis de este protocolo esclarecerá si esta nueva estrategia adaptada al riesgo consigue disminuir la elevada incidencia de recaída en los pacientes con LPA CD56 positiva. Por otra parte, el impacto de CD56 sobre la recaída en el sistema nervioso central fue publicado por el grupo PETHEMA en un análisis específico sobre los factores de riesgo para esta complicación (Artículo Anexo 7). En ese estudio se describió una incidencia global de recaída meníngea en la LPA relativamente baja (1%), y esta fue más frecuente en los pacientes con más de $10 \times 10^9/L$ leucocitos en SP, en aquellos que desarrollaron hemorragia cerebral durante la fase de inducción, y en aquellos con blastos CD56 positivos. Sin embargo, la expresión de CD56 no fue incluida en el análisis multivariante ya que ese dato no estaba disponible en aproximadamente la mitad de los casos. A raíz de este estudio, en el protocolo LPA2012 se decidió administrar quimioterapia intratecal profiláctica en las consolidaciones a los pacientes con hemorragia intracraneal durante la inducción. La eficacia de esta estrategia adaptada al riesgo para reducir la incidencia de recaída meníngea deberá ser explorada en el análisis definitivo del protocolo LPA2012.

8 CONCLUSIONES

Este proyecto de Tesis Doctoral se ha centrado en el análisis de una amplia serie de pacientes diagnosticados de LPA tratados con esquemas terapéuticos basados en la combinación de ATRA y antraciclina. Sus conclusiones son:

1. El análisis del protocolo LPA99 demostró que, mediante la aplicación de una estrategia de tratamiento adaptado al riesgo de recaída, se pudo optimizar la intensidad de la quimioterapia de consolidación, resultando en una mejoría global de la SLE y CIR comparado con el anterior protocolo LPA96.
2. Los esquemas quimioterápicos basados en ATRA y antraciclina mostraron una excelente eficacia antileucémica, sin resistencias en la fase de inducción, y con un pequeño porcentaje de recaídas leucémicas, lo que se tradujo en una SG superior al 80% en los pacientes con LPA.
3. La tolerabilidad, toxicidad, y cumplimentación de estos protocolos fue aceptable. Aún así, la muerte por toxicidad en RC seguía siendo una causa no infrecuente de fallo terapéutico.
4. La muerte en inducción fue, junto a la recaída leucémica, la causa más común de fracaso terapéutico. El conocimiento de las complicaciones amenazantes para la vida, como el síndrome de diferenciación, fue considerado un pilar fundamental de los estudios de investigación clínica para mejorar los resultados en la LPA.
5. El estudio de la incidencia, características y factores de riesgo para el síndrome de diferenciación permitió conocer con detalle la magnitud de esta complicación de la inducción, así como establecer las pautas de profilaxis con dexametasona adaptada al riesgo que se aplicaron en protocolos sucesivos.
6. La identificación de nuevos factores pronósticos para predecir la recaída leucémica fueron considerados necesarios para intentar refinar los índices pronósticos, con el fin de mejorar las estrategias de tratamiento adaptado al riesgo.
7. El estudio del impacto pronóstico de FLT3, de marcado índole traslacional, permitió conocer las características clínicas y biológicas asociadas a esta mutación en la LPA. Este análisis concluyó que estas mutaciones no tenían un valor pronóstico independiente de la cifra de leucocitos, por lo que se

descartó su incorporación como factor a tener en cuenta en los algoritmos de tratamiento adaptado al riesgo.

8. Este conjunto de estudios ha permitido un conocimiento profundo y un avance en el manejo de la LPA en sus sucesivas fases de tratamiento. Sin embargo, con el advenimiento de nuevos regímenes terapéuticos sin quimioterapia para la LPA (ATO y ATRA), los hallazgos reportados aquí tendrán que ser evaluados en un nuevo contexto terapéutico.