

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

UTILIDAD DE LA NGS EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE
NEOPLASIAS MIELOIDES

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar al grado y título de Especialista en Hematología

MARIEL QUESADA PANIAGUA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

DEDICATORIA

A mi familia y amigos, y sobretodo a mi esposa María Alejandra, por siempre motivarme y acompañarme en todo el proceso de este proyecto que muchas veces parecía interminable. Por su sacrificio y amor en el transcurso de estos años de estudio. A mis papás, hermanos y mi nueva familia por sus palabras de aliento. Este logro es para y por ustedes, con mucho cariño.

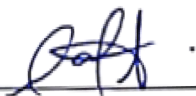
AGRADECIMIENTO

Agradezco a los miembros del comité, lectores y en especial a mi tutor, el Dr. Carlos Santamaría por su guía experta durante el desarrollo de este trabajo, su apoyo y consejos fueron fundamentales para la elaboración del proyecto. También agradezco el apoyo de mis profesores y compañeros de la Especialidad en Hematología por su motivación y consejos durante esta etapa académica que concluyo. Por último, agradezco a mis compañeros de trabajo del Hospital Dr. Tony Facio por su apoyo incondicional durante estos dos años de estudio.

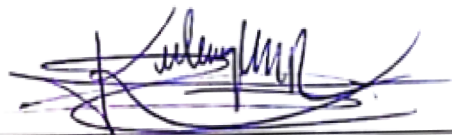
Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Hematología.



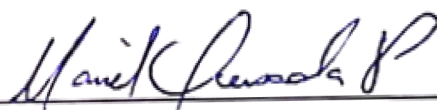
PhD. Carlos Santamaría Quesada
Profesor tutor



Esp. María José Suarez Sánchez
Lectora



Esp. Kimberly Miranda Rojas
Lectora



Mariel Quesada Paniagua
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
OBJETIVO GENERAL.....	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	4
METODOLOGÍA.....	5
CAPÍTULO I. GENERALIDADES DE LA NGS Y TÉCNICAS MOLECULARES AFINES.....	6
Preparación de las plantillas.....	9
Preparación de la biblioteca de ADN.....	11
Secuenciación.....	12
Detección de variantes.....	13
Aplicaciones de la NGS.....	15
CAPÍTULO II. AVANCES DE LAS TÉCNICAS BASADAS EN NGS EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE NEOPLASIAS MIELOIDES.....	17
Neoplasias mieloides con predisposición germinal.....	19
Neoplasias mieloproliferativas y Neoplasias mielodisplásicas/Neoplasias mieloproliferativas.....	22

SMD y LMA: Principales alteraciones genéticas de significado clínico.....	25
CAPÍTULO III. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN NGS CON OTRAS TÉCNICAS MOLECULARES DE USO CLÍNICO EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE NEOPLASIAS MIELOIDES Y LOS RETOS DE LA NGS EN LA ACTUALIDAD	36
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS	50

RESUMEN

Las neoplasias mieloides son un conjunto de enfermedades genéticamente diversas. Su diagnóstico está basado en la identificación de células mieloides malignas por medio de la morfología, inmunohistoquímica y la citometría de flujo. Posterior al diagnóstico, se realiza una subclasificación de la enfermedad con el objetivo de establecer un pronóstico y elegir el tratamiento. En la actualidad, el manejo de la enfermedad involucra distintas disciplinas y técnicas diagnósticas.

Las guías internacionales han incorporado distintas alteraciones genéticas para adecuar la terapia según la clasificación diagnóstica y pronóstica. Para su detección, se han utilizado técnicas convencionales que han ido sustituyéndose con el desarrollo de nuevas tecnologías más sensibles como qPCR, dPCR y la NGS.

Este documento describe el papel que tiene la NGS en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias mieloides, considerando el manejo actual que representan otras técnicas moleculares.

ABSTRACT

Myeloid neoplasms are a genetically diverse group of diseases. Their diagnosis is based on identifying malignant myeloid cells through morphology, immunohistochemistry, and flow cytometry. After diagnosis, the disease is further subclassified to establish prognosis and guide treatment. Currently, disease management involves various disciplines and diagnostic techniques.

International guidelines have incorporated different genetic alterations to tailor therapy based on diagnostic and prognostic classification. Conventional molecular techniques are being replaced by more sensitive technologies such as qPCR, dPCR, and NGS.

This present document describes the role of NGS in the diagnosis and monitoring of myeloid neoplasms, considering other molecular techniques in current management of the disease.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de metodologías de NGS.....	16
Tabla 2. Estratificación de riesgo por las anomalías genéticas según la ELN 2022	18
Tabla 3. Mutaciones somáticas más frecuentes en las NMP.....	24
Tabla 4. Genes frecuentemente mutados en los SMD y LMA ordenados alfabéticamente.	26
Tabla 6. Anomalías genéticas incluidas en la clasificación de LMA y otras neoplasias hematológicas	50
Tabla 7. Fármacos aprobados por el FDA para LMA.....	51
Tabla 8. Comparación de tecnologías no-NGS para la determinación de variantes en muy baja concentración	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas involucradas en la NGS: preparación de la biblioteca de ADN, amplificación, secuenciación y el análisis de datos.	8
Figura 2. Representación del flujo de trabajo de la preparación de la biblioteca de ADN en la NGS.	11
Figura 3. Diferencias en el panorama mutacional de las neoplasias mieloides.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ASPCR: PCR de alelo específico
bZip: Basic leucine zipper
CFM: Citometría de flujo multiparamétrica
CNV: Variantes en número de copias
DFS: Supervivencia libre de enfermedad
dNTP: deoxinucleótido difosfato
dPCR: PCR digital
ELN: European Leukemia Net
emPCR: PCR de emulsión
EMR: Enfermedad medible residual
FISH: Hibridación fluorescente in situ
GC: Guanina/citosina
HMP: Hematologic malignancies panel
HSC: Célula madre hematopoyética
ICC: Consenso internacional de clasificación
ITD: Duplicaciones internas en tándem
LMA: Leucemia mieloide aguda
LMC: Leucemia mieloide crónica
MAF: Mutation Annotation format
NCCN: Red Nacional Integral del Cáncer
NGS: Secuenciación de nueva generación
NMP: Neoplasias mieloproliferativas
OMS: Organización Mundial de la Salud
OS: Supervivencia general
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
RC: Remisión completa
RT-PCR: PCR en tiempo real
qPCR: PCR cuantitativa
SBS: Secuenciación por síntesis
SMD: Neoplasias mielodisplásicas
SNV: Variantes de un solo nucleótido

STR: Repeticiones cortas en tándem
SV: Variantes estructurales
TKD: Dominio tirosín quinasa
TSMP: TruSight Myeloid Panel
VCF: Variant call format
VAF: Frecuencia alélica de la variante
WES: Secuenciación del exoma completo
WGS: Secuenciación del genoma completo

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad que tiene actualmente la técnica de secuenciación de nueva generación (NGS), en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias mieloides, basado en la literatura y experiencia internacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las generalidades de la NGS y técnicas moleculares afines.
2. Determinar los avances que ha permitido la NGS en el diagnóstico y seguimiento de neoplasias mieloides.
3. Comparar la NGS con otras técnicas moleculares de uso clínico en el diagnóstico y seguimiento de neoplasias mieloides y explicar los retos que tiene la NGS en la actualidad.

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias mieloides son un grupo genéticamente heterogéneo de desórdenes hematopoyéticos clonales que se caracterizan por cambios morfológicos y hematopoyesis ineficaz (1,2). En este grupo se incluyen: la leucemia mielode aguda (LMA), neoplasias mielodisplásicas (SMD), neoplasias mieloproliferativas (NMP) y neoplasias mielodisplásicas/ neoplasias mieloproliferativas (SMD/NMP) (3). El diagnóstico está basado en la identificación de células mieloides malignas por medio de la morfología, inmunohistoquímica y la citometría de flujo. Posterior al diagnóstico, se realiza una subclasificación de la enfermedad con el objetivo de establecer un pronóstico y elegir el tratamiento (4). Actualmente, el sistema diagnóstico más utilizado es la guía de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Recientemente se han incluido anomalías genéticas específicas para el diagnóstico y clasificación de algunas entidades (3).

Aunque el diagnóstico se realiza con técnicas convencionales ya existentes, nuevas tecnologías permiten determinar aspectos pronósticos y terapéuticos que juegan un papel importante en la supervivencia, el manejo del paciente y la elección de la terapia. Algunas enfermedades presentan alteraciones genéticas específicas que permiten establecer su diagnóstico, sin embargo, otras mutaciones tienen una relevancia significativa en el pronóstico (5). Un solo paciente puede tener de 3-4 o más mutaciones *driver* patogénicas coexistiendo en un solo tumor y esto afecta el curso clínico de la enfermedad y su respuesta al tratamiento (4).

La detección de mutaciones que son clínicamente relevantes y que permiten establecer el pronóstico, puede realizarse con ensayos de identificación de un solo gen (un gen a la vez) o la detección simultánea y paralela de muchos genes por medio de la NGS. La elección del método variará según el número de mutaciones que se requiera identificar (6,7).

Por otro lado, existen diferentes métodos con distintas sensibilidades para la medición de la Enfermedad medible residual (EMR) que incluyen: citogenética (10^{-3}), hibridación fluorescente in situ (FISH) (10^{-4}), citometría de flujo multiparamétrica (CFM) o PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) (10^{-4} a 10^{-5}) (4). Todos ellos poseen limitantes que pueden generar resultados falsos negativos en presencia de nuevos clones malignos que evolucionen durante el tratamiento. La EMR por medio de NGS resulta cada vez más atractiva por su alta sensibilidad, aunque su costo puede ser mayor en comparación con las técnicas convencionales y actualmente, la NGS carece de estandarización para los ensayos de EMR (8).

JUSTIFICACIÓN

Las neoplasias mieloides representan una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial afectando principalmente a adultos mayores, sin embargo, las técnicas moleculares actuales de diagnóstico y seguimiento no satisfacen la necesidad de anticipar el pronóstico de la enfermedad. Esto se debe a la dificultad que aporta la heterogeneidad genética de estas neoplasias en la identificación de las mutaciones causantes del cuadro clínico.

Constantemente se desarrollan nuevas técnicas moleculares en búsqueda del mejoramiento en el diagnóstico y la estratificación de riesgo de la enfermedad. Su desarrollo se ha dificultado porque en ciertos casos hay mutaciones no descritas o nuevas mutaciones surgen en el curso de la enfermedad. Por lo tanto, se evaluará la utilidad que tiene la NGS en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias mieloides actualmente.

METODOLOGÍA

Se realizó el desarrollo del tema a través de la revisión de artículos científicos relacionados entre los años 2013-2024 y otras herramientas bibliográficas como libros digitales, mediante bases de datos como PubMed, Medline y el SIBDI de la Universidad de Costa Rica.

CAPÍTULO I. GENERALIDADES DE LA NGS Y TÉCNICAS MOLECULARES AFINES

Antes del surgimiento de la secuenciación de nueva generación (NGS), el método automatizado de secuenciación de Sanger (o secuenciación de primera generación) dominó como técnica para secuenciar durante dos décadas, incluyendo el éxito de la secuenciación del genoma humano (8). Además, actualmente se considera como el estándar de oro entre los métodos de secuenciación (9,10). El limitado volumen de procesamiento de la secuenciación de Sanger requirió el desarrollo de nuevas tecnologías como la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). Este método realiza la secuenciación paralela de millones de fragmentos de ADN, luego mediante analizadores bioinformáticos se alinean los fragmentos secuenciados y se comparan contra un genoma de referencia. Esto equivale a millones de secuenciaciones de Sanger realizadas individualmente (9–11).

Dependiendo del diseño del ensayo, la NGS puede ser utilizada para secuenciar genomas completos, áreas de interés o mutaciones específicas, pequeños indels, cambios estructurales, genes de fusión o translocaciones cromosómicas, expresión de genes y estudios de metilación del ADN, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad (12,13).

Una de las ventajas que se adquirió con la llegada de la NGS fue la capacidad de procesar un gran volumen de datos a un costo menor, lo cual ha permitido la comparación a larga escala de genomas completos de diferentes organismos (14). Además, permite identificar y cuantificar transcritos sin conocer la secuencia de un gen particular previamente, para el diseño de la PCR este requisito es indispensable. La NGS es ampliamente utilizada en la secuenciación del genoma humano con la finalidad de aumentar el entendimiento de cómo operan las diferencias genéticas en la salud y en el desarrollo, progreso y la terapia de las enfermedades humanas (10,15).

A nivel clínico, la NGS provee valiosa información diagnóstica y pronóstica sobre una enfermedad específica (9). Esta técnica también se ha utilizado para monitorear el quimerismo post trasplante de médula ósea y la EMR. Un ejemplo de la utilidad de la NGS es el estudio del antígeno humano leucocitario (HLA),

el cual es uno de los genes más polimórficos y con muchas implicaciones clínicas en el éxito de trasplantes sólidos y de células madre hematopoyéticas (HSC). Gracias al desarrollo de la NGS, la caracterización del HLA para compatibilidad de donantes y receptores es una realidad y se realiza con muy alta resolución y sensibilidad (14). Este mismo principio se ha considerado aplicar a los donantes relacionados de médula ósea para descartar la presencia de mutaciones germinales preexistentes.

La secuenciación de Sanger permite visualizar sustituciones de bases y pequeñas inserciones o deleciones. Todas estas variaciones se pueden evidenciar por medio de la NGS sin necesidad de realizar diferentes ensayos. Sin embargo, para deleciones de mayor tamaño o rearrreglos como inversiones o translocaciones (por ejemplo, *FLT3-ITD* y *KMT2A-MLL*), es necesario recurrir a otras técnicas moleculares convencionales como el FISH (6,13). Una de las limitaciones de la NGS es que las regiones con un alto contenido de guanina/citosina (GC) y secuencias con largas repeticiones pueden no ser secuenciadas correctamente (12). Además, los costos iniciales de instalación son elevados, requiere de mucho entrenamiento para elaborar un flujo de trabajo y los tiempos de respuesta son mayores en comparación a métodos moleculares de rutina clínica (14).

El método de NGS incluye las siguientes etapas: extracción de ADN, preparación de las plantillas de ADN, elaboración de la biblioteca de ADN, secuenciación e imagen, alineamiento del genoma, su ensamblaje y su análisis bioinformático (14,15). Estas etapas se encuentran descritas en la Figura 1.

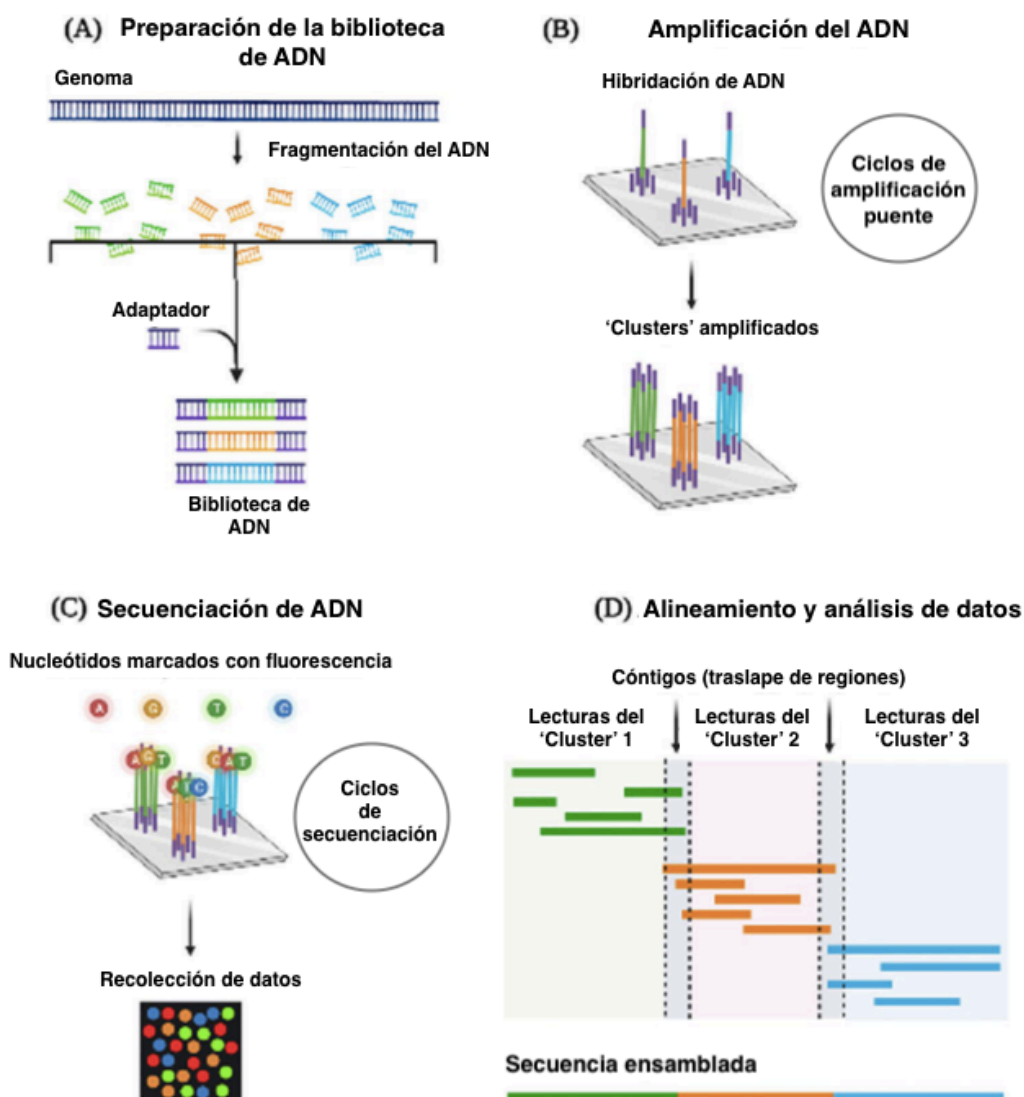


Figura 1. Etapas involucradas en la NGS: preparación de la biblioteca de ADN, amplificación, secuenciación y el análisis de datos.

Tomado y traducido de: Selvakumar, SC (16).

Similar a otras técnicas moleculares, el análisis por NGS conlleva una etapa de extracción donde la cantidad de muestra va a depender de la plataforma utilizada y del tipo de tejido que se estudie. La calidad de la muestra es un aspecto importante, las muestras con baja pureza podrían comprometer el análisis bioinformático posterior (9).

Como todos los métodos moleculares, la exactitud de la NGS se ve influenciada por la calidad, integridad y la cantidad de ácidos nucleicos usados. Generalmente, tejidos congelados, sangre periférica y aspirados de médula ósea, se consideran como una fuente de buena calidad para estos métodos. Por

otro lado, las muestras de tejidos y órganos fijados con formalina en parafina (FFPE), involucra el entrecruzamiento de proteínas y ácidos nucleicos en su preservación. Esto afecta la integridad, la eficiencia de la extracción y la amplificación de los ácidos nucleicos, ya que genera fragmentación del ADN, disminución del rendimiento del ADN y modificaciones químicas (7). Existen sistemas que permiten hacer una evaluación de la cantidad y calidad de la muestra como el Nanodrop (11).

La meta del estudio es primordial a la hora de elegir una metodología. Algunos aspectos por considerar a la hora de escoger la tecnología son: el largo de las secuencias de interés en pares de bases, el presupuesto y la cantidad y calidad de la muestra de ADN (17).

Preparación de las plantillas

Antes de la secuenciación, debe verificarse el tamaño del fragmento de ADN que se va a amplificar, dado que la capacidad de secuenciación de la NGS es de 400 a 600 pb. Las secuencias mayores a esa extensión, deben fragmentarse y purificarse antes de dar inicio a la secuenciación (9,14). Existen métodos para seleccionar el tamaño de la secuencia blanco, entre ellos: Ampure y Pippin Prep (14). Un punto importante por considerar al realizar la secuenciación es asegurar la cantidad de material genético inicialmente utilizado. Para ello, existen distintos métodos de control para medir la cantidad de ADN en la muestra. Algunos de éstos están basados en la absorción de luz UV, otros utilizan sondas fluorescentes para este fin (14).

Generalmente, el flujo de trabajo de la NGS incluye dos etapas de amplificación. La primera amplifica las regiones de interés en el genoma utilizando cebadores específicos y un alto número de ciclos de PCR. La segunda etapa, suele llamarse fase de enriquecimiento, donde las secuencias de interés son aisladas utilizando sondas de hibridación, cebadores con adaptadores acoplados y un número limitados de ciclos de PCR (7).

La PCR de emulsión (emPCR) y la amplificación en fase sólida son los métodos utilizados más comunes en preparación de plantillas para la amplificación. La emPCR consiste en un sistema libre de células, lo cual evita la pérdida arbitraria de material genético durante la preparación. Aquí se crea una biblioteca de fragmentos que se unen a los cebadores de la PCR y luego son sometidos a una primera etapa de amplificación. Posteriormente, los pocillos de reacción favorecen una secuencia que se amplifica en una segunda etapa. Las millones de secuencias obtenidas son inmovilizadas en diferentes sustratos como gel de poliacrilamida, vidrio u otro material (15).

En la amplificación de fase sólida se utiliza una alta densidad de cebadores *forward* y *reverse*, los cuales se unen covalentemente a la superficie de inmovilización. Se crean grupos o '*clusters*' de secuencias amplificadas espacialmente separadas. El método basado en amplificación es el principio utilizado por las plataformas Ion Torrent e Illumina (15,18).

El método de moléculas simples, en comparación con el de amplificación, suele utilizarse cuando se cuenta con poca muestra. Además, este segundo método no requiere del paso de PCR, disminuyendo sustancialmente la creación de mutaciones aleatorias que implica este paso, así como disminuye la interferencia que produce la amplificación de regiones ricas en AT y GC (15,18). Las plantillas de moléculas simples son inmovilizadas en sustratos sólidos de acuerdo con el método que se elija que puede variar entre: unir cebadores covalentemente al soporte sólido, unir las moléculas simples al soporte sólido covalentemente a partir de los cebadores unidos al soporte previamente, o en el tercer método, se unen moléculas de enzima polimerasa al soporte, a las cuales se une el complejo del primer-secuencia. En este último se pueden utilizar secuencias de ADN más largas y acoplar a métodos de RT-PCR (15). El método basado en moléculas simples se utiliza por los sistemas Pacific Biosciences y Oxford Nanopore (18).

Preparación de la biblioteca de ADN

Este paso consiste en preparar el material genético según el método de secuenciación elegido. Usualmente se realiza una etapa de fragmentación, luego la unión de los adaptadores y la selección del tamaño de las secuencias (figura 2). Esta selección permite eliminar adaptadores libres (19).

La fragmentación del ADN puede efectuarse por métodos físicos como la sonificación, enzimáticos como la ADNasa o fragmentasa o químicos (9,20). Los productos cortos obtenidos amplifican más eficientemente que aquellos de mayor longitud. Con la plataforma Illumina, una de las más usadas y populares en el mercado internacional, se han secuenciado librerías de hasta 1500 bp de longitud según el modelo utilizado. Este sistema puede usar un adaptador con un cebador en uno o ambos extremos, dependiendo si la secuenciación es de un sentido o pareada (19). Cuando se utilizan secuencias de ARN, éstas son fragmentadas por digestión a altas temperaturas en presencia de un metal divalente como el magnesio o el zinc (20).

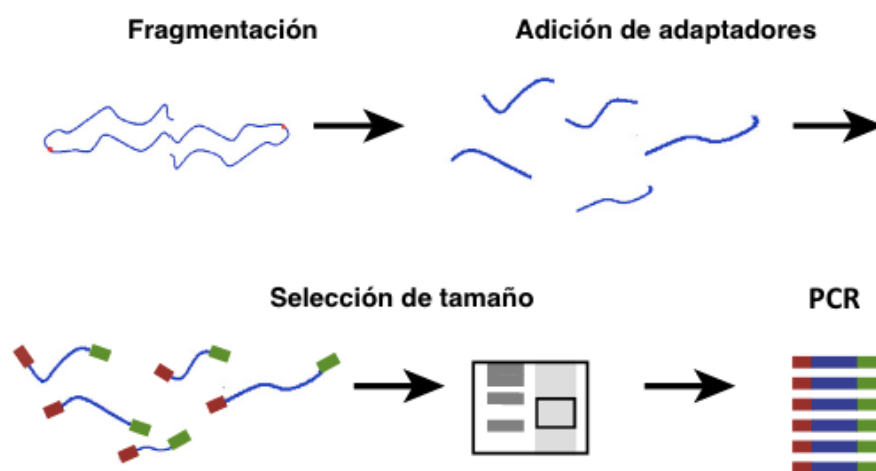


Figura 2. Representación del flujo de trabajo de la preparación de la biblioteca de ADN en la NGS.

Tomado y adaptado de: Van Dijk, EL (19).

Secuenciación

De acuerdo con el tipo de estudio que se quiera realizar, se establece el tipo de secuenciación: genoma completo, exoma completo o dirigida a través de paneles de genes dirigidos_(15). El exoma consiste en todos los genes que codifican para las proteínas y abarca aproximadamente el 1-1,5% del genoma completo. En el caso de las neoplasias mieloides, ya existe un amplio conocimiento sobre los genes de interés involucrados en la enfermedad. Lo más adecuado y eficiente es utilizar paneles de genes que provean una profundidad de secuenciación mucho más sensible que la secuenciación del genoma o del exoma completo (9,21).

El proceso de secuenciación por síntesis (SBS, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos de secuenciación más populares y ampliamente utilizados. La SBS es el fundamento utilizado por la plataforma Illumina y consiste en cargar la biblioteca preparada sobre un sustrato sólido o una celda de flujo que contiene oligómeros complementarios a un adaptador añadido en el paso anterior, los cuales son utilizados como plantilla para construir la hebra complementaria añadiendo base por base (7). Posteriormente, la PCR dará como resultado muchos fragmentos de secuencias de ADN. La SBS utiliza deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) marcados con fluorescencia y unidos reversiblemente para bloquear la continuación de la ADN polimerasa, llamados terminadores reversibles de la polimerasa. Este proceso genera secuencias de distintos tamaños (7,9,15).

La cobertura o profundidad de la lectura en NGS se refiere al promedio de lecturas en una secuencia que se alinean a una región específica en el genoma de referencia. Cuanta mayor sea la cobertura, más confianza y sensibilidad dará al método. La secuenciación de genoma completo posee una cobertura de 30X-50X, la secuenciación de exoma completo de 100X y los paneles dirigidos mayor a 500X para mutaciones somáticas. Otro concepto relevante en la NGS es la frecuencia alélica de la variante, o VAF por sus siglas en inglés, se define como la proporción entre las lecturas de ADN para la variante analizada entre el total de lecturas en esa posición. La profundidad y la VAF son conceptos

estrechamente relacionados que impactan la confiabilidad en la detección de las variantes (9,13).

Las lecturas de las secuencias se almacenan en un formato tipo texto llamado FASTQ, y éste se utiliza para acceder al software para la alineación con el genoma de referencia (12,15). Generalmente se alinea con el genoma humano de alguna base de datos conocida como el Genome Reference Consortium Human Build. Para evitar alineamientos falsos, se eliminan los adaptadores utilizados en la etapa de secuenciación y las bases que posean un puntaje de baja calidad (Q-score). Este alineamiento origina datos que se recopilan en un formato llamado SAM o BAM (Sequence Alignment Map o Binary Alignment Map), siendo BAM el más utilizado por su facilidad de manipulación (es un formato más compacto que SAM) y su compatibilidad con las herramientas de visualización como el Integrative Genomics Viewer (IGV). Existe otra forma de almacenar las secuencias alineadas llamada CRAM, es un archivo más comprimido que BAM y únicamente almacena las diferencias entre las lecturas secuenciadas y el genoma de referencia. Antes de realizar la detección de variantes, los archivos BAM necesitan ser depurados por artefactos y posibles errores de secuenciación que implica el método (9).

Detección de variantes

La detección de variantes es el proceso mediante el cual se determinan las diferencias entre la alineación de la secuencia en estudio y la secuencia de referencia. Los tipos de variantes más analizados son:

- Polimorfismos/variantes de un solo nucleótido (SNV): Los polimorfismos son cambios en una sola base y son comúnmente observados en la población. Las SNV se usa para referirse a cualquier mutación puntual con o sin sentido.

- Rearreglos o inserciones/deleciones (indels) menores a 50-100 pb. Las SNVs y los rearreglos son llamados en conjunto como variantes cortas.

- CNV o variantes en el número de copias se refieren a cambios en las copias del ADN, se incluye en la clasificación de variantes estructurales (SV) que abarca a las inversiones y translocaciones.

En la detección de variantes de línea germinal se utiliza herramientas como Samtools o GATK HaplotypeCaller. Generalmente para interpretación de estas variantes existen 3 tipos de genotipos según el escenario: si la secuencia se alinea completamente con la secuencia referencia, se considera homocigoto según la referencia (REF/REF), heterocigoto (REF/ALT) cuando se encuentra una variante adicional para una secuencia dada, y homocigoto para la variante (ALT/ALT). Las VAF esperadas para ellas serían 0%, 50% y 100%, respectivamente (9).

Por otro lado, la detección de variantes somáticas ha impulsado el desarrollo de muchas herramientas para su identificación e interpretación. Su elección dependerá del tipo de información y la meta que se tenga por investigar (9). Usualmente previo al análisis de mutaciones somáticas, deben filtrarse las variantes de línea germinal, utilizando cuando sea posible una muestra de tejido normal como referencia (13,18). De esta manera se puede verificar la presencia de las mutaciones germinales en la muestra normal.

Una vez que se han identificado las variantes, se almacenan en un formato conocido como VCF (Variant Call Format) que contiene las posiciones de las variantes con respecto a la secuencia referencia. Las variantes en este formato se pueden agrupar en formatos MAF (Mutation Annotation Format). El último paso de la NGS es la anotación de variantes, en ella se realiza la interpretación y funcionalidad de las variantes encontradas. Se puede utilizar una base de datos de enfermedades (ClinVar, HGMD, COSMIC, OncoKB) que describen las mutaciones y su impacto en la salud humana (9) o un software que realiza el análisis y su interpretación (22). Por ejemplo, en la "Guía de aplicación clínica de la secuenciación masiva en neoplasias mielodisplásicas y leucemia mielomonocítica crónica" se describen las siguientes herramientas que realizan esta función: MiSeq Reporter, Variant Studio, DNAnexus, Sophia DDM, Ion

Reporter. Existen otros softwares para el análisis de variantes, sin embargo, su utilidad puede variar según el campo de estudio.

Aplicaciones de la NGS

La alta producción de lecturas generadas a partir de la NGS lo hace muy útil para secuenciar regiones de interés, genomas, secuencias de *novo*, transcriptomas de células, tejidos u organismos, perfiles epigenéticos y estructura de la cromatina. Gracias a la NGS se han logrado secuenciar diversos genomas humanos, dentro de los cuales se han descrito más de 900 000 variantes y ha sido un reto asociar cuales tienen relación con el origen de las enfermedades (15). Algunos de sus usos incluyen la caracterización de las mutaciones en cáncer, que permite un diagnóstico más preciso, una mejor clasificación de la enfermedad, del pronóstico y la identificación de blancos terapéuticos (12).

La secuenciación del genoma completo (WGS) cubre las regiones codificantes y no codificantes. A nivel clínico, este tipo de análisis se puede utilizar cuando no se conoce el panorama mutacional de una neoplasia. La WGS puede detectar cerca de 4 millones de variantes por individuo (22), sin que ello signifique que sean todas patogénicas. La desventaja principal de la WGS reside en su costo, abarca entre \$5 000 y \$10 000 por muestra. Además, el análisis bioinformático que requiere es complejo y el tiempo de respuesta suele ser prolongado (5).

Por otro lado, la secuenciación del exoma completo (WES) analiza las regiones codificantes del genoma que incluye aproximadamente 20 000 genes (1% del genoma humano), sin embargo, la mayoría de las variantes detectadas representan en su mayoría la diversidad entre la población humana (22). Aunque su costo es menor que la WGS, tiene algunas limitaciones como la dificultad para identificar alteraciones en el número de copias, no identifica translocaciones y no se evalúan regiones no codificantes. La WES se recomienda en casos donde el diseño de los paneles dirigidos no identifica algunas mutaciones (ver Tabla 1) (5,9).

La NGS dirigida es el tipo de secuenciación más común en el campo clínico. Permite la selección de genes o regiones de interés a un costo menor que los dos tipos de secuenciación descritos anteriormente. Su precio oscila entre \$200 a \$1 000 por muestra, su tiempo de respuesta abarca entre 3 a 20 días con mejor cobertura de profundidad y posee un límite de detección establecido por la VAF, la cual oscila entre 2-5%. Este tipo de secuenciación resulta especialmente útil cuando el espectro de mutaciones de una enfermedad se encuentra bien establecido (5,13).

Tabla 1. Comparación de metodologías de NGS.

Ensayo	Ventajas	Desventajas	Costo Por Muestra	Cobertura Promedio
Secuenciación de genoma completo	Enfoque no sesgado. Capacidad para detectar SNV, rearrreglos, variantes estructurales y CNV	Alto costo. Alta demanda para almacenamiento de datos. Baja cobertura en las lecturas.	\$5000- \$10000	20-40X
Secuenciación de exoma completo	Restringido a regiones codificantes	No se evalúan regiones no codificantes. No identifica translocaciones. Dificultad para reconocer CNV.	\$1000- \$3000	80-200X
NGS multigen dirigido	Alta sensibilidad y especificidad	Detección de translocaciones en rupturas de	\$200- \$1000	500- 1000X

en la	regiones
detección de	intrónicas.
variantes.	Dificultad en
Bajo costo.	reconocer CNV.
Interpretación	
clínica	
optimizada.	

SNV: Variantes de un solo nucleótido, CNV: Variantes en el número de copias

Tomado y adaptado de: Duncavage, E.J. (5)

CAPÍTULO II. AVANCES DE LAS TÉCNICAS BASADAS EN NGS EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE NEOPLASIAS MIELOIDES

Los métodos basados en NGS se caracterizan por ser sensibles, específicos y exactos, traducándose en beneficios para el manejo de las neoplasias mieloides, especialmente LMA. El perfil de mutaciones basado en NGS puede apoyar el diagnóstico de la enfermedad, esclarecer mejor el pronóstico, escoger una mejor terapia y permite realizar el seguimiento de la EMR (4).

Dado que la patogénesis de la LMA y otras neoplasias mieloides está conformada por múltiples mutaciones adquiridas en distintas vías biológicas, analizar múltiples genes a la vez ha adquirido relevancia clínica (4). El propósito de realizar una subclasificación de la enfermedad es establecer su causalidad hasta donde sea posible, definir su pronóstico y elegir el tratamiento más adecuado. Actualmente, la clasificación morfológica es limitada, por ello se complementa con el inmunofenotipo, citogenética y genética molecular para clasificar las neoplasias hematológicas mieloides (7).

Las guías más utilizadas para la clasificación de este tipo de enfermedades son las guías de la OMS y del Consenso Internacional de Clasificación (ICC) para neoplasias mieloides y leucemias agudas, ambas en su más reciente edición del año 2022. Se establecen características de las técnicas convencionales descritas anteriormente y las alteraciones genéticas toman un importante protagonismo. Se mantienen los genes de fusión como *RUNX1::RUNX1T1*,

PML::RARA, *BCL::ALB1*, entre otros (la lista completa puede consultarse directamente en la guía), que se detectan por cariotipo o FISH. Además, se incluyen rearrreglos como *KMT2A*, *MECOM* y *NUP98* y las mutaciones puntuales de *RUNX1*, *NPM1* y *CEBPA* para la LMA y en el caso de las neoplasias mielodisplásicas se incluyen: *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* y *ZRSR2* (4). Otros genes con frecuencia y significancia clínica que no se encuentran en las recomendaciones de la OMS y son importantes para el pronóstico y definición del tratamiento son *FLT3*, *DNMT3A*, *NRAS*, *IDH1/2* y *TET2* (10,23). Es clínicamente relevante identificar las alteraciones genéticas para definir el diagnóstico específico (según las recomendaciones internacionales que se utilicen), establecer el pronóstico y reconocer mutaciones que son blanco de tratamientos específicos (4).

Entre las guías más utilizadas para la definición del pronóstico de las neoplasias mieloides se encuentran las recomendaciones de la European Leukemia Net (ELN) y de la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN). En este trabajo se referirá a la guía de clasificación pronóstica de la ELN del año 2022.

Tabla 2. Estratificación de riesgo por las anomalías genéticas según la ELN 2022

Clasificación de riesgo	Anormalidades genéticas
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> , inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> , <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> , <i>CEBPA</i> (bZIP) mutado.
Intermedio	<i>NPM1</i> mutado con <i>FLT3-ITD</i> , <i>NPM1</i> tipo salvaje con <i>FLT3-ITD</i> (sin lesiones genéticas de riesgo adverso). t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> , otras anomalías citogenéticas y/o moleculares no clasificadas como favorables o adversas.

Adverso	<p>t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i>, t(v;11q23.3)/rearreglo <i>KMT2A</i>, t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i>, t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2</i>, <i>MECOM(EVI1)</i> t(3q26.2;v)/rearreglo <i>MECOM(EVI1)</i>, -5 o del(5q); -7; -17 o 17p anormal, Cariotipo complejo, cariotipo monosomal, <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i>, y/o <i>ZRSR2</i> mutado, <i>TP53</i> mutado</p>
---------	---

Tomado y traducido de: Döhner, H (24).

Neoplasias mieloides con predisposición germinal

Las mutaciones de origen germinal pueden ser heredadas con un patrón autosómico dominante, recesivo o ligado al X. Las mutaciones germinales *de novo* pueden originarse en el espermatozoide, óvulo o en el óvulo fecundado durante la embriogénesis. Las mutaciones de *novo* pueden pasar desapercibidas hasta que ocurre alguna manifestación clínica en el paciente (25). Durante el análisis de variantes, algunas de ellas pueden ser clasificadas erróneamente como mutaciones somáticas, siendo en realidad de origen germinal (26).

Muchos genes causantes de enfermedad no están bien definidos, sin embargo, algunos de ellos han sido incluidos como una nueva categoría en el 2016 en la guía de clasificación de tumores hematopoyéticos de la OMS como: *CEBPA*, *DDX41*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6* y *GATA2* (13,27). Recientemente, en el 2022, la clasificación de tumores hematopoyéticos y de tejidos linfoides de la OMS incluyó *TP53*, *CEBPA* y *DDX41* en ausencia de un desorden constitutivo (23).

La clasificación de la ICC 2022 incluye los genes de predisposición germinal *SAMD9*, *SAMD9L*, *IKZF1*, *PAX5*, *TP53*, *CEBPA*, *DDX41*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *GATA2* y *ETV6*. Desde hace más de una década se tiene bien descrita la predisposición causada por *RUNX1* y *CEBPA*, donde las mutaciones germinales en *RUNX1* están relacionadas con un desorden plaquetario familiar con predisposición a desarrollar neoplasias mieloides. Mientras que mutaciones en *CEBPA* está asociado a la predisposición y desarrollo de LMA (28).

ANKRD26 y *ETV6* también están asociados a un desorden plaquetario familiar con predisposición al desarrollo de neoplasias mieloides. Otros genes pueden componer un síndrome específico que afecta múltiples sistemas y ser susceptibles al desarrollo de cáncer, como el caso de los portadores de Síndrome de Down con mutaciones en *ETV6*. Existen otras mutaciones germinales menos frecuentes en *DNMT3A*, *ERCC6L2*, *MBD4* y *XPC* y casos más limitados en *CSF3R*, *MECOM*, *SRP72* y *TET2* (29).

Algunas de las mutaciones de línea germinal analizadas por Andrés-Zayas *et al* a través de paneles de NGS incluyen *ANKRD26*, *ASXL1*, *CBL*, *CEBPA*, *CSF3R*, *DDX41*, *ETV6*, *GATA2*, *IKZF1*, *JAK2*, *MPL*, *NF1*, *PTPN11*, *RUNX1* y *TP53*, siendo *CEBPA*, *TP53* y *GATA2* descritos como alelos de muy alto riesgo para la predisposición de neoplasias mieloides. El análisis de variantes debe realizarse considerando las recomendaciones internacionales de acuerdo con su patogenicidad. No existe un punto de corte en la VAF para considerar una mutación de origen germinal. Por esta razón, se utilizan recomendaciones para realizar la clasificación de variantes. Las variantes descritas como patogénicas o potencialmente patogénicas son aquellas con una VAF mayor a 40% en el caso de variantes de un solo nucleótido y mayor a 30% para pequeñas inserciones o deleciones (1). Otros autores clasifican una mutación germinal con una VAF 30-60%, se considera apropiado una VAF cercana al 50% (13,25).

El origen germinal debe confirmarse con una segunda muestra, de preferencia una biopsia de piel (considerado como el estándar de oro para la confirmación y aprobado por guías internacionales) (1,13,26). Sin embargo, se pueden utilizar otras muestras como hisopado bucal, saliva o células T, principalmente

cuando no hay tiempo para cultivar los fibroblastos de piel (1,30). Cuando existen varios parientes afectados por una neoplasia mieloide y la misma variante se encuentra en más de uno de ellos, no es obligatorio realizar la confirmación en tejido. Las muestras de sangre periférica no son apropiadas para el estudio de mutaciones germinales porque no permiten distinguir entre las alteraciones germinales y somáticas. La saliva suele tener contaminación por células tumorales por lo que tampoco es recomendada para estudios de línea germinal (26).

La etiología de las neoplasias mieloides de origen germinal es heterogénea y en algunas familias puede presentarse como un fenotipo homogéneo. Sin embargo, otras familias pueden tener un fenotipo mixto y sufrir de neoplasias en distintos tejidos u órganos (1). Otros individuos pueden cursar asintomáticos debido a la penetrancia y expresión de los genes. Algunos individuos pueden estar sanos o presentar síntomas hasta la adultez (25). Las alteraciones de línea germinal no son completas y su latencia puede ser variable, esto sugiere que la adquisición de mutaciones somáticas es necesaria para la iniciación de los SMD o LMA (30).

Las mutaciones somáticas con pérdida de función en *ASXL1* han sido previamente reportadas en los SMD/LMA asociados a mutaciones en *GATA2* (31). Churpek *et al* realizaron un estudio en familias con sospecha de SMD/LMA familiar, donde se encontró que las variantes de *GATA2* son halladas con más frecuencia en las neoplasias mieloides de origen germinal. Además, se concluyó que las personas menores de 50 años portadoras de *RUNX1* pueden presentar hematopoyesis clonal hasta en el 67% de los casos y estar asintomáticos, representando un riesgo acumulado de hasta 81% a los 50 años para desarrollar una neoplasia mieloide (30).

El reconocimiento de los SMD/LMA y otras neoplasias mieloides de origen familiar o germinal, es importante para determinar la presencia de estas variantes ante un posible donante de médula ósea relacionado (1). También brinda la oportunidad a los portadores de llevar un seguimiento y una detección temprana de la progresión de los desórdenes clonales. Ciertamente, las familias

deben recibir consejo genético para discutir los posibles riesgos reproductivos que pueden asociarse (25,30). Algunos expertos recomiendan que los portadores tengan un análisis de médula ósea cuando se detecta la mutación (estado basal) y cada 6 meses se efectúe un examen físico, un hemograma completo y repetir la evaluación de médula ósea cuando se identifique un cambio desde el estado basal (20).

Es importante determinar las mutaciones de origen germinal para el manejo apropiado del paciente, el tamizaje de donadores de médula ósea, la selección de terapia y el consejo genético para los parientes. En estos pacientes es relevante realizar una detallada historia familiar que incluya el árbol genealógico y se identifiquen otros familiares posiblemente afectados. Se recomienda estudiar a los pacientes jóvenes diagnosticados con una neoplasia hematológica y aquellos que son candidatos para recibir un trasplante de médula ósea (TMO) relacionado. Los TMO relacionados que porten una mutación germinal pueden predecir una recaída y un mal pronóstico para el receptor (29).

La mayoría de los paneles de NGS están diseñados para la detección de mutaciones somáticas y no es un análisis definitivo para el estudio de línea germinal. Más bien, apoyan la sospecha clínica para iniciar un estudio por mutaciones heredadas (26). Sin embargo, repetir el análisis por NGS luego del tratamiento puede ser una opción, donde la VAF disminuye en mutaciones somáticas, mientras que, si se trata de una mutación germinal, la VAF se mantiene sin cambios (25).

Neoplasias mieloproliferativas y Neoplasias mielodisplásicas/Neoplasias mieloproliferativas

Dentro de las neoplasias mieloproliferativas (NMP) se han distinguido dos grupos considerando la presencia o ausencia de la translocación *BCR::ALB1* (conocido también como cromosoma Filadelfia), siendo la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) la neoplasia comúnmente asociada a esta alteración genética. El segundo grupo abarca aquellas NMP negativas para *BCR::ALB1*: Policitemia Vera (PV),

Trombocitosis Esencial (TE), Mielofibrosis Primaria (MP), principalmente (32). En ellas se ha utilizado como principal criterio diagnóstico la detección de las mutaciones driver en *JAK2*, *MPL* y *CALR*, usualmente excluyente entre ellas. En *JAK2* las mutaciones más prevalentes son las sustituciones *V617F* y aquellas identificadas en el exón 12. Mientras que las mutaciones más frecuentes en *MPL* son *W515L* y *W515K* que conllevan a una ganancia de función para el gen. En *CALR* se observan dos principales mutaciones: *CALR del52* y *CALR ins5*.

En la Guía de Clasificación de la OMS 2022, estas neoplasias tienen hallazgos característicos en el hemograma y en la morfología de sangre periférica para cada entidad descrita como criterios mayores y menores (se pueden consultar directamente en la guía). Adicionalmente a las mutaciones descritas e incluidas en los criterios de clasificación de la OMS, los pacientes con NMP pueden adquirir otras mutaciones que modifican el curso y la evolución de la enfermedad (Tabla 3).

El hemograma, el mielograma, la citomorfología en médula ósea y las tinciones específicas como la tinción de Pearl para sideroblastos en anillo o la tinción de reticulina siguen siendo de uso rutinario para el diagnóstico de las principales NMP. Adicionalmente, dentro de las NMP negativas para *BCR::ALB1*, la MP es la menos frecuente pero la más agresiva dentro de estas neoplasias. Para esta enfermedad, se recomienda realizar el tamizaje de otras mutaciones de alto riesgo como *ASLX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2* y *U2AF1* debido al riesgo de transformación a SMD y a LMA (32).

En la MP, más del 80% de los pacientes tienen alguna de las variantes mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las mutaciones en *U2AF1* se asocian a mayor grado de anemia y a supervivencias más cortas, mientras que las mutaciones en los genes *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TP53* y *SRSF2* se hallan frecuentemente en las NMP con evolución a LMA. Por otro lado, *DNMT3A* y *TP53* se encuentran más comúnmente en LMA post PV o TE (32).

Tabla 3. Mutaciones somáticas más frecuentes en las NMP.

Tipo de mutación	PV	TE	MP
Señalización NMP o driver	<i>JAK2 V617F</i> (95%), <i>JAK2</i> exón 12 (3%), <i>MPL</i> (<1%), <i>CALR</i> (<1%)	<i>JAK2 V617F</i> (50-70%), <i>MPL</i> (3-15%), <i>CALR</i> (25%)	<i>JAK2 V617F</i> (40-50%), <i>MPL</i> (3-15%), <i>CALR</i> (25-30%)
Metilación del ADN	<i>TET2</i> (9-16%) <i>DNMT3A</i> (1-7%) <i>IDH 1/2</i> (2%)	<i>TET2</i> (4-5%) <i>DNMT3A</i> (5-10%) <i>IDH 1/2</i> (3-6%)	<i>TET2</i> (7-17%) <i>DNMT3A</i> (5-10%) <i>IDH 1/2</i> (3-6%)
Modificación de histonas	<i>ASXL1</i> (7%) <i>EZH2</i> (0-3%)	<i>ASXL1</i> (4%) <i>EZH2</i> (0-3%)	<i>ASXL1</i> (18-35%) <i>EZH2</i> (6-13%)
Empalme ANRm	<i>SF3B1</i> (1-5%) <i>SRSF2</i> (0-3%) <i>U2AF1</i> (1-2%) <i>ZRSR2</i> (0-2%)	<i>SF3B1</i> (1-5%) <i>SRSF2</i> (0-3%) <i>U2AF1</i> (1-2%) <i>ZRSR2</i> (0-2%)	<i>SF3B1</i> (5-7%) <i>SRSF2</i> (8-17%) <i>U2AF1</i> (5-15%) <i>ZRSR2</i> (0-2%)
Factor de transcripción	<i>TP53</i> (1-3%) <i>IKZF1</i> (<3%) <i>RUNX1</i> (<3%)	<i>TP53</i> (1-3%) <i>IKZF1</i> (<3%) <i>RUNX1</i> (<3%)	<i>TP53</i> (4%) <i>IKZF1</i> (<3%) <i>RUNX1</i> (<3%)
Otras vías de señalización	<i>LNK/SH2B3</i> (2-10%) <i>CBL</i> (0-2%) <i>NRAS, KRAS</i> (0-1%)	<i>LNK/SH2B3</i> (3-6%) <i>CBL</i> (0-2%) <i>NRAS, KRAS</i> (0-1%)	<i>LNK/SH2B3</i> (11%) <i>CBL</i> (0-6%) <i>NRAS, KRAS</i> (3-15%)

Tomado de: Combaluzier S. (16)

Actualmente, el diagnóstico de LMC se realiza con los datos del hemograma y la morfología de sangre periférica y la presencia del gen de fusión *BCR::ABL1* por FISH o por RT-PCR. El análisis en médula ósea sigue siendo necesario para establecer la fase de la enfermedad según la cuantificación de blastos. Otros

estudios sugieren que los genes de *RUNX1*, *ASXL1* y la delección de *IKZF1* pueden estar involucrados en la resistencia al tratamiento (32).

La inclusión de la NGS puede ser útil en aquellos pacientes que requieren un diagnóstico diferencial de las NMP u otra entidad, donde se incluyen las variantes atípicas de *BCR::ABL1* con regiones crípticas no detectadas por métodos convencionales o las NMP “triple negativas”, donde no se detecta ninguna de las tres mutaciones más frecuentemente halladas en NMP (*JAK2*, *MPL* o *CALR*). Además, otras variantes han sido incluidas en sistemas de puntaje para el pronóstico de la enfermedad, por lo que en el futuro puede ser útil para el manejo de los pacientes con resistencia o menor respuesta a los inhibidores de tirosin quinasa (TKI) (32).

SMD y LMA: Principales alteraciones genéticas de significado clínico

Las técnicas de NGS son útiles tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de las neoplasias hematológica. Debido a su alta sensibilidad se ha desarrollado y propuesto como técnica molecular para la EMR. La descripción de mutaciones *driver* primarias no sólo tienen importancia en el diagnóstico, sino también en el pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

Para el diagnóstico de LMA se recomienda realizar un perfil genético basal que permita establecer la clasificación de la enfermedad y sus posibles blancos terapéuticos. La recomendación de ELN en el 2022 es incluir los siguientes genes: *NPM1*, *FLT3*, *IDH1/2*, *CEBPA*, *DDX41*, *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* y *ZRSR2*. Otros genes que se incluyen en esta publicación y que se requieren analizar al momento del diagnóstico son: *ANKRD26*, *BCORL1*, *BRAF*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *GATA2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PHF6*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RAD21*, *SETBP1*, *TET2* y *WT1*. Adicionalmente, se recomienda el tamizaje de rearrreglos como *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A*, *BCR::ABL1*, y los genes de fusión adicionales que se tengan disponibles en el laboratorio (24). Otras variantes como *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *SETBP1* también se han reportado como

mutaciones relevantes para la subclasificación y tratamiento de las malignidades hematológicas (Tabla 4) (10,33).

Para la EMR de la LMA debe escogerse la metodología estandarizada con mejor sensibilidad en conjunto con el marcador que cumpla los criterios para seguimiento de la enfermedad. Actualmente se encuentran validados para este fin solamente la qPCR y la CFM (5).

Tabla 4. Genes frecuentemente mutados en los SMD y LMA ordenados alfabéticamente.

<i>ABCA12</i>	<i>FLT2</i>	<i>MLL5</i>	<i>SMC1A1</i>
<i>ASXL1</i>	<i>HNRNPK</i>	<i>NF1</i>	<i>SMC3</i>
<i>BCOR</i>	<i>IDH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>SRSF2</i>
<i>CBL</i>	<i>IDH2</i>	<i>NRAS</i>	<i>STAG2</i>
<i>CEBPA</i>	<i>JAK2</i>	<i>NSD1</i>	<i>TET1</i>
<i>CUX1</i>	<i>KIT</i>	<i>PHF6</i>	<i>TET2</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>	<i>TP53</i>
<i>EP300</i>	<i>MLL</i>	<i>RAD21</i>	<i>U2AF1</i>
<i>EZH2</i>	<i>MLL2</i>	<i>RUNX1</i>	<i>WT1</i>
<i>FAMSC</i>	<i>MLL3</i>	<i>SF3B1</i>	<i>ZRSR2</i>

NPM1

La *NPM1* es una chaperona que se ubica en el nucléolo de la célula pero constantemente se traslada al citoplasma en la ejecución de sus funciones. Cuando adquiere una mutación, su retorno no ocurre y se acumula en el citoplasma de la célula, lo cual puede ser evidenciado mediante tinciones en inmunohistoquímica. Este evento se considera que juega un papel importante en la patogénesis de la leucemia (35).

El gen de la *NPM1* es una de las mutaciones más frecuentes en LMA (hasta un tercio de los casos) y se asocia al 85% de las LMA con citogenética normal. Por el contrario, *NPM1* es infrecuente en SMD y SMD/NMP, se ha descrito en menos

del 5% de los casos (18,19), mientras que en LMA secundaria, la frecuencia oscila entre el 5-17%(37). Se caracteriza por ser una mutación heterocigota y se encuentra en el exón 12 en el 99 % de los casos. La alteración consiste en un cambio en el marco de lectura por la inserción de 4 pb en extremo C- terminal (6,38), lo que conlleva a la pérdida de W288 y W290, o solamente de W290. La pérdida del triptofano causa el desdoblamiento de la triple hélice del C-terminal y afecta la ubicación de la proteína desde el nucléolo hacia el citoplasma (39).

La mutación de *NPM1* puede coexistir con otras alteraciones genéticas que cambian el pronóstico de la enfermedad como: *FLT3*, *DNMT3A*, *TET2* e *IDH1/2*. *NPM1* representa un pronóstico favorable solamente en la ausencia de *FLT3-ITD* (5,21,37) o la presencia de *FLT3-ITD* con una frecuencia alélica menor a 0,5 en la clasificación del 2017 de ELN. Sin embargo, debido a la dificultad en estandarizar la VAF de *FLT3*, la actual clasificación de la ELN del 2022 elimina este aspecto y se considera la mutación de *NPM1* en conjunto con *FLT3-ITD* como un pronóstico de riesgo intermedio. Se ratifica a la alteración única de *NPM1* como riesgo favorable sólo en la ausencia de *FLT3-ITD* (35). La clasificación del riesgo variará según la alteración genética que acompañe a la mutación *NPM1*.

La detección de esta mutación permite establecer el curso pronóstico de la enfermedad y se ha propuesto para el seguimiento de la EMR por tratarse de una mutación estable que nace desde el estado preleucémico y se mantiene en la recaída. Se ha considerado como marcador de recaída y sobrevida, ya que todos los clones poseen la mutación y está ausente en sujetos normales (5,39). A pesar de esto, el monitoreo de la EMR a través de la *NPM1* tiene ciertas limitaciones, como por ejemplo, sus transcriptos pueden persistir en niveles bajos luego del tratamiento sin que ello sea predictivo para una recaída (35).

Dicho esto, la RT-PCR sigue siendo el método preferido para el monitoreo de la EMR en *NPM1* mutado. Una ventaja de la NGS sobre este método es que puede detectar otros tipos de alteraciones en *NPM1* que no se detectan por el diseño de los cebadores de la RT-PCR. Sin embargo, el método por NGS no ha sido estandarizado para el seguimiento de la EMR.

La clasificación del ICC 2022 considera la presencia de *NPM1* y al menos 10% de blastos suficiente para establecer el diagnóstico de LMA (29), mientras que en la clasificación de la OMS del 2022 sólo requiere la presencia de la mutación en *NPM1* (23). La LMA con *NPM1* mutado y en ausencia de la alteración en *FLT3-ITD* y de citogenética adversa, suelen tener un pronóstico favorable reflejado en las tasas de remisión completa (RC) de 84% vs. 48%, supervivencia libre de enfermedad a 3 años (DFS por sus siglas en inglés) de 23% vs. 10% y supervivencia general (OS) a 3 años de 35% vs. 8% en comparación con el *NPM1* salvaje (36). Se han estudiado terapias específicas para la LMA con *NPM1* mutado como el Venetoclax y Gemtuzumab ozogamicina, siendo ambos tratamientos efectivos contra la enfermedad (35).

FLT3

EL *FLT3* es un receptor transmembrana está expresado normalmente en las células progenitoras hematopoyéticas e interviene en las etapas tempranas del desarrollo de los linajes mieloide y linfoide. Cuando se une a su ligando, promueve la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación de las células a través de las vías de señalización PI3K, RAS y STAT5. Las mutaciones en *FLT3* ocurren en aproximadamente el 25-30% de las LMA, siendo las duplicaciones internas en tándem (ITD) la alteración más frecuente. Las mutaciones en el dominio de tirosin quinasa (TKD) presentan un 7-10% de los casos (40–43). Generalmente, las alteraciones en *FLT3* se consideran mutaciones tardías en los subclones de la leucemogénesis y frecuentemente son precedidas por alteraciones en *DNMT3A* y *NPM1*.

Las mutaciones en *FLT3* son eventos raros en los SMD, pero se han asociado a aproximadamente el 20% casos de SMD con transformación a LMA. La adquisición de *FLT3-ITD* o mutaciones en los genes de la vía RAS (*NRAS*, *KRAS*), están asociados a transformación leucémica con pronóstico muy desfavorable con una supervivencia media de 2,4 meses. La secuenciación con métodos de NGS puede resultar útil en la detección de pequeños subclones y la detección temprana de la progresión a LMA (44).

La utilidad pronóstica de *FLT3-ITD* es influenciada por la carga alélica, el sitio de inserción, la longitud de las ITD, las alteraciones en el cariotipo y la presencia de la mutación en *NPM1* y/o de otras mutaciones (40,41,43,45). La guía de la ELN del 2022 eliminó el establecimiento del ratio de los alelos mutante y salvaje para la estratificación del riesgo con *FLT3*, principalmente por la falta de estandarización en la metodología (40).

Las mutaciones en *FLT3* se asocian a mayor riesgo de recaída y menor OS en la LMA. La detección de *FLT3-ITD* durante la recaída tiene un peor pronóstico que cuando se detecta en el diagnóstico, estos pacientes tienen muy baja probabilidad de alcanzar una segunda remisión completa con terapia intensiva convencional. En la recaída o en la LMA refractaria, la presencia de *FLT3-ITD* está asociada con una remisión más corta, un riesgo incrementado de recaída y un OS disminuido (40).

En un cohorte realizado por Schmalbrock *et al*, se realizó WGS en muestras pareadas en el diagnóstico y en la recaída de pacientes con LMA y la mutación *FLT3-ITD* que fueron tratados con midostaurina. Se compararon contra el control que correspondió a los pacientes con LMA de *novo*. Se estableció que los pacientes que recayeron y fueron tratados con midostaurina se debió a 1) la mala adherencia al tratamiento o su farmacocinética, 2) cambio en la composición de los clones *FLT3-ITD* entre el diagnóstico y la recaída y 3) pérdida de los clones *FLT3-ITD*, apuntando a otros mecanismos de resistencia.

FLT3 mutado suele acompañarse por otras mutaciones, las más frecuentes son *DNMT3A*, *NPM1*, *RUNX1*, *WT1*, *IDH1/2* y *RAS* (41,43). *FLT3* ha sido blanco de tratamiento debido a su impacto en el pronóstico de la LMA. La estratificación de riesgo se realiza en el momento del diagnóstico basándose en la citogenética y las aberraciones moleculares. La guía recomienda que el análisis de *FLT3* se realice en el diagnóstico de LMA para identificar a todos los pacientes que puedan beneficiarse con la terapia específica para *FLT3* (40).

La terapia estándar para las LMA con *FLT3* mutados incluye los regímenes de quimioterapia intensiva en combinación con midostaurina para la inducción. La

consolidación con el trasplante alogénico de células hematopoyéticas se recomienda siempre que sea posible (43).

Actualmente, se realiza la determinación de *FLT3-ITD* por el método de PCR y el análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Debido a los múltiples pasos que requiere el método puede generar errores. Existen esfuerzos para automatizar la PCR de manera que la posibilidad de errores disminuya (42).

La detección de *FLT3-ITD* por NGS ha sido controversial, debido a que la inserción puede variar en el rango de 24-90 pb. Según la metodología que se elija en la NGS, la plataforma y el software para la determinación de variantes, puede detectar o no estas alteraciones. En el estudio realizado por Thomas *et al*, establecieron un límite de 33 pb, las inserciones mayores a este límite no fueron detectadas (la sensibilidad en la detección en este estudio fue de 48%, con una especificidad del 100%), por esta razón recomiendan que la determinación de *FLT3-ITD* se realice por las técnicas convencionales (33).

En el 25% de los casos de recaída en la LMA, el *FLT3* mutado puede comportarse de manera inestable. Los clones con *FLT3* mutado pueden perderse o ganarse en la recaída (5), por esta razón, su monitoreo para EMR ha sido cuestionado. A pesar de esto, el monitoreo de la EMR por *FLT3-ITD* sigue siendo el marcador de elección porque predice de mejor manera la recaída en los pacientes con LMA. Contrario al utilizar la mutación de *NPM1* como marcador únicamente (45).

Actualmente, el seguimiento de la EMR por *FLT3-ITD* se realiza por las técnicas de CFM, RT-PCR y NGS. Los pacientes con LMA que son tratados con inhibidores de *FLT3* pueden adquirir mutaciones nuevas en *FLT3-ITD* o en otros genes durante la recaída (45). El *FLT3* ha sido estudiado como blanco terapéutico de los conocidos inhibidores de la molécula, entre ellos la midostaurina y el gilteritinib (46).

CEBPA

La proteína CCAAT/enhancer binding protein α es un factor de transcripción mielóide codificada por el gen *CEBPA* en el brazo largo del cromosoma 19. Esta proteína juega un papel en la diferenciación y crecimiento de las células granulocíticas. Las mutaciones en *CEBPA* ocurren como mutaciones *driver* en el 4-11% de los paciente con LMA.

Existen dos principales mutaciones en este gen y puede ocurrir simultáneamente: en el dominio de activación transcripcional (TAD) del N-terminal suelen ser mutaciones sin sentido o cambio del marco de lectura y en la región del bZip (basic leucine zipper) en el C-terminal. Estas últimas son mutaciones sin sentido o inserciones/deleciones que alteran el funcionamiento de la proteína. Las mutaciones en bZip son las más frecuentes y asociadas a un riesgo favorable en LMA independientemente si son monoalélicas o bialélicas (13,47). Las mutaciones en *CEBPA* son más frecuentes en LMA secundarias a SMD que en el SMD, insinuando que estas mutaciones se adquieren durante la progresión hacia LMA (44).

En las guías pronósticas de la ELN y NCCN actuales, se clasifica la LMA con mutaciones bialélicas en *CEBPA* como una entidad aparte, definiendo un mejor pronóstico que aquellos pacientes con LMA con *CEBPA* de tipo salvaje o con una sola variante_ (21,33). Sin embargo, en dos cohortes realizados han identificado que las mutaciones monoalélicas en bZip juegan un papel pronóstico idéntico a las mutaciones bialélicas en la LMA (34,47). Los pacientes con *CEBPA* doble mutado (*CEBPA-dm*) y *CEBPA-bZip* experimentaron una supervivencia libre de eventos (EFS) de 64% para los dos grupos y una OS de 81% y 89%, respectivamente. También se determinó la ocurrencia simultánea de las mutaciones en *CSF3R* y *CEBPA*, tuvo un impacto adverso en la EFS de un 17% contra 63% del grupo con *CEBPA* mutado y un alto riesgo de recaída (RR) de 83% vs 22%, respectivamente. Por lo tanto, la presencia de *CSF3R* anula el pronóstico favorable de las mutaciones en *CEBPA* (47).

El gen de *CEBPA* tiene la particularidad que contiene regiones ricas en GC (75% en regiones codificantes), por lo que su amplificación podría resultar un reto por medio de técnicas de NGS. Se recomienda que los ensayos para *CEBPA* deben

complementarse con la secuenciación de Sanger (33). Otros investigadores han diseñado acoples de técnicas para la detección de *CEBPA*, la PCR de rango extendido es capaz de capturar la región exónica completa para luego ser incluida en la preparación de la biblioteca de NGS (específicamente en Nextera) de panel TruSight Myeloid (TSMP) de Illumina (33).

ASXL1, TET2 y DNMT3A

El gen de *ASXL1* codifica para un regulador epigenético y afecta a un 15-20% de los pacientes con SMD. Las mutaciones en *ASXL1* confieren un riesgo incrementado para la progresión a LMA, y ocurre frecuentemente con mutaciones en *ETV6*, *RUNX1* y *SRSF2* (44).

Por otro lado, las mutaciones en *TET2*, se identificaron en el 4-12% de los pacientes con SMD. Estas mutaciones no coexisten con mutaciones en *IDH1*, *IDH2* o *RUNX1*. Sin embargo, su presencia junto con las mutaciones en *SRSF2* o *ZRSR2* son predictivas para la transformación a LMA y características para LMMC. Las mutaciones en *TET2* se asocian mayormente a citogenética o cariotipo normal. La VAF es un factor independiente para la transformación leucémica, por lo que su cuantificación permite predecir el curso de la enfermedad (44).

El gen de *DNMT3A* está implicado en la metilación del ADN y promueve la diferenciación de las células madre hematopoyéticas. Las mutaciones en *DNMT3A* se asocian al SMD con displasia multilinaje y con el SMD con exceso de blastos. Los pacientes con SMD y *DNMT3A* mutado tienen mayor riesgo de progresión a LMA, con un HR (hazard ratio) de 6.78 (44)

En el caso de la LMA, las mutaciones en *DNMT3A* se encuentran en un tercio de los pacientes con LMA y citogenética normal. Estas mutaciones confieren un riesgo adverso y suelen encontrarse con mutaciones en *NPM1* y *FLT3*. La detección de estas mutaciones en la remisión completa no impactan el pronóstico de la LMA (48).

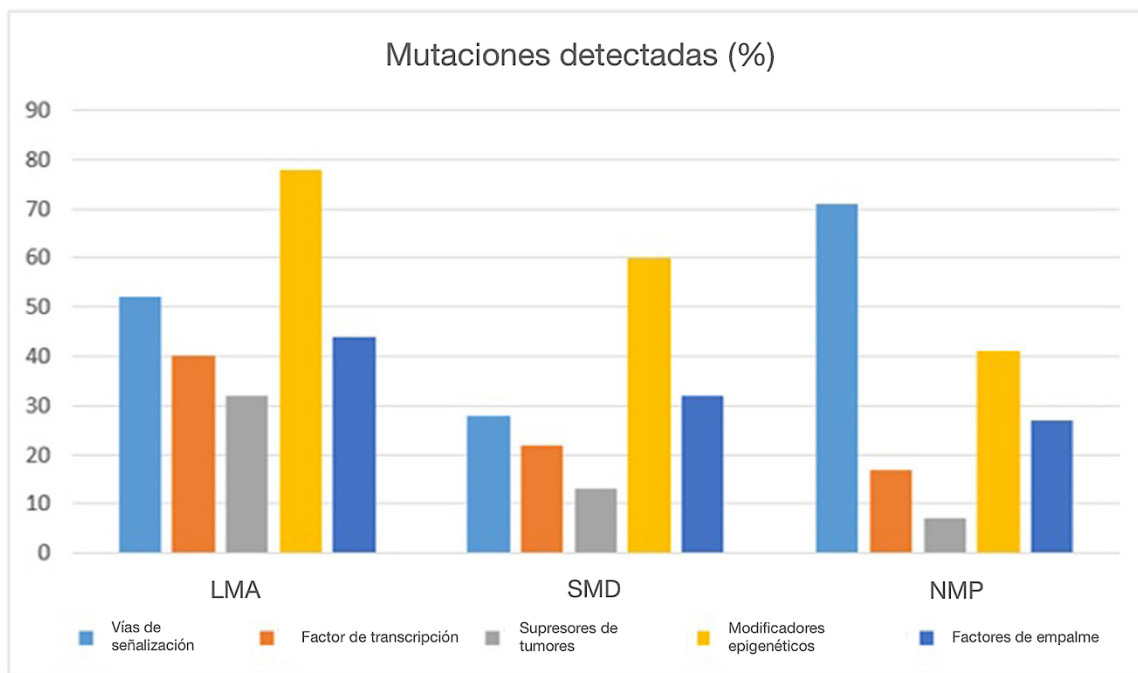


Figura 3. Diferencias en el panorama mutacional de las neoplasias mieloides. Tomado y adaptado de: Poza, M. (49)

Utilización de NGS para definir el pronóstico y el tratamiento

La identificación de las mutaciones recurrentes en las neoplasias mieloides se usa para determinar el pronóstico y la selección del tratamiento. Los genes comúnmente mutados en los SMD se traslapan con los genes mutados en la LMA (5).

Los paneles de NGS permite identificar la presencia de los genes abarcados dentro de las principales guías internacionales, por ejemplo, *NPM1* y *CEBPA* ya descritas anteriormente de pronóstico favorable y *RUNX1* con un pronóstico desfavorable. Sin embargo, alteraciones en otros genes tienen relevancia en el establecimiento del pronóstico. De hecho, un solo paciente podría tener hasta 3 ó 4 mutaciones *driver* patogénicas como *FLT3*, *ASXL1*, *TP53*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *KMT2A*, *KIT*, entre otros. Las posibles combinaciones entre ellos pueden variar el curso de la enfermedad, por ejemplo, cuando *NPM1* se encuentra simultáneamente con *FLT3-ITD*, la enfermedad gira hacia un pronóstico desfavorable (4). Algunos estudios consideran que la carga alélica

del gen mutado puede definir un pronóstico distinto variable. La presencia de *NPM1* con *DNMT3A* y la translocación de *MLL*, predicen una respuesta mejorada en la quimioterapia con altas dosis de daunorubicina (20).

En un estudio realizado por Prieto-Conde *et al* en el 2019, determinó que las LMA clasificadas como bajo riesgo podrían tener un pronóstico adverso. Para comprobar esta teoría, se realizó la caracterización genética de 166 casos de LMA por medio de la NGS, clasificados como bajo riesgo según la ELN 2017. El estudio reveló que un mayor número de mutaciones se asocia con un peor pronóstico. Los pacientes con 3 ó más mutaciones mostraron RFS y OS menores que en los paciente con 3 mutaciones o menos, sugiriendo que el mayor número de mutaciones correlaciona con una mayor inestabilidad genética (46).

Otro subgrupo de la LMA, son aquellas LMA secundarias a un SMD. Los SMD se caracterizan por su alto riesgo de progresión a LMA, afectando a un 30-40% de los pacientes con SMD (4,44). El modelo de dos *hits* o eventos se propuso para la progresión de SMD a LMA, donde en el primero ocurren mutaciones en genes que regulan la diferenciación celular como *TET2* o *RUNX1*. En el segundo se afectan genes involucrados en la proliferación y supervivencia celular como *FLT3*, *NPM1* e *IDH1/2* (44).

En ocasiones no se logra evidenciar si una LMA resulta de un SMD. Las técnicas de NGS en estos escenarios podrían tener una mayor relevancia que otras técnicas moleculares. Estudios han demostrado que la detección de mutaciones comúnmente asociadas con el SMD puede utilizarse como una evidencia indirecta de que existió un SMD previo. Este análisis brinda información importante para la estratificación de riesgo de la enfermedad (4). Una ventaja de la NGS es que no solo permite realizar el perfil genético de la enfermedad, sino que abre posibilidades para los pacientes para participar en ensayos clínicos donde el fármaco esté dirigido específicamente contra una mutación.

Medición de la EMR

A pesar de la falta de estandarización de la medición de la EMR por métodos de NGS, algunos investigadores han desarrollado protocolos sensibles y específicos por medio del acople de técnicas de PCR a la NGS. Levis *et al* desarrollaron un ensayo usando la NGS para la detección de las mutaciones en *FLT3-ITD* en la EMR, el cual fue validado para utilizarse en la medición de la EMR de pacientes con LMA en recaída o refractaria que participaron en un ensayo clínico del inhibidor de *FLT3*, gilteritinib. En el ensayo se acopló una primera etapa de PCR a la NGS, brindando mayor sensibilidad y especificidad al método, garantizando una sensibilidad de 10^{-4} . Para la validación del ensayo se utilizó un inóculo inicial de 700 ng de ADN, mejorando sustancialmente la sensibilidad de los métodos de PCR separado por electroforesis capilar (10^{-2}) y la CFM (10^{-3}) (50).

La EMR para la detección de las mutaciones en *BCR::ABL1* ha sido estandarizada para el seguimiento de las neoplasias con mutaciones en dicho gen. Por el contrario, la medición de la EMR para mutaciones en *FLT3-ITD* ha sido difícil de estandarizar, debido a que las inserciones in tandem del *FLT3* varían en tamaño. Cuando se realiza su detección por PCR, la reacción puede ser sesgada ya que la secuencia más corta será mayormente amplificada, dando ventaja al alelo de tipo salvaje (50). La ELN recomienda la utilización de métodos basados en NGS que utilicen sistemas de corrección de errores con una sensibilidad mínima de $\sim 0.1\%$ VAF (13).

CAPÍTULO III. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN NGS CON OTRAS TÉCNICAS MOLECULARES DE USO CLÍNICO EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE NEOPLASIAS MIELOIDES Y LOS RETOS DE LA NGS EN LA ACTUALIDAD

Actualmente, el estudio de las neoplasias hematológicas mieloides requiere de técnicas moleculares como el análisis del cariotipo, FISH, RT-PCR y secuenciación para la caracterización genética de la enfermedad (51). Existen nuevas tecnologías emergentes para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad como la PCR digital (dPCR) y la NGS.

El bandeo de cromosomas a través del análisis del cariotipo continúa siendo utilizado ampliamente como método de detección de las anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas. Entre sus limitaciones se encuentran: el requerimiento de células cultivables, su baja resolución (5-10 Mb), su baja sensibilidad (10^{-1}) y el tiempo para obtener resultados suele ser entre 2 y 21 días (13).

La técnica por FISH se utiliza como complemento al cariotipo, aumentando la sensibilidad a 10^{-2} . Se utilizan metafases o interfases de células en división y se dirigen sondas específicas para determinadas regiones para la detección de alteraciones genéticas. En comparación con el cariotipo, su tiempo de respuesta es entre 1-3 días y puede detectar anomalías crípticas (13).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se inició en 1983, es una técnica basada en la replicación del ADN y genera billones de copias de ADN. La PCR convencional un método cualitativo de punto final donde se mide la presencia o ausencia de un amplicón. Posteriormente, surgió la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) que permitió cuantificar el producto amplificado, mediante el uso de una curva de estándares diluidos con concentraciones conocidas de ADN copia y la introducción de sondas fluorescentes (7,52).

El ensayo de qPCR es el método de detección de elección para variantes de un solo nucleótido y pequeñas inserciones. Sin embargo, tiene la desventaja que

están limitados al diseño de los cebadores. Además, no resulta útil durante la evolución clonal de las neoplasias hematológicas, donde se pierden o ganan mutaciones en el clon fundador. Particularmente, las mutaciones de *FLT-ITD* se han reportado como pérdidas o ganancias en el 6% de los pacientes con recaída en LMA (5). La qPCR es el método más antiguo y establecido para el monitoreo de la EMR en neoplasias hematológicas. Se utiliza para la detección de translocaciones como *PML::RARA*, *BCR::ABL1*, *RUNX1::RUNX1T1* y de inserciones/deleciones como en el exón 11 del gen de la *NPM1*(13).

La dPCR es la tercera generación de la PCR, tuvo sus inicios en los años 1990s, pero su uso en la investigación del cáncer es reciente. La dPCR consiste en dividir la muestra entre varias sub-reacciones de PCR, cada una en gotas de emulsión. Se realiza su lectura y se traduce a un resultado positivo o negativo. Mejora sustancialmente la sensibilidad hasta 10^{-4} , en comparación a las primeras metodologías de PCR. También se puede calcular la concentración de la secuencia utilizando la fluorescencia y métodos estadísticos. Para este método es necesario establecer el Límite del blanco (LoB), el Límite de detección (LoD) y el Límite de cuantificación (LoQ) (53). El LoD oscila entre 0.1-0.001% según la cantidad del inóculo de ADN utilizado. La dPCR es utilizada para la detección de mutaciones somáticas como *JAK2*, *CALR*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *IDH1/2*, *KIT* y *PML*. También es útil para el monitoreo de la EMR, por ejemplo, *BCR::ABL p190* y *p210* (7,13,53).

La diferencia entre la qPCR y la dPCR, radica en que la medida en la qPCR se realiza durante la fase exponencial de la amplificación, mientras que en la dPCR genera una señal digital lineal con un límite de detección menor y sin el requerimiento de una curva de calibración con estándares (52).

La secuenciación de Sanger es capaz de detectar pequeñas variaciones de ADN en fragmentos amplificados por PCR. Las bases de ADN son detectadas a través de la electroforesis por la adición de dNTPs marcados con fluorescencia durante la replicación del ADN. Esta técnica se restringe a la detección de genes en un solo exón, por lo que suele generar resultados más rápido en comparación con la secuenciación por NGS (13).

La NGS y la dPCR frecuentemente se utilizan juntas, aumentando la sensibilidad y la especificidad del método. La NGS es utilizada como una etapa de descubrimiento para las alteraciones genéticas y la dPCR como técnica de validación y monitoreo. La NGS es capaz de detectar múltiples alteraciones genéticas o mutaciones desconocidas. La dPCR involucra tiempos de respuesta menores, es más fácil de realizar, menos costosa y requiere menos cantidad de muestra que la NGS (53).

Los ensayos de NGS además de detectar varias o muchas mutaciones en el mismo análisis, no requieren del diseño específico de cebadores, lo cual es una de las ventajas principales que tiene sobre las técnicas de PCR (5,54). Esta técnica hace un uso más eficiente de las células y tejidos, tiene mayor sensibilidad a las mutaciones clínicamente relevantes (comparado a la mayoría de los métodos moleculares), el flujo de trabajo técnico es más uniforme y considerando la cantidad de genes, analizarlos individualmente resultaría más costoso que analizarlos por medio de paneles multigen de NGS (4). En ciertos casos, la NGS puede ser útil en pacientes donde no se hayan podido obtener metafases en el cultivo celular para la realización del FISH. La NGS permite evaluar la evolución clonal por medio de la VAF y comparar el estado mutacional de la enfermedad en el momento del diagnóstico y en la recaída, evaluando las mutaciones que se pierden o ganan mutaciones en la recaída (54).

Sin embargo, una de las mayores desventajas de la NGS es la complejidad que requiere la técnica, la habilidad especializada en bioinformática que demanda y su alto costo de equipamiento. Por ende, el tiempo de respuesta puede ser hasta de 3 semanas. Esto último puede traducirse en atrasos en la toma de decisiones clínicas, especialmente para la escogencia del tratamiento. Otra de sus desventajas, es su limitada confiabilidad en la identificación de mutaciones con VAF menores a 2%, ya que su distinción con artefactos de secuenciación resulta realmente difícil. Esto impacta sobretodo en la evaluación de la EMR (5,7,9,16).

En términos de NGS, el LoD se puede definir como la menor VAF de una variante en la cuál el 95% de las muestras analizadas son confiables. Lo anterior es influenciado por diversos factores como la cantidad de ADN utilizada, la

tecnología utilizada para la preparación de la biblioteca de ADN, la plataforma elegida para la secuenciación, la profundidad de secuenciación alcanzada, el tipo de variante analizada y el programa seleccionado para el análisis de datos. Por esta razón, el LoD en la NGS puede variar entre 2-15% (7).

La detección de mutaciones en las muestras que requieren de una sensibilidad aumentada para el monitoreo de la EMR, está dominada por técnicas altamente sensibles no NGS, como RT-PCR de alelo específico (ASPCR), PCR droplet digital (ddPCR) y BEAMing (beads-emulsification- amplification-magnetics) descritas en la sección de Anexos (7). Además, la NGS puede mostrar dificultad para identificar regiones cortas repetitivas en tándem (STR por sus siglas en inglés), especialmente por encima de 30 repeticiones. Los métodos tradicionales de PCR se prefieren para el estudio de este tipo de variantes (55).

El diseño de los cebadores para PCR generalmente se dirige a las regiones calientes o “hot spot” de los genes. Los genes como *TET2* o *ASXL1* carecen de estas regiones y requieren de la secuenciación del gen completo para identificar las mutaciones (5).

Adicional al análisis citomorfológico, la CFM y la citogenética, los análisis basados en NGS permiten obtener información valiosa para el diagnóstico. Actualmente existen paneles de NGS comerciales que permite la detección de mutaciones causantes de neoplasias mieloides, en una publicación realizada se describen diferentes paneles de NGS que incluyen desde 9 hasta 404 genes. La mayoría de los paneles incluyen genes de señalización como *KIT*, *NRAS*, *FLT3*, *KRAS*, *PTPN11* y *CBL*. Pueden incluirse otros genes como *JAK3*, *CALR*, *CSFR*, *ABL1*, *BRAF*, *HRAS*, *CBLB*, *GNAS* (6,21).

Los reguladores de la metilación del ADN (*IDH1*, *IDH2*, *TET2* y *DNMT3A*) también forman parte de un grupo de genes incluidos en los paneles de NGS. Además, se consideran los reguladores epigenéticos como *ASXL1* y *EZH2*, genes supresores de tumores como el *TP53*, factores de transcripción mieloides como el *CEBPA*. Los factores de transcripción como *GATA1*, *GATA2*, *ETV6* e *IKZF1* no son comúnmente incluidos porque su significancia en el pronóstico es

desconocida. Los factores de empalme del ARN más frecuentemente incluidos en los paneles son *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2* que representan el 10-15% de las mutaciones en LMA. Las mutaciones en genes del complejo de cohesina se observan en el 10% de los casos de LMA, son menos populares en los paneles, pero cada vez se han ido incluyendo más (se toman en cuenta las mutaciones en *STAG2*, *SMC1A*, *SMC3* y *RAD21*) (6,21).

El panel TSMP de Illumina para NGS, incluye 52 genes causantes de neoplasias mieloides (LMA, SMD y NMP). En este panel se incluyen variantes que proveen información útil sobre el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Este panel incluye las regiones exónicas completas de 15 genes y las regiones calientes o 'hot spot' de 39 genes (33).

Algunos de los genes que se utilizan para el seguimiento de la LMA por RT-PCR son: *NPM1*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL1* y *WT1*. En comparación con la CFM y la RT-PCR, la NGS es una técnica que puede resultar más costosa, técnicamente complicada y menos sensible que la RT-PCR en los genes validados para EMR (24).

Prieto-Conde *et al* diseñaron un estudio molecular basado en la NGS que pretendía identificar translocaciones, inversiones y mutaciones somáticas mediante una sola técnica. Los pacientes que participaron tenían diagnósticos de LMA y Leucemia mieloide crónica (LMC) ya caracterizadas genéticamente por las técnicas convencionales anteriormente. Mediante NGS fue posible identificar las mutaciones incluidas en las actuales guías de la de ELN: *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *FLT3*, *TP53*, *ASXL1* y otros genes con valor pronóstico como *DNMT3A*, *SRSF2* e *IDH2* (6).

Otro estudio comparó la concordancia entre dos paneles para el estudio de malignidades hematológicas mediante NGS. El HMP (Hematologic Malignancies Panel) se encontraba previamente validado en ese centro de investigación y se utilizó como punto de comparación para la validación del panel TSMP. Se obtuvo una concordancia del 99.4% en las SNV entre las diferentes metodologías, sin

embargo, por NGS hubo inconsistencias en determinar inserciones superiores a 33 pb como las presentes en las alteraciones en *FLT3-ITD*. Se utilizaron otras técnicas convencionales para la verificación de variantes como la secuenciación de Sanger y PCR. Por esta razón, los investigadores recomiendan realizar en paralelo las técnicas convencionales y la NGS para evitar un falso negativo que podría resultar en la no escogencia de una terapia contra un blanco dirigido. A pesar de ellos, la NGS sigue siendo una herramienta útil y confiable en la caracterización de las neoplasias mieloides. Se pueden utilizar muestras de referencia ya conocidas como las muestras HapMap, las cuales han sido mundialmente utilizadas como material de referencia para evaluar ensayos (33).

Yang *et al* determinaron que la mejor opción cuando se van a analizar 5 genes o más, es optar por la realización de NGS que determinar genes individuales por secuenciación de Sanger. Esto resultaría más costoso y laborioso cuando se considera la carga de trabajo acumulada de todos los procesos. Los métodos de NGS para genoma o exoma completo, resulta altamente laborioso, muy costoso, demanda mucho tiempo, son difíciles de interpretar y requiere de personal altamente calificado para su análisis. En el escenario clínico rutinario resulta de poca utilidad clínica analizar una alta cantidad de genes, pero tanto la WGS como la WES, tienen gran utilidad en el campo de investigación (21).

Existen regiones moleculares que son difíciles de secuenciar por NGS, las cuales se han mencionado previamente, y requieren de otras técnicas diferentes a la NGS o de herramientas bioinformáticas avanzadas para su reconocimiento y análisis. (33). Por ejemplo, las mutaciones en regiones no codificantes pueden no detectarse por NGS de WES, ya que no se contempla estas regiones. Las deleciones o inserciones de gran tamaño pueden pasar desapercibidas en el análisis de NGS (25) o requieren de técnicas moleculares alternativas para su detección.

Otros expertos han realizado comparaciones entre diferentes programas de detección de variantes (Variant callers) y se recomiendan aquellas con mejores desempeños en los casos de rearrreglos de mayor tamaño. Los errores sistémicos y de secuenciación son comunes en los sistemas de NGS (7,16). Sin

embargo, se han hecho esfuerzos por crear sistemas para la corrección de estos errores (7). Como se mencionó anteriormente, las técnicas basadas en NGS no son confiables para la identificación de genes homólogos, regiones ricas en GC o repetitivas (16).

CONCLUSIONES

1. NGS es una técnica compleja que requiere de herramientas bioinformáticas avanzadas y de su validación para su implementación en el laboratorio clínico.
2. NGS permite tener un estado basal del perfil genético de la enfermedad, ya que los sistemas pronósticos cada vez incluyen más alteraciones genéticas para la clasificación del riesgo y el surgimiento de nuevos blancos terapéuticos.
3. La heterogeneidad genética de las neoplasias mieloides requiere de técnicas moleculares con mayor capacidad de detección de genes. Sin embargo, la NGS no resulta útil para todas las aplicaciones clínicas especialmente para el monitoreo de EMR, la detección de variantes estructurales y CNV.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrés-Zayas C, Suárez-González J, Rodríguez-Macías G, Dorado N, Osorio S, Font P, et al. Clinical utility of targeted next-generation sequencing for the diagnosis of myeloid neoplasms with germline predisposition. *Molecular Oncology*. septiembre de 2021;15(9):2273-84.
2. Chen X, Zhu H, Qiao C, Zhao S, Liu L, Wang Y, et al. Next-generation sequencing reveals gene mutations landscape and clonal evolution in patients with acute myeloid leukemia. *Hematology*. 1 de enero de 2021;26(1):111-22.
3. Northrup V, Maybank A, Carson N, Rahmeh T. The Value of Next-Generation Sequencing in the Screening and Evaluation of Hematologic Neoplasms in Clinical Practice. *American Journal of Clinical Pathology*. 15 de abril de 2020;153(5):639-45.
4. Yang F, Anekpuritanang T, Press RD. Clinical Utility of Next-Generation Sequencing in Acute Myeloid Leukemia. *Mol Diagn Ther*. febrero de 2020;24(1):1-13.
5. Duncavage EJ, Tandon B. The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematology*. mayo de 2015;37(S1):115-21.
6. Kuo FC, Dong F. Next-Generation Sequencing-Based Panel Testing for Myeloid Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. junio de 2015;10(2):104-11.
7. Singh RR. Next-Generation Sequencing in High-Sensitive Detection of Mutations in Tumors. *The Journal of Molecular Diagnostics*. agosto de 2020;22(8):994-1007.
8. Hughes CFM, Gallipoli P, Agarwal R. Design, implementation and clinical utility of next generation sequencing in myeloid malignancies: acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Pathology*. abril de 2021;53(3):328-38.
9. Larson NB, Oberg AL, Adjei AA, Wang L. A Clinician's Guide to Bioinformatics for Next-Generation Sequencing. *Journal of Thoracic Oncology*. febrero de 2023;18(2):143-57.
10. Bartels S, Schipper E, Hasemeier B, Kreipe H, Lehmann U. Routine clinical mutation profiling using next generation sequencing and a customized gene panel improves diagnostic precision in myeloid neoplasms. *Oncotarget*. 24

de mayo de 2016;7(21):30084-93.

11. Zheng J, Zhang H, Banerjee S, Li Y, Zhou J, Yang Q, et al. A comprehensive assessment of Next-Generation Sequencing variants validation using a secondary technology. *Molec Gen & Gen Med*. julio de 2019;7(7):e00748.
12. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. diciembre de 2013;98(6):236-8.
13. Duncavage EJ, Bagg A, Hasserjian RP, DiNardo CD, Godley LA, Iacobucci I, et al. Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 24 de noviembre de 2022;140(21):2228-47.
14. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Human Immunology*. noviembre de 2021;82(11):812-9.
15. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet*. enero de 2010;11(1):31-46.
16. Selvakumar SC, Preethi KA, Ross K, Tusubira D, Khan MWA, Mani P, et al. CRISPR/Cas9 and next generation sequencing in the personalized treatment of Cancer. *Mol Cancer*. diciembre de 2022;21(1):83.
17. Yoshinaga Y, Daum C, He G, O'Malley R. Genome Sequencing. En: De Vries RP, Tsang A, Grigoriev IV, editores. *Fungal Genomics [Internet]*. New York, NY: Springer New York; 2018 [citado 6 de febrero de 2024]. p. 37-52. (Methods in Molecular Biology; vol. 1775). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7804-5_4
18. Bartha, Gyórfy. Comprehensive Outline of Whole Exome Sequencing Data Analysis Tools Available in Clinical Oncology. *Cancers*. 4 de noviembre de 2019;11(11):1725.
19. Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*. septiembre de 2014;30(9):418-26.
20. Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*. febrero de 2014;56(2):61-77.
21. Au CH, Wa A, Ho DN, Chan TL, Ma ESK. Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms. *Diagn Pathol*. diciembre de 2016;11(1):11.

22. Tuteja S, Kadri S, Yap KL. A performance evaluation study: Variant annotation tools - the enigma of clinical next generation sequencing (NGS) based genetic testing. *Journal of Pathology Informatics*. 2022;13:100130.
23. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. julio de 2022;36(7):1703-19.
24. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 22 de septiembre de 2022;140(12):1345-77.
25. Obiorah IE, Upadhyaya KD, Calvo KR. Germline Predisposition to Myeloid Neoplasms. *Clinics in Laboratory Medicine*. diciembre de 2023;43(4):615-38.
26. DiNardo CD, Bannan SA, Routbort M, Franklin A, Mork M, Armanios M, et al. Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC). *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. julio de 2016;16(7):417-428.e2.
27. 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*. 19 de mayo de 2016;127(20):2391-405.
28. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review. *Br J Haematol*. enero de 2008;140(2):123-32.
29. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 15 de septiembre de 2022;140(11):1200-28.
30. Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi KL, Shao J, Koboldt D, Miller CA, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood*. 26 de noviembre de 2015;126(22):2484-90.
31. West RR, Hsu AP, Holland SM, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica*. 1 de

febrero de 2014;99(2):276-81.

32. Combaluzier S, Quessada J, Abbou N, Arcani R, Tichadou A, Gabert J, et al. Cytological Diagnosis of Classic Myeloproliferative Neoplasms at the Age of Molecular Biology. *Cells*. 20 de marzo de 2023;12(6):946.

33. Thomas M, Sukhai MA, Zhang T, Dolatshahi R, Harbi D, Garg S, et al. Integration of Technical, Bioinformatic, and Variant Assessment Approaches in the Validation of a Targeted Next-Generation Sequencing Panel for Myeloid Malignancies. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 1 de junio de 2017;141(6):759-75.

34. Demir D. Insights into the New Molecular Updates in Acute Myeloid Leukemia Pathogenesis. *Genes*. 10 de julio de 2023;14(7):1424.

35. Falini B. *NPM1* -mutated acute myeloid leukemia: New pathogenetic and therapeutic insights and open questions. *American J Hematol*. septiembre de 2023;98(9):1452-64.

36. Tran TB, Siddon AJ. Molecular findings in myeloid neoplasms. *Int J Lab Hematology*. agosto de 2023;45(4):442-8.

37. Patel SS, Ho C, Ptashkin RN, Sadigh S, Bagg A, Geyer JT, et al. Clinicopathologic and genetic characterization of nonacute *NPM1*-mutated myeloid neoplasms. *Blood Advances*. 14 de mayo de 2019;3(9):1540-5.

38. Hollink IHIM, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters TCJM, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of *NPM1* gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia*. febrero de 2009;23(2):262-70.

39. Falini B, Brunetti L, Sportoletti P, Martelli MP. *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside. *Blood*. 8 de octubre de 2020;136(15):1707-21.

40. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting *FLT3* mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. febrero de 2019;33(2):299-312.

41. Schmalbrock LK, Dolnik A, Cocciardi S, Sträng E, Theis F, Jahn N, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia with *FLT3* -ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood*. 3 de junio de 2021;137(22):3093-104.

42. Sirajuddin P, Gregory A, Kushal S, Day GJ. Streamlining the Detection of *FLT3* Internal Tandem Duplication (*FLT3*-ITD) Using the Cepheid Genexpert®

Automated System. *Blood*. 2 de noviembre de 2023;142(Supplement 1):6036-6036.

43. Aldoss I, Zhang J, Mei M, Al Malki MM, Arslan S, Ngo D, et al. Venetoclax and hypomethylating agents in *FLT3* -mutated acute myeloid leukemia. *American J Hematol*. octubre de 2020;95(10):1193-9.

44. Bănescu C, Tripon F, Muntean C. The Genetic Landscape of Myelodysplastic Neoplasm Progression to Acute Myeloid Leukemia. *IJMS*. 17 de marzo de 2023;24(6):5734.

45. Grob T, Sanders MA, Vonk CM, Kavelaars FG, Rijken M, Hanekamp DW, et al. Prognostic Value of *FLT3* -Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *JCO*. 1 de febrero de 2023;41(4):756-65.

46. Kayser S, Levis MJ. Updates on targeted therapies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. enero de 2022;196(2):316-28.

47. Tarlock K, Lambie AJ, Wang YC, Gerbing RB, Ries RE, Loken MR, et al. *CEBPA* -bZip mutations are associated with favorable prognosis in de novo AML: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 30 de septiembre de 2021;138(13):1137-47.

48. Cai SF, Levine RL. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. *Seminars in Hematology*. abril de 2019;56(2):84-9.

49. Poza M, Colmenares R, González A, Alvarez N, Carreño Gomez-Tarragona G, Onecha E, et al. Differences in the Mutational Landscape of Myeloid Malignancies (acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and myeloproliferative neoplasm) and Their Clinical Impact. *Blood*. 5 de noviembre de 2020;136(Supplement 1):41-2.

50. Levis MJ, Perl AE, Altman JK, Gocke CD, Bahceci E, Hill J, et al. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with *FLT3*-ITD mutations. *Blood Advances*. 24 de abril de 2018;2(8):825-31.

51. Prieto-Conde MI, Corchete LA, García-Álvarez M, Jiménez C, Medina A, Balanzategui A, et al. A New Next-Generation Sequencing Strategy for the Simultaneous Analysis of Mutations and Chromosomal Rearrangements at DNA Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. *The Journal of Molecular Diagnostics*. enero de 2020;22(1):60-71.

52. Kockerols CCB, Valk PJM, Levin M, Pallisgaard N, Cornelissen JJ,

Westerweel PE. Digital PCR for *BCR-ABL1* Quantification in CML: Current Applications in Clinical Practice. *HemaSphere*. diciembre de 2020;4(6):e496.

53. Coccaro N, Tota G, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Digital PCR: A Reliable Tool for Analyzing and Monitoring Hematologic Malignancies. *IJMS*. 29 de abril de 2020;21(9):3141.

54. Carbonell D, Suárez-González J, Chicano M, Andrés-Zayas C, Triviño JC, Rodríguez-Macías G, et al. Next-Generation Sequencing Improves Diagnosis, Prognosis and Clinical Management of Myeloid Neoplasms. *Cancers*. 13 de septiembre de 2019;11(9):1364.

55. Rocca MS, Ferrarini M, Msaki A, Vinanzi C, Ghezzi M, De Rocco Ponce M, et al. Comparison of NGS panel and Sanger sequencing for genotyping CAG repeats in the *AR* gene. *Molec Gen & Gen Med*. junio de 2020;8(6):e1207.

ANEXOS

Tabla 5. Anormalidades genéticas incluidas en la clasificación de LMA y otras neoplasias hematológicas. (24)

AML and related neoplasms	
<p>AML with recurrent genetic abnormalities (requiring ≥10% blasts in BM or PB)*</p> <ul style="list-style-type: none"> • APL with t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA† • AML with t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 • AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 • AML with t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A‡ • AML with t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214 • AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1)§ • AML with other rare recurring translocations • AML with mutated NPM1 • AML with in-frame bZIP mutated CEBPA¶ • AML with t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1* 	<p>Myeloid sarcoma</p> <p>Acute leukemia of ambiguous lineage</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acute undifferentiated leukemia • MPAL with t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 • MPAL with t(v;11q23.3)/KMT2A-rearranged • MPAL, B/myeloid, not otherwise specified • MPAL, T/myeloid, not otherwise specified
<p>Categories designated AML (if ≥20% blasts in BM or PB) or MDS/AML (if 10-19% blasts in BM or PB)</p> <ul style="list-style-type: none"> • AML with mutated TP53# • AML with myelodysplasia-related gene mutations Defined by mutations in ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, and/or ZRSR2 • AML with myelodysplasia-related cytogenetic abnormalities** • AML not otherwise specified 	<p>Myeloid proliferations related to Down syndrome</p> <ul style="list-style-type: none"> • Transient abnormal myelopoiesis associated with Down syndrome • Myeloid leukemia associated with Down syndrome <p>Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</p>
<p>Diagnostic qualifiers††</p> <p>Therapy-related‡‡</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prior chemotherapy, radiotherapy, immune interventions <p>Progressed from MDS</p> <ul style="list-style-type: none"> • MDS should be confirmed by standard diagnostics and >3 mo prior to AML diagnosis <p>Progressed from MDS/MPN (specify type)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MDS/MPN should be confirmed by standard diagnostics and >3 mo prior to AML diagnosis <p>Germline predisposition (specify type)</p>	

Tabla 6. Fármacos aprobados por el FDA para LMA (46).

Drug	Indications	FDA approval	EMA approval	Mechanism of action	Outcome	References
Arsenic trioxide	Relapsed/refractory APL with t(15;17)/PML-RARA previously treated with anthracycline CTX and ATRA	09/2000	03/2002	Activation of transcription; differentiation	CR rate: 92%	Soignet <i>et al.</i> ⁶²
Arsenic trioxide	Newly diagnosed APL with t(15;17)/PML-RARA and low-/intermediate risk (WBC count $\leq 10.0 \times 10^9/l$) in combination with ATRA	01/2018	11/2016	Activation of transcription; differentiation	2-year EFS rate of 97 vs 86% ($P = 0.02$); CIR after 50 months 1.9% after ATO/ATRA vs 13.9% after CTX + ATRA	Lo-Coco <i>et al.</i> ⁵ ; Platzbecker <i>et al.</i> ⁶
Midostaurin	Newly diagnosed FLT3-ITD or FLT3-TKD-mutated AML in combination with standard CTX (7 + 3) Single-agent maintenance after intensive CTX (EMA only)	04/2017	09/2017	Multikinase FLT3 tyrosine kinase inhibitor	CTX (induction: 7 + 3, consolidation: HiDAC) + midostaurin vs CTX alone: median OS 74.7 vs 25.6 months (HR: 0.78; $P = 0.009$)	Stone <i>et al.</i> ⁵⁷
CPX-351	Newly diagnosed t-AML or AML-MRC	08/2017	08/2018	Liposomal cytarabine and daunorubicin at a fixed 5:1 molar ratio	CPX-351 vs 7 + 3 standard CTX: median OS 9.6 vs 6.0 months (HR: 0.69; $P = 0.005$)	Lancet <i>et al.</i> ⁵⁴
Gemtuzumab Ozogamicin	Newly diagnosed CD33 ⁺ adult AML in combination with CTX (7 + 3) Relapsed/refractory CD33 ⁺ adult AML or paediatric patients ≥ 2 years	09/2017	04/2018	Anti-CD33 antibody-drug conjugate	Newly diagnosed: CTX (7 + 3) + GO vs CTX alone: median EFS 15.6 vs 9.7 months (HR: 0.58; $P = 0.0003$) GO vs BSC: median OS 4.9 vs 3.6 months (HR: 0.69; $P = 0.005$) Relapsed/refractory: ORR 33.3%, CR rate 26.3%; median OS 8.4 months	Newly diagnosed: Burnett <i>et al.</i> ²⁶ ; Burnett <i>et al.</i> ²⁷ ; Castaigne <i>et al.</i> ²⁸ ; Hills <i>et al.</i> ²⁹ Relapsed/refractory: Bross <i>et al.</i> ²² ; Larson <i>et al.</i> ²⁴
Enasidenib	Relapsed/refractory IDH2 mutated AML	08/2017	–	IDH2 inhibitor	ORR 40.3%; CR rate 19%; median OS 9.3 months	Stein <i>et al.</i> ⁵⁹
Ivosidenib	Newly diagnosed IDH1 mutated AML patients ≥ 75 years or ineligible for intensive CTX or relapsed/refractory IDH1 mutated AML	07/2018	–	IDH1 inhibitor	Newly diagnosed: CR/CRh rate 42.4%, CR rate: 30.3%; median OS 12.6 months Relapsed/refractory: ORR 41.6%, CR rate 21.6%; median OS 8.8 months	DiNardo <i>et al.</i> ⁶²
Gilteritinib	Relapsed/refractory FLT3-ITD or TKD mutated AML	11/2018	10/2019	FLT3 tyrosine kinase inhibitor	Gilteritinib vs chemotherapy: median OS 9.3 vs 5.6 months (HR: 0.64; $P < 0.001$)	Perl <i>et al.</i> ⁵⁴
Glasdegib	Newly diagnosed AML in patients ≥ 75 years or ineligible for intensive CTX in combination with LDAC	11/2018	06/2020	Hedgehog pathway inhibitor	LDAC + glasdegib vs LDAC alone: median OS 8.8 vs 4.9 months (HR: 0.51; $P = 0.0004$)	Cortes <i>et al.</i> ⁷⁰
Venetoclax	Newly diagnosed AML in patients ≥ 75 years or ineligible for intensive CTX in combination with + HMA or LDAC	11/2018	05/2021	BCL2-inhibitor	Azacitidine + venetoclax vs azacitidine alone: median OS 14.7 vs 9.6 months (HR: 0.66; $P < 0.001$)	DiNardo <i>et al.</i> ⁶⁷
Azacitidine oral (CC-486)	Maintenance, patients in CR/CRi post intensive CTX	09/2020	Positive CHMP opinion: 04/2021, approval pending	Hypomethylating agent (oral formulation)	CC-486 vs placebo: median OS 24.7 vs 14.8 months ($P < 0.001$)	Wei <i>et al.</i> ⁷²

AML, acute myeloid leukaemia; APL, acute promyelocytic leukemia; ATO, arsenic trioxide; ATRA, all-trans retinoic acid; BCL-2, B-cell leukaemia/lymphoma-2; BSC, best supportive care; CHMP, Committee for Medicinal Products for Human Use; CIR, cumulative incidence of relapse; CR, complete remission; CRI, complete remission with incomplete haematological recovery; CRh, complete remission with partial haematologic recovery; CTX, chemotherapy; EFS, event-free survival; EMA, European Medical Agency; FDA, Food & Drug Administration; HiDAC, high-dose cytarabine; HMA, hypomethylating agent; HR, hazard ratio; ITD, internal tandem duplication; LDAC, low-dose cytarabine; MRC, myelodysplasia-related changes; ORR, overall response rate; OS, overall survival; PML-RARA, promyelocytic leukemia, retinoic acid receptor-alpha; t-AML, therapy-related AML; TKD, tyrosine kinase inhibitor; WBC, white blood cell.

Tabla 7. Comparación de tecnologías no-NGS para la determinación de variantes en muy baja concentración (7).

Technology	Principle	LOD	Pros	Detectable variants	Cons
ASPCR	The rate of PCR amplification is followed by either fluorescence from an intercalating dye or fluorescent hydrolysis probes Allele-specific primers or probes can be used to detect specific genomic variants	0.001% (up to 1 variant copy in the background of 100,000 WT copies)	High sensitivity and specificity of detection with fluorescent hydrolysis probes Well-established and widely accepted platform and workflow in clinical laboratories Quantitative Quantitation requires standard curve using appropriate positive controls	SNVs MNVs Fusions Indels CNVs*	Suitable only for screening known genomic variants in limited genomic regions Individual allele-specific design needed for each area or mutation to be interrogated Requires more DNA input; DNA requirement increases proportionally to the number of markers screened Low multiplexing capability and throughput
ddPCR	Each strand of template DNA is encapsulated in a microdroplet in which PCR is performed using fluorescent hydrolysis probes (emulsion PCR) Each droplet is scanned for characteristic fluorescence Allele-specific fluorescent hydrolysis probes can be used to distinguish variant and WT sequences	Routinely 0.1% (1 variant copy in a background of 1000 WT copies) LOD of 0.001% can be achieved with higher amount of DNA input (1 variant copy in the background of 100,000 WT copies)	High sensitivity and specificity of detection Absolute quantitation possible because of scanning and accounting of each droplet No need of a standard curve for quantitation	SNVs MNVs Fusions Indels CNVs*	Unsuitable for mutation screening and detecting novel variants
BEAMing	Modified version of ddPCR Emulsion PCR is performed with a single strand of template DNA and a magnetic bead to generate clonal beads covered with millions of copies of the template DNA strand Beads are isolated and interrogated with an allele-specific fluorescent probe Probe-bound beads are analyzed by flow cytometry	0.01% (1 variant copy in a background of 10,000 WT copies)	High sensitivity and specificity of mutation detection Combines advantages of ddPCR and flow cytometry Absolute quantitation feasible Uses equipment and platforms routinely available in molecular diagnostic laboratories	SNVs MNVs Fusions Indels CNVs*	

A summary of the current choices of orthogonal technologies that are applicable for detection of variants from tumor samples with high variant detection sensitivity (LOD). A summary of the underlying principles, LODs, and the associated pros and general cons is provided.

*CNV estimation by ddPCR and BEAMing is absolute quantitation, whereas ASPCR needs an internal reference control and reference standards.

ASPCR, allele-specific real-time PCR; BEAMing, beads, emulsification, amplification, and magnetics; CNV, copy number variation; ddPCR, droplet digital PCR; Indel, insertion and deletion; LOD, limit of detection; MNV, multinucleotide variant; NGS, next-generation sequencing; SNV, single-nucleotide variant; WT, wild type.