

¿Qué estudios solicitar y que métodos son los indicados?

How do I approach molecular landscape in AML

Agriello, Evangelina¹²³; Lang, Cecilia¹; Bender, Andrea¹

¹LEB laboratorio

²Servicio de Hematología Hospital Penna

³Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

eagriello@leblaboratorio.com.ar



**BIOLOGÍA
MOLECULAR
Y GENÉTICA
EN LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA**

HEMATOLOGÍA
Volumen 26 Numero Extraordinario
4tas Jornadas Latinoamericanas
de la SAH: 124-129
Noviembre 2022

Palabras claves: Leucemia Mieloide Aguda (LMA),
genómica,
clasificación.

Keywords: Acute myeloid leukemia (AML),
genomic,
classification.

Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) se caracteriza por la expansión clonal de precursores mieloides con alta tasa proliferativa produciendo hematopoyesis ineficaz y falla medular. Desde el punto de vista genómico se caracteriza por la adquisición seriada de mutaciones somáticas en genes implicados en numerosas funciones y mecanismos que propician la aparición y expansión del clon neoplásico. Entre las más conocidas, están las mutaciones en DNMT3A, TET2, y ASXL1, detectadas como eventos leucemogénicos tempranos, y otras que se adquieren durante la evolución de la patología como FLT3, NRAS y RUNX1.

El desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación de genes ha permitido la identificación de decenas de mutaciones genéticas recurrentes en neoplasias mieloides, que condujeron a una mejor compren-

sión de la fisiopatología de la LMA, y que tienen un impacto directo en el manejo clínico de los pacientes^{1,2}.

Dentro de estas nuevas tecnologías se destacan los métodos de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing: NGS), que han revolucionado el campo de la genómica y han permitido evidenciar la complejidad y dinamismo que presentan estas patologías. El estudio secuencial de las LMA, en distintos momentos de su evolución, permite identificar múltiples clones que han adquirido alteraciones secundarias y que compiten al mismo tiempo y de forma selectiva en el microambiente medular³.

NGS es un método de alta sensibilidad que se basa en la secuenciación masiva y paralela de gran cantidad de material genético, arrojando un amplio caudal de información en simultáneo y en un corto período de tiempo. Luego se requiere del análisis

bioinformático para ordenar y analizar las secuencias obtenidas, comparando las lecturas individuales con el genoma de referencia. De esa manera se identifican las variantes relevantes para el diagnóstico, pronóstico y/o terapéutica del paciente, y se clasifican de acuerdo a su impacto como patogénico, probablemente patogénico, benigno o de significado incierto.

Los paneles mieloides utilizados para estudios de NGS aplicados a la clínica oncohematológica habitualmente son de lecturas cortas, e incluyen a los genes, exones y “hot spots” de relevancia en la patología. La interpretación de los resultados obtenidos requiere, además de la consulta a distintas bases de datos, la intervención de un profesional experto que correlacione los mismos con los datos clínicos, y demás resultados de cada paciente en particular, para concluir en un informe que resulte claro para el hematólogo clínico.

A través del uso de NGS aplicado al estudio de las LMA se han podido establecer asociaciones entre ciertas variantes de genes y otras que, por el contrario, serían, mutuamente excluyentes. El desafío ha sido comprender cómo se relacionan las distintas variantes con la evolución clínica⁴.

Un aspecto importante del estudio de NGS es la posibilidad de detectar variantes germinales, que pueden impactar en el diagnóstico y en las decisiones terapéuticas, sobre todo en pacientes con la opción de un trasplante con donante relacionado.

Clasificación de entidades y definición de riesgo en LMA

Los sistemas utilizados para la clasificación de entidades y las escalas para la definición de riesgo presentan características diferentes. Los primeros se basan en aspectos puramente biológicos de la enfermedad mientras que los segundos tienen en cuenta otros factores que impactan en el pronóstico, como la respuesta al tratamiento, y que también pueden modificar la supervivencia de los pacientes. Por ejemplo, el uso de los inhibidores de FLT3 modificó la clasificación de riesgo de los pacientes con mutaciones en estos genes.

El avance en el conocimiento y comprensión de la patogénesis molecular puso de manifiesto la necesidad de una redefinición de las distintas entidades clínico biológicas dentro de las LMA. El Consenso Internacional para la Clasificación de

Neoplasias Mieloides y Leucemias Agudas (ICC) ha reunido a un grupo multidisciplinario de expertos a fines de establecer lineamientos generales que faciliten el diagnóstico y el pronóstico de las neoplasias mieloides y leucemias agudas, brindando mejores tratamientos a los pacientes y permitiendo el diseño de ensayos clínicos innovadores (Arber et al. 2022)⁵. Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud también ha publicado en 2022 la actualización de la clasificación de LMA y otras neoplasias mieloides (Khoury et al. 2022)⁶, poniendo énfasis en el perfil genético y en la identificación de biomarcadores accionables para facilitar el uso de terapias target. La clasificación actualizada conserva muchas de las entidades definidas como LMA con anomalías genéticas recurrentes, mientras que incorpora nuevas entidades como LMA con rearrreglos de KMT2A, MECOM y NUP98. La presencia de terapias previas, antecedentes de otras neoplasias mieloides (SMD o SMD/NMP), o trastornos genéticos de línea germinal que predisponen al desarrollo de LMA se consideran ahora como características importantes a tener en cuenta en los pacientes, pero ya no definen entidades en la nueva clasificación.

El ICC ha desarrollado un algoritmo para el diagnóstico de las LMA, adaptado de ELN (Dohner et al. 2022) que resalta la clasificación jerárquica de las distintas alteraciones genéticas (Figura 1)⁷.

Este algoritmo evidencia que la presencia de alteraciones genéticas recurrentes es la característica más importante al momento de establecer entidad. En estos casos uno de los cambios principales es la eliminación del requerimiento de 20% de blastos (con excepción de las LMA con BCR::ABL1, y LMA con mutaciones de CEBPA de acuerdo a Khoury et al.), siendo suficiente la presencia de 10% de blastos si se demuestra la presencia de una anomalía genética *driver* en la leucemia. Para el resto de las alteraciones (mutaciones de TP53, ASXL1, SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2, EZH2, BCOR, STAG2, y anomalías citogenéticas relacionadas a SMD) el porcentaje de blastos define si se trata de SMD/LMA (10% a 19%) o LMA(>20%).

Con una visión clínica aplicado a la vida real, las recomendaciones de European LeukemiaNet (ELN) (Dohner et al. 2022), constituyen una guía práctica que establece los lineamientos para el diagnóstico, control de la enfermedad a lo largo del tratamiento y opciones terapéuticas en LMA. Al igual que ocu-

Figura 1. Algoritmo del Consenso Internacional para la Clasificación de LMA (adaptado de Arber et al 2022)



rió con la clasificación de las distintas entidades, el conocimiento genómico más profundo de las LMA y la aparición de nuevos biomarcadores obligó a la revisión de las recomendaciones para el estudio de enfermedad residual medible (ERM) y a la redefinición de los criterios de respuesta al tratamiento.

En la actualidad se cuenta con herramientas fundamentales que permiten obtener el perfil genómico de los pacientes con LMA al momento del diagnóstico, y detectar variantes que: 1) sean útiles para el seguimiento y la cuantificación de la ERM con mayor sensibilidad y especificidad que otros métodos; 2) puedan ser utilizados como blanco terapéutico para terapias dirigidas como los inhibidores de FLT3, IDH1, IDH2, and BCL2.

Estudios requeridos para el correcto diagnóstico

El momento del diagnóstico es la instancia evaluatoria más importante en las LMA, y es entonces cuando resulta fundamental considerar todo el espectro de técnicas disponibles para el estudio de la patología. La correcta y exhaustiva caracterización de los pacientes con LMA no sólo es imprescindible para la clasificación y pronóstico, sino que además permitirá un correcto tratamiento y posterior control con cuantificación de la ERM⁸.

Las muestras biológicas requeridas para el diagnóstico de LMA pueden ser médula ósea (MO) y/o sangre periférica (SP), donde la población patológica

debe estar representada. Se debe considerar la obtención de muestras anticoaguladas con EDTA y con heparina, ya que ambas son indispensables para cubrir el abanico de estudios requeridos en la actualidad.

Los estudios básicos que deben ser considerados ante una sospecha de diagnóstico morfológico son los siguientes: inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica (CFM); citogenético convencional con bandeado G; hibridación fluorescente in situ (FISH); y estudios moleculares (RT-PCR, qRT-PCR, secuenciación por Sanger, NGS). Es importante tener presente siempre la potencialidad de estudios (cantidad de muestra y anticoagulantes) al momento de la toma de muestra.

Inmunofenotipo: se utiliza inmunomarcación y detección por citometría de flujo multiparamétrica (CFM). Dada la heterogeneidad de las líneas mieloides, se usa un amplio panel de marcadores que identifican la línea hematopoyética comprometida con marcadores de superficie e intracitoplasmáticos. Es importante identificar fenotipos asociados a la leucemia (LAIPs) y aberrancias respecto a las ontogenias normales (DfN) siendo fundamentales estas alteraciones para el monitoreo posterior de la ERM usando CFM.

Para la identificación de la línea mieloides en la población leucémica al diagnóstico se pueden usar los lineamientos del grupo Euroflow. Ellos han

publicado guías técnicas con completa estandarización para la detección sensible, específica y reproducible entre distintos centros usando paneles a 8 colores. No se han publicado aun los paneles para ERM de LMA para la correcta identificación y cuantificación con alta sensibilidad y especificidad dada la heterogeneidad que presentan las líneas mieloides^{9,10}.

Citogenético convencional con bandeo G (CTG): el cariotipo convencional es mandatorio en el estudio de las LMA y de las neoplasias mieloides en general. La muestra para CTG debe ser anticoagulada con heparina y tomada en condiciones de esterilidad, si es posible del primer aspirado medular. La mayoría de las alteraciones genéticas recurrentes son identificables por CTG, así como también las anomalías citogenéticas relacionadas a mielodisplasia.

Hibridación fluorescente in situ (FISH): es una técnica de citogenética molecular que resulta complementaria al CTG para la búsqueda de alteraciones genéticas específicas: genes de fusión BCR::ABL1; RUNX1::RUNX1T1; PML::RARA; CBFβ::MYH11; KMT2A (MLL), etc., o alteraciones cromosómicas asociadas a mielodisplasia como -5/5q-, -7/del7q, del17p, etc. Es particularmente útil cuando: 1) la cantidad de metafases obtenidas es escasa, o no se obtuvieron metafases; 2) se desea confirmar una alteración sospechada en el CTG; 3) definir alteraciones en cariotipos complejos; 4) alteraciones crípticas (no visibles por CTG); 5) alteraciones con alta sospecha clínica o morfológica no detectada en el CTG.

Estudios moleculares: los estudios moleculares (RT-PCR, qRT-PCR, secuenciación por Sanger, NGS) pueden ser realizados a partir de ADN y/o ARN y las muestras deben estar siempre anticoaguladas con EDTA. Es sumamente importante, siempre que sea posible, el envío tanto de MO como de SP ya que las técnicas de biología molecular son rigurosas en cuanto a la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos.

La situación óptima para caracterizar genéticamente a todos los pacientes con LMA sería el estudio de un panel de NGS que incluya mutaciones y genes de fusión asociados a patología mieloides al momento de diagnóstico. No obstante, esto tiene ciertas limitaciones en nuestro medio debido al acceso restringido y tardío que otorgan las coberturas médicas, y que dificulta la posibilidad para responder a los tiempos necesarios de una LMA. En los casos en que no resulta factible la evaluación de este estudio,

es importante al menos considerar la realización del estudio de mutaciones en los genes FLT3, NPM1, y TP53, entre otros considerando la presentación clínica, otros resultados y opciones terapéuticas en cada paciente.

La búsqueda de mutaciones en el gen FLT3 debe ser considerada prioritaria al momento del diagnóstico de LMA (antes del día 9 de tratamiento) por su implicancia como blanco terapéutico. Si bien las LMA con mutaciones de FLT3 ya no son de alto riesgo de acuerdo a ELN 2022, es importante identificarlas ya que se presentan en alrededor de un tercio de los pacientes y actualmente existen inhibidores aprobados, como la midostaurina, y otros en desarrollo. La determinación se realiza por amplificación de ADN y electroforesis capilar, y permite detectar tanto las duplicaciones internas en tándem (ITD) y como la mutación puntual D835I (TKD).

La presencia de mutaciones en el gen NPM1, además de definir una entidad dentro de las LMA, al igual que las mutaciones en TP53 y CEBPA, representa un biomarcador para el seguimiento de la ERM.

En las LMA con rearrreglos BCR::ABL1; RUNX1::RUNX1T1; PML::RARA y CBFβ::MYH11 se recomienda realizar la identificación del transcrito y cuantificación basal por qRT-PCR, o próximamente PCR digital (dPCR), para facilitar el seguimiento de la ERM y evaluar la respuesta al tratamiento (depuración de la carga tumoral).

Las LMA con mutaciones en el gen TP53 son reconocidas en la clasificación actual como una entidad separada, relacionada con la presencia de cariotipos complejos, y asociada a muy mal pronóstico. A diferencia de lo que ocurre en SMD, en LMA es suficiente la presencia de una única variante patogénica con frecuencia alélica (VAF) mayor al 10% para ser definida como tal.

La detección de variantes patogénicas en otros genes como ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 o ZRSR2 permitiría identificar pacientes con LMA con mutaciones en genes relacionados a mielodisplasia.

Monitoreo de Enfermedad Residual Medible (ERM)

La determinación de la ERM en LMA se utiliza para: 1) disponer de un resultado cuantitativo de la profundidad de la remisión, 2) determinar el riesgo de recaída post remisión 3) identificar recaídas

tempranas 4) como un punto final subrogante para acelerar los testeo de drogas y su aprobación.

Todas las técnicas de detección y cuantificación de MRD deben ser estandarizadas y publicadas por consorcios de referencia, y luego validadas en cada laboratorio para que los resultados obtenidos resulten reproducibles y comparables entre distintos centros. Las técnicas más utilizadas y de mayor acceso para el uso clínico en el medio local son citometría de flujo multiparamétrica (CFM) y RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), con las cuales se ha adquirido amplia experiencia durante los últimos años. Actualmente se encuentran en proceso de incorporación las determinaciones de ERM usando *dropped digital PCR* (dPCR) y NGS.

ERM por CFM: la búsqueda del fenotipo asociado a la leucemia (LAIPs) identificado en la instancia diagnóstica y la evaluación de la ruta de diferenciación inmunofenotípica con respecto a la diferenciación normal (DfN: different from normal), son herramientas que permiten distinguir la presencia tanto de enfermedad residual como de clones emergentes durante las fases del tratamiento.

qRT-PCR y dPCR: las técnicas que utilizan qRT-PCR y dPCR pueden alcanzar un límite de sensibilidad muy alto ($>10^{-4}$). Se puede utilizar tanto medula ósea como sangre periférica considerando que la sensibilidad en SP es siempre de un logaritmo inferior a la de la MO. Las alteraciones moleculares cuantificables para monitorear la ERM asociadas a LMA son: PML::RARA, CBFβ::MYH11, RUNX1::RUNX1T1, KMT2A::MLLT3, DEK::NUP214, y BCR::ABL1; las mutaciones en NPM1 y la expresión de WT1.

En la Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) actualmente están vigentes las recomendaciones del ELNet del 2019¹¹.

Por todo lo expuesto, es evidente que el abordaje de los pacientes con LMA ha cambiado, y que resulta imprescindible responder a los tiempos de procesamiento y de emisión de resultados para establecer rápidamente la identidad genómica de las LMA, y permitir así la elección del tratamiento más adecuado para cada paciente.

Conflictos de interés: Las autoras declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, y col. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209-2221.
2. Döhner H, Estey E, Grimwade D, y col. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424-447
3. Hu T, Chitnis N, Monos D y col. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.* 2021; 82(11):801-811.
4. Tyner J , Tognon C, Bottomly D y col. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature.* 2018 Oct;562(7728):526-531.
5. Arber DA, Orazi, A, Hasserjian RP, et al. The International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood.* 2022;140(11):1200-1228.
6. Khoury JD, Solary E, Abla O et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/ Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, published online 22 June 2022 *Blood*
7. Döhner H , Wei A, Appelbaum F, y col. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022 Sep 22;140(12):1345-1377.
8. Heuser M , Freeman S , Ossenkoppele G y col. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2021 Dec 30;138(26):2753-2767.
9. Mejstrikova E, Hrusak O, Szczepański T, y col. Euro-Flow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):1986-2010.
10. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, y col. Euro-Flow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):1908-75.
11. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, y col. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2019;133(15):1630-1643.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.