

PERIL MUTACIONAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN

Asinari MB¹; Zeballos MA²

RESUMEN

Introducción: La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es una enfermedad heterogénea en la cual el análisis molecular adquiere cada vez más preponderancia. En los últimos años, se ha profundizado el estudio de mutaciones encontradas en esta patología mediante tecnologías de secuenciación masiva como *next-generationsequencing* (NGS), ello ha permitido obtener el perfil mutacional de la misma. El objetivo de este trabajo es evaluar mutaciones en pacientes con diagnóstico de LMA que permiten un mejor diagnóstico, sub-clasificación y pronóstico. **Materiales y Métodos:** Fueron incluidas 30 muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LMA *de novo*, recaídas y secundarias, en un rango etario de 1 a 74 años, analizadas mediante NGS a través de un panel de genes conocidos por su compromiso en LMA. **Resultados:** Se encontraron 144 mutaciones en el grupo general, con un promedio de cuatro mutaciones por paciente. Además, se estudiaron los mecanismos de acción involucrados en estas mutaciones, los cuales incluyeron genes asociados a la metilación del ADN (24%) y comprendidos en la señalización celular (21%). También se estudió la edad de los pacientes, encontrando que aquellos de mayor rango etario portaban mayor número de mutaciones. Otro aspecto evaluado fue la citogenética con respecto al tipo de mutaciones encontradas y se observó que las presentes en TP53 se asociaron a pacientes con cariotipo anormal. Además, aquellos pacientes categorizados como riesgo intermedio de acuerdo a la citogenética, mediante NGS, se movilizaron a riesgo adverso según las recomendaciones del *EuropeanLeukemiaNet* y en este grupo, la mayoría de los pacientes presentaron más de 60 años. **Conclusión:** Estos hallazgos son de importancia ya que permiten comprender la patogénesis de la enfermedad, estratificar a los pacientes de acuerdo a categorías de riesgo y la posibilidad de elegir estrategias terapéuticas de manera personalizada, permitiendo mayor sobrevida y mejor pronóstico.

Palabras Clave: Leucemia Mieloide Aguda, *next-generationsequencing* (NGS), mutaciones.

¹Bioquímica especialista en Hematología – Laboratorio de Oncohematología y genética - Hospital Privado Universitario de Córdoba – Córdoba - Argentina.

²Bioquímico - Laboratorio de Oncohematología y genética - Hospital Privado Universitario de Córdoba - Córdoba - Argentina.

✉ Mariana Beatriz Asinari
marianaasinari@hotmail.com

BIOQUINFORMA DIGITAL

Publicación on-line del Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba (ISSN: 2344-9926)

INTRODUCCIÓN

Tanto a nivel biológico como clínico, la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) representa una enfermedad heterogénea con características morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas variables. Las pruebas citogenéticas son necesarias para la sub clasificación de la enfermedad ya que ciertas aberraciones son definitorias en cuanto al pronóstico. La detección de anomalías citogenéticas seleccionadas es un fuerte marcador predictivo para definir subgrupos pronósticos en LMA. Más allá de la citogenética, en el año 2008 la Organización

Mundial de la Salud (OMS) introdujo dos entidades a nivel molecular: LMA con mutaciones en el gen NPM1 y LMA con mutaciones en el gen CEBPA¹. La revisión del año 2016 de esta clasificación agregó una entidad provisional, LMA con mutaciones en el gen RUNX1 y una sección adicional sobre neoplasias mieloides con predisposición germinal, identificando mutaciones en la línea germinal en los genes CEBPA, DDX41, RUNX1, ANKRD26, ETV6 o GATA2². Más recientemente, se han identificado otros genes clínicamente significativos en la LMA y una prueba de ello es el estudio *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, en el cual se analizaron muestras con diagnóstico de LMA a través de secuenciación de próxima generación (NGS), tanto genómica como exómica, donde categorizaron a las mutaciones encontradas de acuerdo a los mecanismos de acción que contribuyen a la patogenicidad³. Esta nueva técnica de secuenciación utilizada permite evaluar mutaciones de una manera cualitativa y cuantitativa que difiere de la metodología convencional que se utilizaba como *gold standard* (Método de Sanger) y parecería ser la nueva manera de complementar el estudio de pacientes con LMA con la posibilidad de formular modelos pronósticos. Queda demostrado que el universo de esta entidad no solo queda circunscripto a la citogenética convencional sino también a alteraciones moleculares que indican pronóstico y que ayudan a reclasificar el grupo de pacientes con citogenética de riesgo intermedio para categorizarlos como riesgo adverso. Numerosos estudios fueron publicados a continuación de los citados anteriormente, demostrando alteraciones, en distintos genes que se pueden encontrar en esta enfermedad, que continúa siendo muy heterogénea. El objetivo de este trabajo es evaluar el perfil mutacional de pacientes con diagnóstico de LMA de novo, recaídas y secundarias que permite un mejor diagnóstico, sub-clasificación y pronóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y muestras

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y transversal en donde se seleccionaron 30 muestras de pacientes que presentaron diagnóstico de LMA de las cuales la gran mayoría correspondían a médula ósea (n=23) y el resto a sangre periférica (n=7). El recuento de células sanguíneas, examen morfológico, el aspirado de

médula ósea, biopsia ósea e inmunofenotipificación, se realizaron mediante procedimientos estándares. Las muestras fueron recolectadas entre enero de 2017 y octubre de 2018 en distintos estadios: diagnóstico, progresión y recaída. Las muestras correspondientes al momento del diagnóstico fueron 17, las recaídas 5 y la de otros diagnósticos que progresaron a LMA fueron 8. Las muestras pertenecían a 11 varones y 19 mujeres con un rango de edad de 1 a 74 años con una media de 45,6 años (desvío estándar: 23,5). Los diagnósticos de los pacientes de acuerdo a la clasificación FAB (French–American–British) fueron M0=4, M1=3, M2=11, M3=1, M4=3, M5=3 y sin datos 5 de ellos. Los 8 pacientes con LMA secundarias poseían diferentes diagnósticos: Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC), Síndrome Mielodisplásico (SMD), Mielofibrosis (MF) y un paciente con un tumor sólido.

Para el análisis de las mutaciones, el ácido desoxirribonucleico (ADN) fue extraído con QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante y cuantificado por fluorometría con Qubit 3.0 por medio de Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisherScientific).

Perfil Mutacional

El estudio mutacional fue realizado con TruSight® Myeloid Sequencing Panel (Illumina) con 50 ng de ADN y utilizando las indicaciones del fabricante. Este panel contiene 568 amplicones de ~ 250 pares de bases. El panel analiza 54 genes, de los cuales están cubiertos de manera completa 15: BCOR, BCORL1, CDKN2A, CEBPA, CUX1, DNMT3A, ETV6/TEL, EZH2, KDM6A, IKZF1, PHF6, RAD21, RUNX1, STAG2 and ZRSR2 y 39 regiones específicas: ABL1, ASXL1, ATRX, BRAF, CALR, CBL, CBLB, CBLC, CSF3R, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MLL, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PTEN, PTPN11, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1 y WT1. Las librerías fueron normalizadas a través de *beads* magnéticas (BeckmanCoulter). La secuenciación fue realizada mediante síntesis en un equipo MiSeq (Illumina) utilizando celda de flujo con química V3.

El alineamiento y llamado de variantes fue realizado con el *software MiSeqReporter* y *Sophia DDM*. El filtrado de variantes se realizó usando las herramientas informáticas *BaseSpaceVariantInterpreter* y *Shopia DDM*. No

fueron tenidas en cuenta variantes benignas, posiblemente benignas y variantes de significado incierto que reunieran alguno de los siguientes criterios: variantes sinónimas, variantes en regiones intrónicas, variantes en regiones homopoliméricas, variantes con una frecuencia poblacional > 1% (ExAc, GenomAD, ESP5400). Tampoco se incluyeron variantes que tuvieran una cobertura menor a 100X y variantes con una frecuencia alélica (VAF) < 5%.

RESULTADOS

Perfil Mutacional encontrado

El rango de mutaciones encontradas por paciente fue de 1 a 22 y el promedio por paciente fue de 4,9. La totalidad de los pacientes contenían al menos una mutación. El total de mutaciones encontradas en los 30 pacientes fue de 144. Las mutaciones halladas se encontraban en los genes TET2 (n=15), STAG2 (n=13), DNMT3A (n=12), BCOR (n=11), NRAS (n=7), RUNX1 (n=6), IDH2, ASXL1, BCORL1, KIT y NOTCH1 (n=5), CUX1, FLT3-ITD, IKFZ1, NPM1 y TP53 (n=4), IDH1 y ZRSR2 (n=3), CDKN2A, EZH2, FLT3-TKD, GATA2, JAK2, KRAS, PTPN11, SETBP1, SRFS2 y KMD6A, (n=2), CALR, CSF3R, FLT3del, KMT2A, PHF6, SF3B1, WT1 y SMC1A y SMC3 (n=1) (Tabla 1). Se decidió no reportar variantes en el gen CEBPA, debido a que el mismo presentó baja cobertura en determinadas regiones ya sea del tipo vertical u horizontal.

Se analizó el rango etario de la totalidad de los pacientes *versus* el número de mutaciones encontradas en sus muestras y se pudo apreciar que a medida que se elevaba la edad de los pacientes aumentaba el número de mutaciones encontradas. El grupo de pacientes mayores e iguales a 70 años eran los que poseían mayor número de mutaciones que constaban de hasta 22 mutaciones (3-22). Este grupo albergaba a 5 pacientes, 3 de ellos eran LMA secundarias y 2 de ellas *de novo*. Luego le siguió el grupo de pacientes de 60 a 69 años que poseían hasta 9 (2-9) este grupo constaba de 7 pacientes, 2 de ellos LMA secundarias, 4 *de novo* y 1 paciente recaído. Después, el grupo de 50 a 59 años, en el mismo se hallaron hasta 5 mutaciones (4-5) en los 4 pacientes, 2 de ellos eran LMA secundarias, 1 paciente en recaída y 1 paciente con LMA *de novo*. Luego, el grupo de pacientes de 25 a 49 años con hasta 8 (1-8) mutaciones, 8 ocho pacientes, 1 de ellos con LMA secundaria, 5 pacientes con LMA *de novo* y 2 recaídos y el

último grupo de 17 años o menos con hasta 4 mutaciones (1-4) constituido por 6 pacientes todos LMA *de novo* menos 1 paciente en recaída (Tabla 2). Se evaluó el número promedio de mutaciones de acuerdo a al momento donde fue realizado el panel mieloide, es decir LMA *de novo*, recaída y secundaria y se halló que los pacientes con LMA *de novo* presentaban un promedio de 4,4 mutaciones, los que estaban en recaída mostraron un promedio de 3,4 mutaciones y los diagnosticados como LMA secundarias presentaron un promedio de 6,75 mutaciones.

Mecanismos de acción representados

Con respecto al mecanismo de acción de las mutaciones encontradas en la totalidad de los pacientes, el grupo más frecuentemente representado fue aquel cuyos genes mutados están involucrados en la metilación del ADN como DNMT3A, IDH1, IDH2, y TET2 (24%) luego le siguieron las mutaciones de genes involucrados en la señalización celular (21%), como FLT3-ITD y TKD, CSF3R, JAK2, KIT, KRAS, NOTCH1, NRAS y PTPN11. Luego continuaron las mutaciones en los genes supresores de tumores (16%) como BCOR, BCORL1, CDKN2A, PHF6, TP53 y WT1. Después siguieron las mutaciones en genes involucrados en el complejo de cohesinas (10%) como STAG2, SMC1A y SMC3. Por último aparecían las mutaciones en los genes involucrados en la modificación de la cromatina (6%) como ASXL1, EZH2, KMD6A y KMT2A, les continuaron las mutaciones en genes de factores de transcripción mieloide (5%) como GATA2 y RUNX1, luego las mutaciones en genes del complejo de espliceosoma (4%) como SF3B1, SRFS2 y ZRSR2 y por último mutaciones en el gen NPM1 (2%).

Mutaciones en LMA *de novo*, recaídas y secundarias

Se recolectaron muestras de pacientes que presentaban, LMA *de novo*, recaídas o secundarias a otra patología. En el análisis realizado con respecto a las mutaciones encontradas en los distintos tipos de muestra en las LMA *de novo* (n=17) las mutaciones más frecuentes se presentaron en los genes DNMT3A, BCOR, TET2, NRAS, IDH2 y STAG2. En los pacientes en donde la muestra fue recolectada en el momento de la recaída (n=5), aunque el grupo es muy pequeño, las mutaciones más frecuentes se presentaron en los genes KIT y DNMT3A. En

el grupo de pacientes con diferentes diagnósticos que progresaron a LMA (n=8), es decir las secundarias, las mutaciones más frecuentes se presentaron en los genes STAG2, TET2, ASXL1, SRSF2 y IKZF1.

Citogenética

De los 30 pacientes analizados, 11 de ellos portaban un cariotipo normal, otros 11 pacientes portaban cariotipos anormales, en 7 de ellos no se pudo determinar por ausencia de desarrollo de metafases y a uno de ellos no se le realizó cariotipo. De los pacientes con cariotipos anormales 3 fueron complejos. En los pacientes con cariotipos normales las mutaciones más representadas se ubicaron en los genes STAG2, TET2, NRAS, DNMT3A, NPM1, RUNX1 e IDH2. Las mutaciones en los genes DNMT3A e IDH2 se encontraron en muestras de pacientes con LMA *de novo* y las alteraciones en el resto de los genes nombrados se presentaron en LMA *de novo*, recaídas y secundarias.

En los cariotipos anormales las mutaciones más frecuentemente encontradas estuvieron presentes en los genes BCOR, TET2, TP53, STAG2, DNMT3A, BCORL1, NOTCH1, CUX1. Tanto BCOR, BCORL1, TP53 y CUX1 se encontraron en pacientes con cariotipos anormales de muestras con LMA de diagnóstico y las mutaciones en los genes TET2, STAG2, DNMT3A Y NOTCH1 estaban presentes en los cariotipos anormales de muestras de las tres categorías, secundarias, recaídas y LMA *de novo*. Las LMA con cariotipos anormales, en conjunto, presentaron mayor número de mutaciones que aquellas LMA con cariotipos normales.

También se pudo observar que un paciente con t(8;21) presentó mutación en el gen KIT, el mismo era LMA *de novo*, y en otro paciente que a su diagnóstico presentó esta traslocación, corroborada por PCR convencional, también se demostró la mutación en el gen KIT. De igual modo sucedió con un paciente en recaída con inv16, el mismo presentó mutación en el gen KIT; todas ellas descritas en la literatura⁴.

Pronóstico

En el año 2017 un panel de expertos del *European Leukemia Net* (ELN) publicaron recomendaciones, para estratificar a los pacientes con LMA de acuerdo a tres categorías de riesgo en base a la citogenética y la genética molecular: favorable, intermedio y adverso⁵. En esta serie de

30 pacientes con LMA, 13 de ellos contenían mutaciones en genes de riesgo adverso es decir un 43% de los pacientes y los pacientes que portaban la mutación FLT3-ITD presentaron un *ratio* alélico mayor igual a 0,5.

Del total de pacientes con mutaciones categorizadas como riesgo adverso por el ELN (n=13), 20% de ellos contenían mutaciones en el gen RUNX1 y 13% contenían mutaciones en TP53, FLT3-ITD y ASXL1 (Tabla 3). En este grupo de pacientes con mutaciones de riesgo adverso la mayoría correspondía a LMA de diagnóstico (n=7), continuaban los pacientes con LMA recaída (n=3) y otros 3 pacientes con LMA secundaria. Estos 13 pacientes con mutaciones en genes FLT3-ITD, RUNX1, ASXL1 y TP53 mostraron 2 o más mutaciones y 8 pacientes tuvieron 60 años o más al momento de recolección de la muestra. Luego se analizaron los 14 pacientes que pertenecían a riesgo intermedio de acuerdo a la citogenética, para estudiar cómo se categorizaban si se adicionaba al análisis NGS de acuerdo al ELN, y se observó que 9 de ellos pasaron del grupo pronóstico de riesgo intermedio al grupo pronóstico de riesgo adverso por las mutaciones encontradas.

Asociación de Mutaciones

A continuación se analizaron mutaciones asociadas a aquellas categorizadas como pronóstico adverso, de acuerdo a las recomendaciones del panel de expertos de ELN. Se encontró que 4 pacientes que portaban mutaciones FLT3-ITD, se asociaron a mutaciones en los genes DNMT3A, NPM1 e IDH2, en estos pacientes los cariotipos fueron normales o no aptos. Por su parte los 4 pacientes en quienes se encontraron mutaciones en el gen ASXL1, se asociaron a mutaciones en los genes SRSF2, STAG2, BCORL1, CDKN2A, DNMT3A y RUNX1, en estos pacientes como en los anteriores la mayoría de los cariotipos fueron no aptos. Por otro lado los 6 pacientes con mutaciones en el gen RUNX1 se encontraron asociadas a mutaciones en los genes BCOR, DNMT3A y STAG2, la mitad de ellos presentaron cariotipos normales. Por último se analizaron 4 pacientes con mutaciones en el gen TP53 y las mutaciones más frecuentemente asociadas a él se presentaron en los genes SRSF2, STAG2, BCORL1, CUX1, TET2 e IKZF1 y todos ellos excepto uno, presentaron cariotipos anormales.

DISCUSIÓN

El perfil mutacional en LMA es muy heterogéneo debido a la variedad de clones involucrados en la enfermedad que conviven al diagnóstico y también durante la recaída. En este trabajo esta premisa resultó demostrada ya que la totalidad de los pacientes contenían por lo menos una mutación y a medida que se avanza dentro del rango etario, un número mayor de mutaciones fueron encontradas como lo describe la bibliografía⁶. Cuando se analizaron los distintos estadios de la enfermedad, los que mayor número de mutaciones presentaron fueron las LMA secundarias, siguiéndoles las diagnosticadas *de novo* y por último los pacientes con LMA en recaída. Esto llevaría a pensar que en la LMA *de novo* y LMA secundaria, un mayor número de clones anormales estarían presentes, en cambio en la recaída se realizaría una selección, ya sea por el tratamiento o debido a que los clones más resistentes persisten en menor número y son tan eficaces como para desencadenar LMA nuevamente. Por otro lado, las mutaciones más frecuentemente encontradas en la totalidad de los pacientes analizados se presentaron en los genes TET2, STAG2, DNMT3A, BCOR, FLT3, NRAS, IDH2, RUNX1, ASXL1, BCORL1, KIT y NOTCH1 en orden de cantidad. Estos hallazgos podrían tener diferencias con la bibliografía publicada por el hecho de que el grupo de estudio de este trabajo fue un conjunto diverso de pacientes, no solo LMA *de novo*, sino también LMA recaídas y secundarias, además debido a que el número de pacientes es bajo. Cabe destacar que el gen CEBPA no fue cubierto de manera completa por ello no se obtuvo ninguna información del mismo. Se considera que esto es debido a que este gen posee alto contenido en Guanina y Citosina en su composición, lo que lo hace muy difícil de secuenciar y además porque este panel está diseñado para secuenciar amplicones y no un diseño mediante sondas de captura que poseen mejor cobertura de este gen.

Con respecto a los mecanismos de acción involucrados, los predominantes fueron aquellos genes implicados en la metilación del ADN y en la señalización celular como está reportado en la bibliografía, estas mutaciones aparentemente aparecerían al comienzo como clones pre-leucémicos en el caso de las involucradas en la metilación del ADN y como eventos secundarios las involucradas en la señalización celular⁷. Por otro lado, si se divide en los distintos grupos, las

LMA *de novo* presentaron de manera más frecuente mutaciones en los genes DNMT3A, BCOR, TET2, NRAS, IDH2 y STAG2. En el grupo de las LMA recaídas los genes mutados con mayor frecuencia fueron KIT y DNMT3A. Cabe destacar que el número de pacientes de este grupo es pequeño (n=5) y que de ellos, 3 pacientes poseían al diagnóstico t(8;21) e inv16, probablemente esto influyó a que apareciera KIT como uno de los genes más frecuentemente mutados en esta categoría, tal como lo describe la bibliografía^{8,9}. En los pacientes con LMA secundarias las mutaciones más frecuentes se encontraron en los genes STAG2, TET2, ASXL1, SRFS2 y IKZF1. En este grupo los diagnósticos de los pacientes provenían de LMMC, SMD y MF agudizadas, creemos que debido a este hecho se vieron mutaciones como TET2, ASXL1 y SRFS2 ya que las mismas están muy representadas en estos grupos diagnósticos.

Con respecto a la citogenética, cabe destacar, que 4 pacientes con mutaciones en el gen TP53 presentaron cariotipos anormales y uno de ellos cariotipo complejo con deleciones 5q, 7q y anomalías en el cromosoma 17 tal como se describe en la bibliografía¹⁰. Este hallazgo se encontró en un bajo número de pacientes. Por otro lado, de los 14 pacientes anteriormente clasificados como riesgo intermedio de acuerdo a la citogenética, con este método de análisis completo de mutaciones en diferentes genes NGS, 9 se categorizaron como riesgo adverso debido a que presentaron mutaciones en los genes FLT3-ITD (alto *ratio* alélico sin NPM1), RUNX1, ASXL1, GATA2 o TP53. Del grupo de pacientes con cariotipos anormales, 7 de ellos ya correspondían, por el mismo, a riesgo desfavorable, otros 3 pacientes presentaron riesgo intermedio y solo un paciente pertenecía a la categoría de riesgo favorable.

Un 43% (n=13) de la totalidad de los pacientes analizados presentaron mutaciones categorizadas como riesgo adverso y la mayoría de ellos tenían 60 años de edad o más, esto demuestra que a medida que los pacientes avanzan en edad aumentan las probabilidades de entrar en esta categoría. Con respecto a las asociaciones que presentaron las mutaciones de riesgo adverso según el ELN, en este trabajo FLT3-ITD se asoció con DNMT3A, NPM1 e IDH2 como describe la bibliografía. En el caso de ASXL1, se encontró conjuntamente con RUNX1 y con mutaciones del complejo de espliceosoma como es el caso de SRSF2 lo cual también se

encuentra descrito, y en el caso del gen TP53, aunque el número de muestras analizadas es bajo, también se encontraron semejanzas con lo publicado por las anomalías no con las mutaciones en genes en particular sino con respecto al cariotipo de estos pacientes¹⁰.

En conclusión, se considera que el aporte que proporciona la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) es una herramienta útil en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de pacientes con LMA, porque abarca la detección de múltiples alteraciones moleculares en paralelo debido a la diversidad de genes que pueden incluirse en estos paneles mieloides. Utilizar un simple marcador diagnóstico y pronóstico ya no es suficiente para informar el estado de la enfermedad como así tampoco su pronóstico. Cabe destacar que ya han sido aprobados por la FDA (Administración de medicamentos y alimentos) fármacos contra blancos moleculares específicos que pueden detectarse por esta metodología. Estos nuevos enfoques terapéuticos dirigidos son prometedores y NGS puede incluirse en la rutina de la práctica clínica y de laboratorio para conocer de manera más completa la enfermedad y con ello las opciones terapéuticas del paciente.

Agradecimientos

A la invaluable ayuda y predisposición de Ana Luisa Basquiera quien desinteresadamente prestó colaboración en este trabajo.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405.
- Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059-74.
- Paschka P, Döhner K. Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:209-219.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424-447.
- Moarii M, Papaemmanuil E. Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):37-44.
- Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):29-41.
- Hong-Hu Zhu, Ya-Zhen Qin, Lan-Ping Xu, et al. C-KIT- Mutated t(8;21)AML Patients with >3log Reduction of MRD Conferred a Very High Relapse and Need HSCT to Improve Outcome. *Blood* 128.22 (2016): 1620.
- Al-Issa K, Nazha A. Molecular landscape in acute myeloid leukemia: where do we stand in 2016. *Cancer Biol Med*. 2016 Dec;13(4):474-482.
- Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. 2017 Mar 20;35(9):934-946.