



Importancia de la utilización de la secuenciación masiva en la práctica clínica para el diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda.

MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

>>> La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad neoplásica que resulta de una proliferación clonal no controlada de células precursoras anormales. El estudio citogenético convencional es fundamental en la evaluación diagnóstica de las LMA y es utilizado en la actualidad. En el siguiente trabajo presentado por MANLAB se estudia una nueva técnica más sensible como es la secuenciación masiva (NGS) que permite el análisis simultáneo de un gran número de genes, permitiendo identificar la presencia de mutaciones emergentes.

>>> AUTORES

Maldonado AC, Perez MS.

MANLAB Diagnóstico Bioquímico y Genómico, Área de Medicina Genómica.

Marcelo T. de Alvear 2263 (1122), CABA. Argentina.

Email: maria.perez@manlab.com.ar

>>> INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide aguda (LMA) representa un grupo de neoplasias mieloides con marcada

heterogeneidad genética y etiología diversa. Se caracterizan por la proliferación clonal desregulada de células inmaduras (blastos) que han perdido la capacidad de diferenciarse normalmente y se caracterizan por su rápida progresión, infiltrando la médula ósea (MO) y en ocasiones otros órganos, causando la muerte por hemorragia y/o infección. Representa el 15 al 20% de las leucemias agudas en niños y el 80% en adultos.(1)

La etiología de la LMA es diversa, puede desarrollarse por exposición a agentes ionizantes, secundaria a tratamientos quimioterápicos, como progresión de otras alteraciones clonales resultado de la

inestabilidad genómica como Síndrome de Down, Síndrome de Fanconi o por la adquisición de mutaciones adicionales, como en las neoplasias mieloproliferativas (NMP), o los síndromes mielodisplásicos (SMD). También se deben tener en cuenta según la última clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), al menos 10 genes que se han asociado con mutaciones en la línea germinal: ANKRD26, CEBPA, DDX41, ETV6, GATA2, RUNX1, SRP72, TERC, TERT y TP53.(2)

El diagnóstico se basa en la evaluación morfológica, la expresión de marcadores citoplasmáticos o de superficie mediante citometría de flujo y los hallazgos cromosómicos por medio del estudio citogenético de los blastos en médula ósea o sangre periférica que completa la caracterización de la leucemia y tiene significado pronóstico.(3)

El estudio citogenético convencional es fundamental en la evaluación diagnóstica de las LMA, permitiendo su clasificación y definiendo subgrupos de riesgo ya que tiene valor pronóstico independiente.(1) Otros factores que afectan el pronóstico de la LMA incluyen los relacionados con el paciente como la edad y estado, así como los relacionados con la enfermedad, número de glóbulos blancos en sangre, relación con cáncer anterior o exposición a quimioterapia / radioterapia, expresión de CD34 y particularmente, las mutaciones somáticas adquiridas en el genoma de las

células leucémicas que influyen en la biología y comportamiento clínico.(4)

Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan cariotipo normal y se clasifican dentro del grupo de riesgo intermedio con un período libre de enfermedad variable, debido probablemente a la heterogeneidad genética que presentan y si bien está reconocida desde hace tiempo en los últimos años se ha vuelto cada vez más evidente y con gran importancia pronóstica.(5)

La clasificación de la OMS incorporó las alteraciones moleculares al algoritmo diagnóstico para las cuales la metodología de referencia es la secuenciación de Sanger que sigue siendo una técnica ampliamente utilizada en diagnóstico pero posee una serie de limitaciones, en tiempo, costos y sensibilidad.(3)

Actualmente el estudio de estas alteraciones moleculares está cambiando debido a la utilización de técnicas más sensibles como la secuenciación masiva (NGS) que permite el análisis simultáneo de un gran número de genes en un solo experimento, que ha generado un aumento significativo de la cantidad de datos obtenidos y permitido identificar la presencia de mutaciones emergentes en un pequeño porcentaje de células neoplásicas.(6) Se han encontrado mutaciones somáticas en diversos genes con diferente valor



ZIKA, DENGUE & CHIKUNGUNYA

KIT DE DETECCIÓN POR REAL TIME PCR DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN ESPECÍFICA DE LOS VIRUS ZIKA, DENGUE Y CHIKUNGUNYA EN MUESTRAS CLÍNICAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON SIGNOS Y SÍNTOMAS DE INFECCIÓN POR ESTOS VIRUS

- El RNA es extraído a partir de las muestras clínicas, provenientes de sangre entera, suero, plasma u orina
- Compatible con múltiples plataformas de extracción manual y automáticas

tecnolab

- FTD-84-32 Test para 32 reacciones
- FTD-84-64 Test para 64 reacciones
- Validados con diferentes equipos de Real Time PCR



Fast Track >>
DIAGNOSTICS
A Siemens Healthineers Company



Estomba 964 | C1427COV CABA
Buenos Aires | Argentina
Tel: 54 11 4859 5300
info@tecnolab.com.ar
tecnolab.com.ar

pronóstico de los cuales podemos mencionar algunos:

- Receptores tirosina kinasas: FLT3, KIT
- Tirosina kinasas citoplasmáticas: JAK1, JAK2, JAK3, ABL1
- Transducción de señales: CBL, CBLB, NRAS, KRAS, HRAS
- Reguladores epigenéticos del ADN: IDH1, IDH2, DNMT3A, TET2, EZH2, ASXL1
- Factores de Splicing: SF3B1, SRSF2, ZRSR2, U2AF1
- Factores de transcripción: GATA1, GATA2, CEBPA, ETV6, RUNX1, STAT3, PAX5, IKZF1
- Genes supresores de tumor: TP53, WT1, NPM1

Según estos hallazgos, mutaciones en FLT3 (35% de los pacientes) pueden reordenarse con ITD o TKD que indican peor pronóstico con mayor tasa de recaída para FLT3-ITD mientras que FLT3-TKD lo mejoran. Mutaciones bialélicas de CEBPA se asocian a mejor pronóstico y alteraciones en NPM1 pueden observarse hasta en el 50% de las LMA con cariotipo normal. La ausencia del reordenamiento FLT3-ITD, confieren buen pronóstico.(7)

Mutaciones en el gen RUNX1 han sido incluidas en la nueva clasificación OMS 2016, asociadas a mal pronóstico que ocurren en el 10% de las LMA y es mutuamente excluyente con las anomalías genéticas recurrentes.(1) Además se deben considerar mutaciones en TP53 y ASXL1 asociadas también con un pronóstico desfavorable.(8)

Los hallazgos mediante la incorporación de esta nueva tecnología de secuenciación masiva ha expandido nuestro conocimiento, permitiendo identificar mutaciones recurrentes, el perfil genómico, la frecuencia de las mutaciones, la evolución clonal durante el curso de la enfermedad y centrar la investigación clínica en estrategias de tratamiento específicas según el genotipo para tener mayor eficacia aunque el impacto de esta información se encuentra aún en etapas tempranas.(9)

Los resultados de numerosos trabajos han demostrado el potencial de la secuenciación masiva.

La Red de Investigación “Atlas del Genoma del Cáncer” analizó los genomas de 200 pacientes adultos con

LMA (50 con secuenciación del genoma completo y 150 con secuenciación completa del exoma) junto con la secuenciación de ARN, microARN y el análisis de metilación del ADN.

Los datos obtenidos han demostrado que la LMA tienen menos mutaciones que la mayoría de otros cánceres de adultos, con un promedio de 13 mutaciones. Se encontraron más de 2500 mutaciones en 23 genes mutados de manera recurrente y otros 237 genes en forma aleatoria. La organización de los genes mutados reveló muchas interacciones biológicas potencialmente importantes. Identificaron al menos una posible mutación conductora en casi todas las muestras de LMA y una interacción compleja de eventos genéticos que contribuyen a comprender posibles mecanismos en la patogénesis de la leucemia. Los genes mutados con mayor frecuencia fueron FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, RUNX, TP53, NRAS y CEBPA entre otros.(5)

Otro estudio retrospectivo de Papaemmanuil y colaboradores incluyeron más de 1500 pacientes, identificaron 5234 mutaciones conductoras en 76 genes o regiones genómicas con 2 o más alteraciones conductoras en el 86% de los pacientes y permitieron identificar 11 perfiles genéticos con características diagnósticas y clínicas diferentes. Además, fue posible definir tres categorías: LMA con mutaciones en genes que codifican la cromatina y/o reguladores de splicing, LMA con mutaciones TP53 y/o aneuploidías cromosómicas y LMA con mutaciones IDH2 (R172) en el 1%.(8)

Es necesario mencionar que los SMD pueden evolucionar a LMA y con la incorporación de estrategias de secuenciación masiva se han identificado mutaciones genéticas recurrentes en más de 40 genes lo que podría contribuir al diagnóstico y estratificación de riesgo.(10)

Otro aspecto importante de la secuenciación masiva es la capacidad de detectar enfermedad mínima residual (EMR) que ha estado limitada por la falta de marcadores específicos en pacientes sin reordenamientos cromosómicos asociados a genes de fusión y plantea desafíos significativos en la identificación de marcadores moleculares adecuados.(11) Existe heterogeneidad no

solo entre diferentes LMA, sino dentro de cada caso individual, ya que la composición clonal de la leucemia puede variar significativamente con subclones sujetos a selección natural o inducidos por el tratamiento y se ha demostrado que la ERM es un predictor de riesgo de recaída y supervivencia global.(12)

Las opciones de tratamiento para LMA se han expandido como resultado del descubrimiento de las alteraciones genéticas. Hay numerosos fármacos en desarrollo en diferentes etapas de investigación clínica para el tratamiento siendo un gran avance la aprobación en 2017 de midostaurin en pacientes con mutación en FLT3 que se puede encontrar en aproximadamente el 30% de pacientes con LMA.(13)

Los hallazgos mencionados provienen de la secuenciación completa del exoma tumoral o de grandes números de genes, mediante esta metodología NGS que predomina como herramienta en el área de investigación,

sin embargo en el laboratorio clínico de diagnóstico molecular, diferentes grupos intentan evaluar paneles específicos de un número de genes más reducido, entre 20 y 50 según los diseños comerciales o personalizados que permitirían la secuenciación de las regiones de interés de aquellos genes mutados más frecuentes, con alta sensibilidad con el objetivo de acortar el tiempo de respuesta necesario en el diagnóstico, estratificar los pacientes y reducir también los costos en un futuro próximo.(6)

En el diagnóstico y estratificación de las LMA, la citogenética convencional y la detección de mutaciones en NPM1, FLT3 y CEBPA están siendo actualmente utilizados en la práctica clínica siguiendo las recomendaciones de la OMS 2016 y ELN de 2017.

Los avances logrados con la secuenciación masiva enriquecieron ampliamente el arsenal diagnóstico y la gran cantidad de datos obtenidos ha llevado a varios

 **BD Vacutainer®**
Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:
Su interés y nuestro compromiso



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escribanos a: vacutainer@bd.com



cambios incorporando mutaciones en el gen RUNX1 que se asocia a pronóstico desfavorable y se encuentra en ausencia de las mutaciones genéticas recurrentes, alteraciones en ASXL1 son más comunes en pacientes mayores, asociado a menor supervivencia y junto con alteraciones en los genes SRSF2, TP53 también identifican pacientes con pronóstico adverso.(14)

Estos hallazgos impactan en la práctica clínica en diferentes niveles, incluyendo diagnóstico, pronóstico y seguimiento terapéutico.(16). Este conjunto de genes recurrentemente mutados proporcionan la columna vertebral para los paneles de secuenciación que actualmente se están incorporando a la práctica clínica.(10)

Si bien hasta ahora, tanto la clasificación de la OMS, actualizada en 2016, así como el ELN 2017 no incorporan en sus recomendaciones los paneles NGS ambos recomiendan el análisis de al menos seis genes (NPM1, FLT3, CEBPA, ASXL1, TP53 y RUNX1) los cuales incluyen varios exones por lo cual el uso de NGS probablemente ya sea aconsejable en aquellos laboratorios que podrían realizar una validación clínica del ensayo, teniendo en cuenta la complejidad en el análisis de los datos obtenidos. (2,14)

Como conclusión podemos resaltar que la secuenciación masiva es un método altamente sensible que nos permite conocer el estado mutacional de los genes de interés más frecuentemente mutados logrando una mejor estratificación de los pacientes, identificar grupos de riesgo en función de las mutaciones, el seguimiento de ERM y nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de tratamientos específicos logrando una medicina más precisa. Si bien actualmente estas mutaciones se estudian por secuenciación de Sanger, algunos laboratorios han incorporado la secuenciación masiva de un gran número de genes al diagnóstico integrado de la LMA. ■

MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

>>> REFERENCIAS

1. Agriello E, Cazap N, Dourisboure R, Fernández I, Ferrari I, Fischman L. Guías de diagnóstico y tratamiento. Sociedad Argentina de Hematología. 2017. p. 363-78.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
3. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
4. Visani G, Loscocco F, Isidori A, Piccaluga PP. Genetic profiling in acute myeloid leukemia: a path to predicting treatment outcome. *Expert Rev Hematol*. 2018;11(6):455-61.
5. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
6. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, Haghshenas V, Routbort MJ, Harmon MA, et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica*. 2014;99(3):465-73.
7. Infante MS, Piris MA, Hernandez-Rivas JA. Molecular alterations in acute myeloid leukemia and their clinical and therapeutic implications. *Med Clin (Barc)*. 2018.
8. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
9. Kayser S, Levis MJ. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2018;180(4):484-500.
10. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):968-74.
11. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1189-99.
12. Coltoff A, Houldsworth J, Keyzner A, Renteria AS, Mascarenhas J. Role of minimal residual disease in the management of acute myeloid leukemia-a case-based discussion. *Ann Hematol*. 2018;97(7):1155-67.
13. Levis M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood*. 2017;129(26):3403-6.
14. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.