

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Medicina



**EVALUACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE
LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN LA LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA *DE NOVO* MEDIANTE EL EMPLEO DE
TÉCNICAS DE *NEXT GENERATION SEQUENCING***

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Carmen María Alonso Prieto

Dirigida por:

Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Dra. Eva Barragán González

Febrero 2020



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA
Departament de Medicina

MIGUEL A. SANZ ALONSO, Catedrático y Profesor Honorario del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia,

EVA BARRAGÁN GONZÁLEZ, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: **“EVALUACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DE NOVO MEDIANTE EL EMPLEO DE TÉCNICAS DE NEXT GENERATION SEQUENCING”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Carmen María Alonso Prieto**, Licenciado en Medicina, y reúne a nuestro juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor en Medicina**.

Valencia, 04 de Febrero de 2020.

Fdo.: Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Fdo.: Dra. Eva Barragán González

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a los directores de esta tesis, el Prof. Miguel Ángel Sanz y la Dra. Eva Barragán la oportunidad de trabajar a su lado, lo que me ha permitido aprender de su experiencia y buen hacer.

Al Dr. Jose Cervera y la Dra. Esperanza Such por animarme a dar el primer paso en la investigación, así como a todo el equipo del laboratorio de citogenética en el que pasamos muchos y grandes momentos.

A las Dras Eva Barragán y Marta Llop por su gran acogida en el laboratorio de biología molecular, haciéndome sentir parte del equipo desde el primer día, por guiarme, por sus consejos, su paciencia y su confianza. En especial, me gustaría agradecer a Marta su generosidad, el ser una compañera excepcional, siempre ahí, por ser la otra mitad de este proyecto.

A todos los que directa o indirectamente han contribuido a la realización de este trabajo, a los pacientes que tanto nos enseñan en el día a día, a todo el personal asistencial y de investigación del grupo de Hematología del Hospital la Fe y a mis compañeros del Hospital Arnau de Vilanova.

A mis padres, por su ejemplo de trabajo y constancia, por ceder parte de su tiempo a cambio del mío, por estar siempre cuando lo he necesitado. A mi hermano Carlos, porque cada tarde escribiendo este trabajo recordaba su manzanilla con azúcar aparte. A María, por su ayuda constante, por mostrarme el lado bueno de las cosas.

A Juanma, por su apoyo, por estar ahí en los buenos momentos y hacerme sonreír en los malos, por compartir el camino. A Hugo y Daniel, por enseñarme lo realmente importante en la vida, por transmitirme su ilusión por cada pequeña cosa, por obsequiarme con su amor incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA).....	3
1.1.1. Definición.....	3
1.1.2. Epidemiología.....	3
1.1.3. Etiología	3
1.1.4. Patogenia	4
1.1.5. Clasificación	10
1.1.6. Diagnóstico.....	12
1.1.7. Factores Pronóstico	13
1.1.8. Clínica	17
1.1.9. Tratamiento de LMA.....	18
1.2. SECUENCIACIÓN MASIVA O NGS.	21
1.2.1. Concepto y aplicaciones	21
1.2.2. Tipos de secuenciación masiva	22
1.2.3. Metodología de la secuenciación masiva.....	22
1.2.4. Tecnologías y plataformas de secuenciación masiva	23
1.2.5. Interpretación de las variantes	24
1.3. SECUENCIACIÓN MASIVA EN LMA.....	26
2. HIPÓTESIS.....	33
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
4.1. PACIENTES Y MUESTRAS	43
4.2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES.....	44
4.2.1. Extracción de ácidos nucleicos	44
4.2.2. Líneas celulares y controles.....	44
4.2.3. Caracterización molecular mediante NGS	45
4.2.4. Validación técnica del método de NGS.....	50
4.2.5. Validación clínica de la técnica de NGS.....	53

4.3. DEFINICIONES.....	54
4.3.1. Secuenciación masiva.....	54
4.3.2. Respuesta al tratamiento	55
4.3.3. Supervivencia.....	56
4.3.4. Otros.....	56
4.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	57
4.4.1. Aspectos técnicos	57
4.4.2. Aspectos clínicos.....	57
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
5. RESULTADOS	59
5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SERIE	61
5.2. VALIDACIÓN TÉCNICA DEL PANEL DE NGS	63
5.2.1. Parámetros de la secuenciación	63
5.2.2. Validez.....	66
5.2.3. Precisión y límite de detección.....	66
5.3. VALIDACIÓN CLÍNICA DEL PANEL DE NGS.....	69
5.3.1. Caracterización molecular mediante NGS	69
5.3.2. Sensibilidad analítica.....	72
5.3.3. Análisis de la VAF	72
5.3.4. Impacto clínico	73
5.4. CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO.....	74
5.4.1. Clasificación	74
5.4.2. Clasificación genómica.....	75
5.4.3. Clasificación ELN 2017	75
5.5. RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS	77
5.5.1. Relación del perfil mutacional y los grupos citogenéticos.....	77
5.5.2. Número de mutaciones	78
5.5.3. Asociaciones y exclusiones entre genes.....	78
5.6. RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES MOLECULARES Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOFENOTÍPICAS	79
5.6.1. Alteraciones moleculares y características clínicas	79
5.6.2. Alteraciones moleculares y marcadores inmunofenotípicos	81
5.7. RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN	81
5.7.1. Análisis de factores con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción.....	81

5.8. SUPERVIVENCIA.....	84
5.8.1. Supervivencia global (SG).....	84
5.8.2. Supervivencia libre de evento (SLE).....	89
5.8.3. Incidencia acumulada de recaída (IAR)	93
5.8.4. Supervivencia y clasificaciones pronósticas	98
6. DISCUSIÓN	103
6.1. VALIDACIÓN TÉCNICA E IMPLEMENTACIÓN DEL PANEL A ESTUDIO	105
6.2. VALIDACIÓN CLÍNICA Y UTILIDAD DIAGNÓSTICA	107
6.3. CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE	108
6.4. CLASIFICACIÓN DE LA LMA	109
6.5. RELACIÓN ENTRE ALTERACIONES GENÉTICAS Y ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS.....	110
6.6. ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO EN LA SUPERVIVENCIA	111
7. CONCLUSIONES	115
8. BIBLIOGRAFÍA.....	119
9. ANEXOS.....	135
9.1. TABLAS COMPLEMENTARIAS.....	137
9.2. FIGURAS COMPLEMENTARIAS	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorías funcionales propuestas por el TCGA, genes pertenecientes y frecuencia en la LMA <i>de novo</i>	7
Tabla 2. Clasificación de la LMA (FAB).	10
Tabla 3. Clasificación de la LMA y neoplasias relacionadas (OMS 2017).	11
Tabla 4. Marcadores celulares de membrana y citoplasmáticos útiles en el diagnóstico de la LMA	12
Tabla 5. Grupos de riesgo citogenético según MRC revisado.	14
Tabla 6. Estratificación del riesgo genético según la ELN 2017.	16
Tabla 7. Comparación entre las plataformas de NGS más empleadas	24
Tabla 8. Propuesta de clasificación de variantes somáticas.	25
Tabla 9. Resumen de los principales trabajos publicados que emplean NGS para el estudio de la LMA.	29
Tabla 10. Categorías de la clasificación genómica.	30
Tabla 11. Genes y regiones incluidas en el panel de NGS.	45
Tabla 12. Reactivos y volúmenes empleados en la reacción de amplificación.	46
Tabla 13. Características de la PCR de amplificación de los <i>pools</i> 1 y 2.	46
Tabla 14. Condiciones de la PCR de amplificación de los <i>pools</i> 3 y 4.	47
Tabla 15. Combinación de los distintos <i>pools</i> de amplicones.	47
Tabla 16. Condiciones del termociclador para la reacción de ligación.	48
Tabla 17. Características generales de la serie de estudio y comparación con la serie global independientemente de la presencia de ADN disponible.	61
Tabla 18. Clasificación OMS 2008 de la serie de estudio y comparación con la serie global.	62
Tabla 19. Clasificación FAB de la serie de estudio y comparación con la serie global.	63

Tabla 20. Clasificación según la ELN 2010 de la serie de estudio y comparación con la serie global.	63
Tabla 21. Parámetros de la secuenciación con el panel NGS.....	64
Tabla 22. Valores absolutos del experimento de validez.....	66
Tabla 23. Reproducibilidad entre las plataformas Ion Proton e Ion PGM.....	67
Tabla 24. Repetibilidad, precisión intermedia y límite de detección del panel de NGS.	68
Tabla 25. Clasificación OMS 2017 de la serie de estudio.....	74
Tabla 26. Clasificación genómica de los pacientes de la serie de estudio.	75
Tabla 27. Grupos de riesgo de la serie de estudio según los criterios ELN 2017.	76
Tabla 28. Variables clínicas y genes que mostraron una correlación significativa.	80
Tabla 29. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción.....	82
Tabla 30. Impacto en la respuesta al tratamiento de inducción según los grupos de riesgo de las clasificaciones citogenética, ELN 2017 y genómica.	83
Tabla 31. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción.....	84
Tabla 32. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la SG.....	86
Tabla 33. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la SG. ...	89
Tabla 34. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la SLE.....	90
Tabla 35. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la SLE... ..	93
Tabla 36. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la IAR.	94
Tabla 37. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la IAR....	97
Tabla 38. Análisis de supervivencia censurado y no censurado al alotrasplante según los grupos de riesgo citogenéticos.	99
Tabla 39. Análisis de supervivencia censurado y no censurado al alotrasplante según grupos de riesgo ELN 2017.....	101
Tabla 40. Análisis de supervivencia censurado y no censurado al alotrasplante según grupos de la clasificación genómica.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las alteraciones genéticas y asociaciones entre ellas en pacientes con LMA menores de 65 años.	5
Figura 2. Cronología de las alteraciones genéticas en la LMA.	6
Figura 3. Modelo de adquisición secuencial de lesiones en la LMA.	6
Figura 4. Representación esquemática de ocho vías funcionales implicadas en la patogenia de la LMA.....	8
Figura 5. Ejemplo de evolución clonal en la LMA con adquisición secuencial lesiones.	9
Figura 6. Clasificación de las variantes según su significación clínica.....	26
Figura 7. Genes recurrentemente mutados en la LMA en la serie del TCGA.	27
Figura 8. SG en las diferentes categorías sugeridas en la clasificación genómica (curvas de Kaplan-Meier).	31
Figura 9. Diseño del experimento de precisión y límite de detección.....	52
Figura 10. Amplicones con profundidad media de lectura por amplicón inferior a 1000X en alguna de las dos plataformas.....	65
Figura 11. Amplicones con strand bias mayor o igual a 2X.....	65
Figura 12. Distribución de todas las mutaciones detectadas por gen y paciente.....	70
Figura 13. Posición y frecuencia de las mutaciones encontradas con el panel de NGS.	71
Figura 14. Carga mutacional por gen. VAF por gen; Mediana de blastos por gen en la serie de estudio	73
Figura 15. Número de pacientes con marcadores moleculares útiles para el diagnóstico, pronóstico o tratamiento	73
Figura 16. Pacientes asignados a cada grupo de riesgo según los criterios establecidos por la ELN 2010 y 2017.....	76
Figura 17. Asociación entre mutaciones y riesgo citogenético.....	77
Figura 18. Diagrama de circos que muestra los patrones de asociación génica en los pacientes de riesgo citogenético intermedio y la serie completa	78

Figura 19. Esquema de las relaciones de exclusión entre los genes en nuestra serie de pacientes	79
Figura 20. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción.....	84
Figura 21. SG, curva de Kaplan-Meyer.....	85
Figura 22. SG en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante.....	87
Figura 23. SLE, curva de Kaplan-Meyer.....	89
Figura 24. SLE en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante.....	91
Figura 25. IAR de la serie de estudio.	94
Figura 26. IAR en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante.....	96
Figura 27. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la SG, SLE e IAR.....	98
Figura 28. SG y SLE en función del riesgo según la clasificación citogenética.	99
Figura 29. SLE en función del riesgo según la clasificación de la ELN de 2017 (censurados y no censurados al TPH alogénico).....	100

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxirribonucleico
ADNc = Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN = Ácido ribonucleico
CALGB = *Cancer and Leukemia Group B*
CBF = *Core-binding factor*
CC = Cariotipo complejo
CHIP = Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado
CN = Cariotipo normal
CV = Coeficiente de variación
ECOG = *Eastern Cooperative Oncology Group*
ELN = *European Leukemia Net*
EMR = Enfermedad mínima residual
FAB = Franco-Americano-Británica
FDA = *Food and Drug Administration, US*
FISH = Hibridación in situ fluorescente
FN = Falso negativo
FP = Falso positivo
GO = Gentuzumab ozogamicin
IA = Incidencia acumulada
IAR = Incidencia acumulada de recaída
IGV = *Integrative Genomic Viewer*
INDEL = Inserción/Delección.
Kb = Kilobases
LMA = Leucemia mieloide aguda
MAF = *Minor allele frequency*
MEGS = *More exclusive gen set*
MEGSA = *More exclusive gen set analysis*
MO = Médula ósea
MRC = *Medical Research Council*
NGS = *Next Generation Sequencing*
OMS = Organización Mundial de la Salud
pb= Pares de bases
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
RC = Remisión completa

SLE = Supervivencia libre de evento
SG = Supervivencia global
SMD = Síndrome mielodisplásico
SNP = *Single nucleotide polymorphism*
SNV = *Single nucleotide variation*
SP = Sangre periférica
SWOG = *Southwest Oncology Group*
TCGA = *The Cancer Genome Atlas*
TPH = Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VAF = *Variant allele frequency*
VN = Verdadero negativo
VP = Verdadero positivo

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Leucemia mieloide aguda (LMA)

1.1.1. Definición

La LMA es una neoplasia clonal de las células progenitoras mieloides de la médula ósea (MO) en la que existe un trastorno grave del equilibrio proliferación/diferenciación, de tal manera que las células afectas conservan su capacidad de autorenovación y proliferación, sin embargo, son incapaces de diferenciarse a estadios más avanzados de la maduración mieloide. Esto conlleva una acumulación de células inmaduras (blastos) en la MO que desplazan a los componentes de otras líneas hematopoyéticas (serie eritroide, megacariocítica, linfoide) dando lugar a una insuficiencia de la MO. Además, los blastos pueden infiltrar otros órganos y tejidos, siendo frecuente su presencia en sangre periférica (SP) (Frohling *et al*, 2005, Estey & Dohner, 2006).

1.1.2. Epidemiología

La LMA es una enfermedad infrecuente, su incidencia se estima en 3 casos por 100.000 habitantes/año. Su incidencia aumenta con la edad, siendo la mediana de presentación a los 65 años y alcanzando una incidencia de aproximadamente 12 casos por 100.000 habitantes año por encima de esa edad. En los adultos representa el 30% de las leucemias y el 85% de las leucemias agudas. La LMA es la causa del 1,2% de la mortalidad global por cáncer (Siegel *et al*, 2017).

1.1.3. Etiología

La etiología de la enfermedad es desconocida, aunque se han descrito factores predisponentes o agentes potencialmente leucemógenos:

- Otras enfermedades hematológicas como síndromes mielodisplásicos (SMD), síndromes mieloproliferativos crónicos o anemia aplásica;
- Exposición a radiaciones ionizantes (Finch, 2007);
- Carcinógenos ambientales o productos químicos (bencenos, disolventes) (Lan *et al*, 2004, Larson, 2007);
- Tratamientos previos con quimioterapia (agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasas, epipodofilotoxinas u otros citostáticos), u otros fármacos

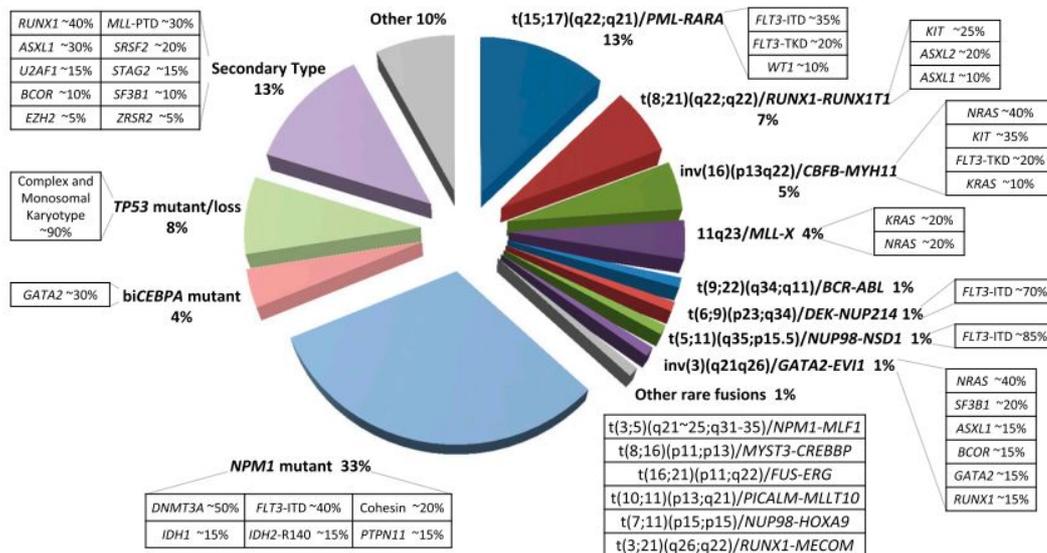
- (cloranfenicol, fenilbutazona, inmunomoduladores o inmunosupresores (Andersen *et al*, 1998, Pedersen-Bjergaard *et al*, 2000, Krishnan *et al*, 2000);
- Componente hereditario. La LMA se ha descrito con mayor frecuencia en pacientes con anomalías cromosómicas congénitas como el síndrome de Down (Hasle *et al*, 2000). Por otro lado, se han publicado casos familiares de leucemia y una mayor incidencia entre gemelos univitelinos (Higgins *et al*, 2001). Por último, algunas neoplasias mieloides se asocian a mutaciones germinales, hereditarias o adquiridas, tal y como queda recogido en la reciente clasificación de la OMS 2017. Pueden englobarse dentro de síndromes hereditarios bien definidos con expresión multiorgánica desde la infancia (disqueratosis congénita, anemia de Fanconi) (Taylor, 2001) o bien presentarse como una patología neoplásica mieloide aislada o asociada a disfunción plaquetar. Se trata de entidades infrecuentes en las que los genes más frecuentemente mutados son *CEBPA* o *RUNX1* aunque se han descrito otras alteraciones en muchos otros como *DDX41*, *ETV6* o *GATA2* (Czuchlewski & Peterson, 2016).

Sin embargo, la mayoría de los casos aparecen *de novo*, es decir, sin una asociación directa con ningún agente etiológico conocido.

1.1.4. Patogenia

La acumulación de alteraciones somáticas en genes clave pertenecientes a vías funcionales relacionadas con la proliferación, diferenciación y supervivencia celular constituye el origen de la LMA (Figura 1) (Grimwade *et al*, 2016). A la luz de los hallazgos moleculares de los últimos años, la génesis de la LMA se trata de un proceso complejo y dinámico que se encuentra en la actualidad en continua revisión y cuyos mecanismos profundos aún no se conocen en su totalidad. La gran heterogeneidad individual en la LMA hace que cada paciente muestre un espectro mutacional único. La presencia de alteraciones preleucémicas, la adquisición progresiva de nuevos cambios genéticos desarrolladores de la enfermedad y un patrón evolutivo heterogéneo constituyen sus características principales (Bullinger *et al*, 2017).

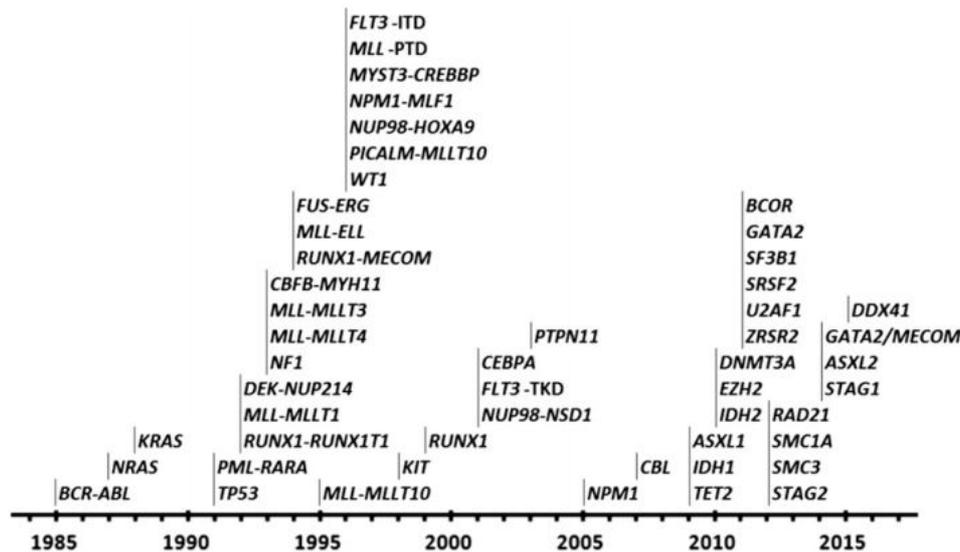
Figura 1. Distribución de las alteraciones genéticas y asociaciones entre ellas en pacientes con LMA menores de 65 años (Grimwade *et al*, 2016).



1.1.4.1 Alteraciones genéticas y vías funcionales implicadas

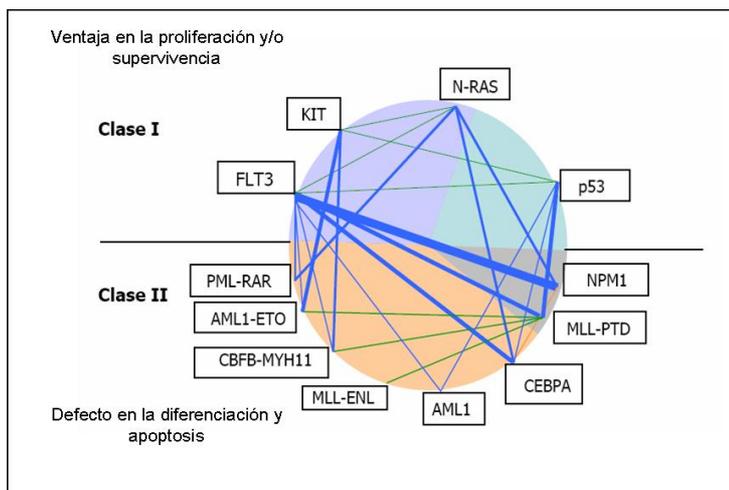
Los eventos genéticos relacionados con la patología mielóide se describieron por primera vez en la década de los 60, con la detección de las primeras anomalías citogenéticas. Desde entonces, se han descrito numerosas aberraciones del cariotipo en pacientes con LMA, la mayoría de ellas recurrentes (Grimwade *et al*, 1998). Aun así, aproximadamente la mitad de los casos presentan un cariotipo normal (CN) por técnicas de citogenética convencional (Byrd *et al*, 2002, Grimwade *et al*, 2010, Slovak *et al*, 2000). Paralelamente al desarrollo de las técnicas de biología molecular, se describieron las primeras alteraciones moleculares en la LMA (Figura 2), especialmente prevalentes en los pacientes de CN. Se observaron numerosos genes mutados (*NRAS*, *KRAS*, *TP53*, *ASXL1*, *RUNX1*, *KIT*) (Patel *et al*, 2012), constituyendo un hito por su frecuencia e implicación pronóstica las mutaciones en *FLT3* (Kottaridis *et al*, 2001, Yamamoto *et al*, 2001), las mutaciones en *CEBPA* (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S. *et al*, 2003, Lin, L. I. *et al*, 2005) y las inserciones en el exón 12 del gen *NPM1* (Falini *et al*, 2005). Además de un papel en la patogenia de la enfermedad, las alteraciones genéticas tienen implicaciones diagnósticas y pronósticas ya que son la base de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de los algoritmos de estratificación del riesgo, como se detallará más adelante.

Figura 2. Cronología de las alteraciones genéticas en la LMA (Grimwade *et al*, 2016).



El modelo del doble hit o adquisición secuencial de lesiones desarrollado en 2002 (Kelly & Gilliland, 2002) dividía las alteraciones genéticas de la LMA en tipo I, que confieren una ventaja proliferativa (activación de vías de señalización), y tipo II, que producen un bloqueo de la diferenciación (factores de transcripción), siendo necesaria la presencia de ambos tipos de lesiones para el desarrollo de la enfermedad (Figura 3).

Figura 3. Modelo de adquisición secuencial de lesiones en la LMA.

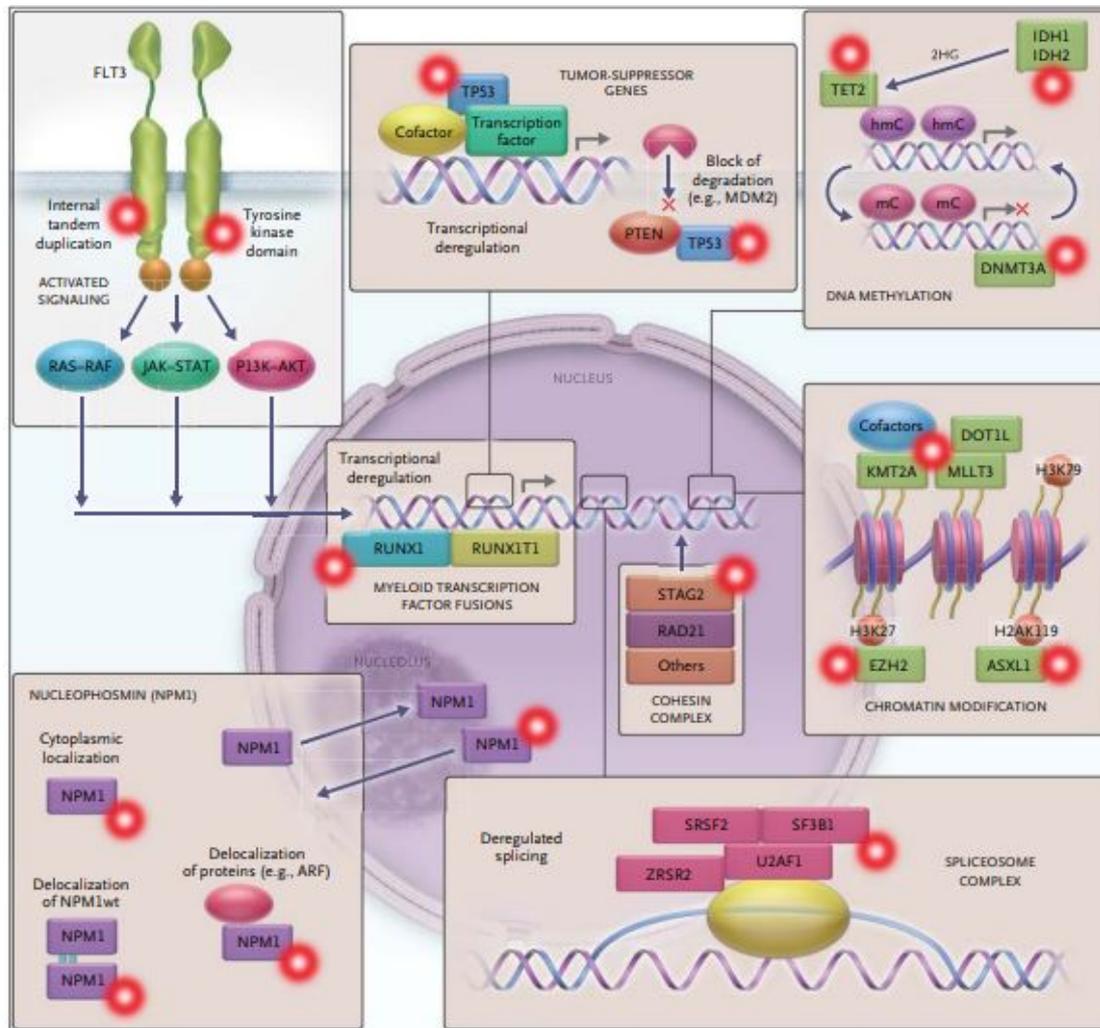


La base del modelo, la adquisición secuencial de lesiones, continúa vigente, sin embargo, el alcance de esta teoría se ha visto desbordado por la diversidad del espectro mutacional de la LMA. La heterogeneidad genética de la LMA, que ya se esbozaba con la descripción de múltiples alteraciones moleculares por técnicas convencionales de biología molecular, se incrementó con el desarrollo de las técnicas de *next generation sequencing* (NGS) que han conllevado un avance exponencial en el conocimiento de los genes y vías funcionales involucradas en la LMA, así como de las complejas relaciones entre ellas (Dohner, H. *et al*, 2015). La clasificación funcional de las alteraciones genéticas implicadas en la patogenia de la enfermedad se ha ampliado a nueve grupos (Tabla 1, Figura 4). Se han descrito patrones de interacciones no aleatorios, de tal manera, que las lesiones pertenecientes a distintas vías funcionales cooperan y se asocian en el desarrollo de la enfermedad mientras que las alteraciones relacionadas con una misma función celular son excluyentes entre sí (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Tabla 1. Categorías funcionales propuestas por el TCGA, genes pertenecientes y frecuencia en la LMA *de novo*.

Categoría funcional	Genes implicados	Frecuencia (%)
Genes de fusión de factores de transcripción	<i>PML-RARA; CBFβ- MYH11; RUNX1-RUNX1T1; PICALM-MLLT10</i>	18
<i>NPM1</i>	<i>NPM1</i>	27
Genes supresores de tumores	<i>TP53, WT1, PHF6</i>	16
Genes relacionados con la metilación del ADN	<i>DNMT3A, DNMT3B, DNMT1, TET1, TET2, IDH1, IDH2</i>	44
Genes activadores de señales	<i>FLT3, KIT</i> , otras tirosin-kinasas, serin-treonin-kinasas, <i>KRAS/NRAS, PTPs</i>	59
Genes de factores de transcripción mieloides	<i>RUNX1, CEBPA</i> , otros	30
Genes modificadores de cromatina	Fusiones <i>MLL-X, MLL-PTD, NUP98-NSD1, ASXL1, EZH2, KDM6A</i> , otros	22
Genes del complejo cohesina	<i>SMC1A, SMC3, SMC5, STAG2, RAD21</i>	13
Genes del spliceosoma	<i>U2AF1, SRSF2, SRSF6, U2AF2, SF3B1, HNRNPK</i> , otros	14

Figura 4. Representación esquemática de ocho vías funcionales implicadas en la patogénesis de la LMA (Dohner, H. *et al*, 2015)



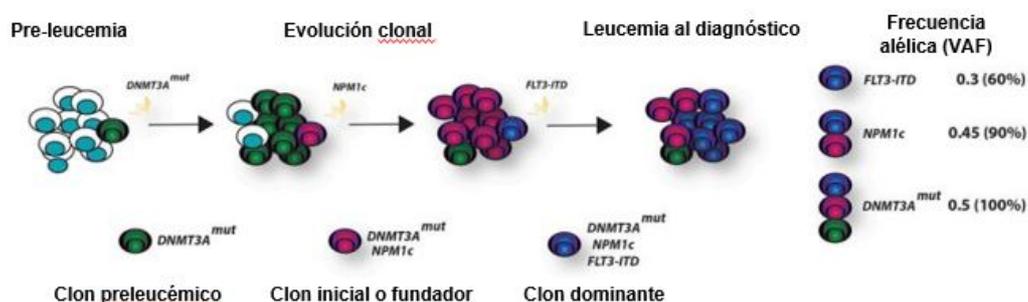
1.1.4.2 Hematopoyesis clonal

La presencia de mutaciones preleucémicas o hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) relacionadas con la edad ha sido descrita en un porcentaje de individuos sanos. Estas alteraciones moleculares confieren un riesgo aumentado de desarrollar patologías malignas mieloides (SMD o LMA, entre otros) con una tasa de evolución a enfermedad de un 0,5-1% anual. Los genes involucrados en este estado preleucémico son principalmente los relacionados con cambios epigenéticos (metilación ADN, modificadores de la cromatina) y los genes del spliceosoma en menor frecuencia (Genovese *et al*, 2014, Jaiswal *et al*, 2014).

1.1.4.3 Evolución clonal

La adquisición progresiva de las alteraciones genéticas da lugar al fenotipo leucémico y genera un clon principal que se caracteriza por una ventaja proliferativa y una inestabilidad genética que conduce a la génesis de nuevas mutaciones dando lugar a subclones leucémicos. Los estudios de NGS han permitido determinar la arquitectura clonal de la LMA, identificándose un clon principal o fundador y al menos un subclon en más de la mitad de los pacientes con LMA *de novo*. Mediante el análisis de la frecuencia alélica de la variante (VAF) se puede inferir que mutaciones han sido adquiridas precozmente y cuáles han surgido con posterioridad en el proceso evolutivo (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013, Papaemmanuil *et al*, 2016). En concordancia con los estudios poblacionales que describen la CHIP, en los pacientes con LMA se ha observado que los genes relacionados con las alteraciones epigenéticas (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) presentan una VAF elevada. Esto sugiere una adquisición precoz de estas mutaciones en la leucemogénesis. Estas alteraciones moleculares afectan a las células multipotenciales de la MO y se ha observado que pueden persistir en la remisión postratamiento constituyendo una potencial fuente de inestabilidad genómica que puede dar lugar a recaídas de la enfermedad. Los eventos relacionados con alteraciones en vías de señalización (*FLT3*) o en genes como *NPM1* son adquiridos a continuación (Figura 5) (Corces-Zimmerman *et al*, 2014, Jan *et al*, 2012).

Figura 5. Ejemplo de evolución clonal en la LMA con adquisición secuencial lesiones.



La importancia de la detección y caracterización los clones y subclones reside en los patrones observados en resistencia y recaída. Se han objetivado casos en los que el clon principal continúa predominando, casos en los que uno o varios subclones se han expandido y casos en los que aparecen nuevos clones no presentes (o no detectables) al diagnóstico (Ding *et al*, 2012, Welch *et al*, 2012, Shlush *et al*, 2014). La

heterogeneidad es, de nuevo, la característica principal de la evolución clonal. La adquisición de cambios genéticos puede producirse de manera natural en el desarrollo de la enfermedad o estar relacionadas con el tratamiento antileucémico, sin embargo, los mecanismos que conducen a un patrón evolutivo concreto son aún desconocidos.

1.1.5. Clasificación

Durante muchos años el examen mediante microscopía óptica constituía la única herramienta disponible para el diagnóstico de LMA. La primera clasificación, que data del año 1976, fue propuesta por el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) (Bennett *et al*, 1976), divide LMA en diferentes categorías en función de criterios citomorfológicos y fue revisada posteriormente en el año 1985 (Tabla 2) (Bennett *et al*, 1985).

Tabla 2. Clasificación de la LMA (FAB).

Clasificación FAB	Denominación	Frecuencia	Características morfológicas
M0	Indiferenciada	3	Blastos MPO+ <3%, diferenciación mieloide por IF
M1	Sin maduración	15-20	Blastos MPO+ ≥3%, blastos tipo I (sin maduración)
M2	Con maduración	25-30	Blastos MPO+ ≥3%, Blastos con granulación ≥10%, bastones de Auer frecuentes. Blastos 30-89%.
M3	Promielocítica	5-10	MPO fuertemente positiva. >30% promielocitos atípicos, numerosos bastones de Auer, formas en empalizada.
M4	Mielomonocítica	25-30	Blastos mieloides >30%; Monoblastos >20%; células monocitoides atípicas (esterasas inespecíficas +). Si eosinofilia en MO: variedad M4Eo.
M5	Monoblástica	2-10	>80% de infiltración por blastos monocitarios (monoblastos: M5a o promonocitos M5b) esterazas +. Mieloblastos <30%.
M6	Eritroide	3-5	Eritroblastos en MO > 50% de la CTA. Blastos en MO ≥30% de la CNE.
M7	Megacariocítica	3-12	Blastos >30%. Megacarioblastos por IF (CD41, CD61). Frecuente mielofibrosis

La clasificación FAB, de gran utilidad durante casi tres décadas resulta insuficiente en la actualidad ya que no recoge con precisión la heterogeneidad de la enfermedad y los subgrupos carecen de implicaciones pronósticas. A raíz de los

hallazgos en los campos de la citometría de flujo (Knapp *et al*, 1994) y la citogenética (Grimwade *et al*, 1998), se plantea la necesidad de actualizar la clasificación incluyendo estos parámetros. Esta idea se materializa en la “Clasificación de las neoplasias hematopoyéticas y de los tejidos linfoides” publicada en el año 2001 por la OMS que se basa en las alteraciones genéticas como criterio principal para establecer los subgrupos. Esta clasificación fue revisada en el año 2008 (Swerdlow *et al*, 2008) incluyendo criterios moleculares y nuevas categorías diagnósticas, y ha sido actualizada en 2017 (Swerdlow *et al*, 2017), siendo esta última versión la vigente en el momento actual (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de la LMA y neoplasias relacionadas (OMS 2017).

Leucemia mieloide aguda y neoplasias relacionadas
Leucemia mieloide aguda con alteraciones genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LPA con <i>PML-RARA</i>
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
LMA con t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Entidad provisional: LMA con <i>BCR-ABL1</i>
LMA con <i>NPM1</i> mutado
LMA con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i>
Entidad provisional: LMA con <i>RUNX1</i> mutado
Leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con la mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia
Leucemia mieloide aguda, no especificada (NOS)
LMA con mínima diferenciación
LMA sin maduración
LMA con maduración
Leucemia aguda mielomonocítica
Leucemia aguda monoblástica/monocítica
Leucemia eritroide pura
Leucemia aguda megacarioblástica
Leucemia aguda basofílica
Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide
Proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down
Mielopoyesis anormal transitoria
Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down

1.1.6. Diagnóstico

En la actualidad, un adecuado proceso diagnóstico se basa en la integración de los hallazgos obtenidos por diferentes técnicas que incluyen la citomorfología, la citometría de flujo, la citogenética y la biología molecular (Dohner, H. *et al*, 2017).

1.1.6.1 Citomorfología

La presencia de al menos un 20% de blastos en MO o SP por examen citomorfológico es el criterio definitorio de leucemia aguda, a excepción de los casos de leucemia promielocítica aguda o con translocaciones que impliquen genes relativos al core binding factor (CBF) en los que no es necesario alcanzar el umbral del 20% para ser considerados leucemia aguda. La tinción de May-Grünwald-Giemsa es la más empleada para el diagnóstico citomorfológico. En el caso de leucemias agudas con componente monocítico, el recuento de blastos debe incluir los mieloblastos, los monoblastos y los promonocitos.

1.1.6.2 Inmunofenotipo

Para la asignación de línea (mieloide o linfoide) se pueden emplear técnicas de citoquímica (peroxidasa, Sudán B) o de citometría de flujo, considerándose esta última de elección en la actualidad. Además de la determinación de línea, la citometría de flujo permite determinar el inmunofenotipo detallado de la leucemia, las aberraciones respecto a los patrones de maduración normales, así como el origen celular de la célula proliferante (mieloide, monocítica, eritroide o megacariocítica). Los marcadores de mayor utilidad se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Marcadores celulares de membrana y citoplasmáticos útiles en el diagnóstico de la LMA (Dohner, H. *et al*, 2017)

Compartimento celular	Marcadores
Precursores	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Marcadores granulocíticos	CD65, MPO citoplasmática
Marcadores monocíticos	CD14, CD36, CD64
Marcadores megacariocíticos	CD41, CD61
Marcadores eritroides	CD235a (Glicoforina A), CD36

1.1.6.3 Citogenética

El estudio por citogenética convencional se considera imprescindible en el diagnóstico de la LMA. La presencia de alteraciones recurrentes en el cariotipo es definitoria de numerosas categorías de la clasificación OMS, con implicaciones pronósticas en la mayoría de los casos. Las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) no deben sustituir al cariotipo convencional ya que están dirigidas únicamente a alteraciones concretas y no aportan una visión global del mapa genético, sin embargo, resultan de utilidad si el cariotipo no es valorable.

1.1.6.4 Biología Molecular

Por último, se deben investigar siempre las mutaciones en diversos genes por sus implicaciones diagnósticas: *NPM1*, *CEBPA* y *RUNX1*; pronósticas: *TP53*, *ASXL1*, *FLT3-ITD* y ratio ITD en los casos positivos, o terapéuticas: *FLT3*, *IDH1* e *IDH2*.

1.1.7. Factores Pronóstico

Los factores pronóstico descritos en la LMA se pueden dividir factores pre-tratamiento, entre los que se diferencian factores clínicos y genéticos; y factores post-tratamiento, derivados de la respuesta obtenida a la terapia de primera línea. Nos referiremos a continuación a los factores de riesgo definidos en pacientes candidatos a tratamiento intensivo, por lo tanto, con objetivo curativo.

1.1.7.1 Factores pre-tratamiento

1.1.7.1.1 Factores clínicos

La edad, el estado funcional al diagnóstico, el antecedente de enfermedad tumoral o hematológica maligna y la hiperleucocitosis se han relacionado con el pronóstico de los pacientes con LMA (Dohner, H. *et al*, 2017).

A mayor edad, el pronóstico de la LMA es peor tanto en términos de mortalidad relacionada con el tratamiento y respuesta al mismo, como en términos de supervivencia y recaída. Los pacientes mayores de 55 años asocian también un mayor número y gravedad de comorbilidades que constituye un factor adverso en la respuesta al tratamiento por mortalidad en la inducción (Appelbaum *et al*, 2006). Es más, algunas de las alteraciones genéticas que conllevan un peor pronóstico (*ASXL1*, *RUNX1*) se asocian con mayor frecuencia a pacientes mayores (Tsai *et al*, 2016).

El antecedente de exposición a fármacos citotóxicos, radioterapia o LMA secundaria a otras enfermedades hematológicas se asocia consistentemente con resistencia a la terapia y un pronóstico adverso en cuanto a supervivencia (Kayser *et al*, 2011).

Algunas series han descrito la presencia de hiperleucocitosis como factor de mal pronóstico, sin embargo, hay discrepancia en cuanto al recuento leucocitario que debe considerarse como umbral para definirla.

1.1.7.1.2 Factores genéticos

1.1.7.1.2.1 Alteraciones citogenéticas

Las alteraciones citogenéticas muestran una influencia pronóstica que permite dividir a los pacientes con LMA en tres grupos de riesgo: favorable, intermedio y adverso. Varios grupos cooperativos (SWOG, MRC, CALGB) han establecido algoritmos de predicción del riesgo en cohortes incluidas en estudios prospectivos (Grimwade *et al*, 1998, Slovak *et al*, 2000, Byrd *et al*, 2002, Grimwade *et al*, 2010). La propuesta más reciente del MRC (Grimwade *et al*, 2010) se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Grupos de riesgo citogenético según MRC revisado. *Otras alteraciones citogenéticas numéricas o estructurales no descritas en los grupos de riesgo favorable o desfavorable.

Grupo de riesgo	Cariotipo
Favorable	t(15,17)(q22;q12), t(8,21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16,16)(p13.1;q22)
Intermedio	Cariotipo normal, otras alteraciones*
Adverso	> 3 alteraciones citogenéticas, abn(3q) (excepto t(3;5)(q25;q34)), inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26), add(5q)/del(5q), -5, add(7q)/del(7q), -7, t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p11_13;q23), otras t(11q23) (excepto t(9;11)(p21_22;q23) y t(11;19)(q23;p13)) t(9;22)(q34;q11), -17 y abn(17p).

De especial relevancia pronóstica por su asociación a la resistencia a la inducción y a las recaídas, es el cariotipo de riesgo adverso y el cariotipo monosómico (CM), definido este último como la presencia de dos o más monosomías o bien una monosomía y otra alteración citogenética.

1.1.7.1.2.2 Alteraciones moleculares

El grupo de riesgo intermedio definido por criterios citogenéticos, que constituye aproximadamente la mitad de los casos, presenta un pronóstico heterogéneo que sugiere la presencia de otros factores adicionales no detectables mediante cariotipo convencional. De hecho, las alteraciones moleculares presentan un especial impacto pronóstico en este subgrupo de pacientes, en concreto en aquellos que presentan un CN. Por su relevancia pronóstica cabe destacar las siguientes mutaciones:

- **FLT3**: Las duplicaciones internas en tándem en el gen *FLT3* (*FLT3-ITD*) se asocian a CN y se correlacionan con resistencia a la inducción, recaída y menor supervivencia (Whitman *et al*, 2001, Thiede *et al*, 2002, Schlenk *et al*, 2008). Es relevante también el ratio de ITD (mutado/no mutado), ya que ratios bajos no parecen conllevar este pronóstico adverso (Gale *et al*, 2008, Pratcorona *et al*, 2013, Schlenk *et al*, 2014). Existe controversia en cuanto al umbral que separa bajo ratio y alto ratio, aunque las recomendaciones actuales sugieren que ratios inferiores a 0,5 no asocian peores resultados (Dohner, H. *et al*, 2017). Por el contrario, las mutaciones puntuales del dominio tirosin-kinasa (*FLT3-TKD*) no presentan implicaciones claras, siendo su valor pronóstico controvertido (Yanada *et al*, 2005, Mead *et al*, 2007, Whitman *et al*, 2008).
- **NPM1 y CEBPA**: Las mutaciones en *NPM1* (Thiede *et al*, 2002, Dohner, K. *et al*, 2005) y las mutaciones bialélicas en *CEBPA* (Lin, L. I. *et al*, 2005, Wouters *et al*, 2009) en ausencia de *FLT3-ITD* o bajo ratio, se asocian con mejor pronóstico.
- **RUNX1 y ASXL1**: Recientemente se ha descrito que las mutaciones en *RUNX1* y *ASXL1* se relacionan con un pronóstico independiente desfavorable, en especial cuando coexisten ambas mutaciones (Gaidzik *et al*, 2011, Paschka *et al*, 2015, Papaemmanuil *et al*, 2016).
- **TP53**: Las mutaciones en *TP53* se asocian a cariotipo complejo (CC) o monosómico y confieren un peor pronóstico (Haferlach *et al*, 2008), notablemente inferior en presencia de ambas alteraciones (molecular y citogenética) (Bowen, D. *et al*, 2009, Papaemmanuil *et al*, 2016).
- **KIT**: Por último, dentro del subgrupo de pacientes de citogenética favorable, las mutaciones en *KIT* se han relacionado con un peor pronóstico (Boissel *et al*, 2006).

1.1.7.1.2.3 Clasificación del riesgo genético de la European Leukemia Net (ELN)

El algoritmo de estratificación del riesgo propuesto por la ELN en 2017 clasifica a los pacientes en tres grupos (favorable, intermedio y adverso) teniendo en cuenta las alteraciones citogenéticas y moleculares que han demostrado impacto pronóstico (Tabla 6) (Dohner, H. *et al*, 2017).

Tabla 6. Estratificación del riesgo genético según la ELN 2017. ¹ ratio alélico de *FLT3*-ITD bajo (<0,5); ratio alélico de *FLT3*-ITD alto (≥0,5). ² Tres o más alteraciones cromosómicas no relacionadas en ausencia de las alteraciones citogenéticas recurrentes o inversiones descritas por la OMS tales como, t(8;21), *inv*(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), *inv*(3) o t(3;3); AML con *BCR-ABL1*. ³ Presencia de una monosomía (excepto la pérdida de uno de los cromosomas sexuales) asociada con una monosomía adicional o una alteración cromosómica estructural, excluyendo las LMA-CBF. ⁴ No emplearse como marcador aislado si van asociadas a alteraciones de buen pronóstico.

Grupos de riesgo	Alteraciones genéticas
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> <i>inv</i> (16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3</i> -ITD o con <i>FLT3</i> -ITD con ratio bajo ¹ <i>CEBPA</i> bialélico
Intermedio	<i>NPM1</i> mutado con <i>FLT3</i> -ITD con ratio alto ¹ <i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3</i> -ITD o con <i>FLT3</i> -ITD con ratio bajo ¹ t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> Otras alteraciones citogenéticas no consideradas favorables o adversas
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> reordenado t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> <i>inv</i> (3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> Monosomía 5 o del(5q); monosomía 7; monosomía 17/alteraciones(17p) Cariotipo complejo ² ; Cariotipo monosómico ³ <i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3</i> -ITD con ratio alto ¹ <i>RUNX1</i> mutado ⁴ <i>ASXL1</i> mutado ⁴ <i>TP53</i> mutado

1.1.7.2 Factores post-tratamiento

1.1.7.2.1 Respuesta a la inducción

Los pacientes no respondedores al tratamiento de inducción presentan una supervivencia inferior a aquellos que alcanzan remisión completa (RC) morfológica.

1.1.7.2.2 Enfermedad mínima residual (EMR)

Se ha demostrado que la presencia de enfermedad leucémica no detectable mediante microscopía óptica constituye un factor de riesgo independiente (Buccisano *et al*, 2010). La carga tumoral es también relevante en términos pronósticos, de tal manera, que a mayor EMR, menor supervivencia. La EMR es especialmente útil como predictor de la recaída leucémica. La detección de una EMR positiva en pacientes previamente negativos o una EMR creciente conduce en el 100% de los casos a una recaída franca. La EMR puede valorarse tras la inducción o tras la consolidación mediante citometría de flujo o biología molecular en aproximadamente un 90% y un 60% de los pacientes con LMA, respectivamente (Terwijn *et al*, 2013, Schnittger *et al*, 2009). Las nuevas técnicas de secuenciación masiva son una estrategia prometedora para la detección de la EMR, por su elevada sensibilidad y por la posibilidad de evaluar un gran número de genes en un único experimento (Grimwade & Freeman, 2014).

1.1.8. Clínica

Las manifestaciones clínicas de la LMA son también heterogéneas y en la mayoría de los casos inespecíficas. Derivan de la insuficiencia medular y de la afectación de otros órganos y tejidos por la infiltración leucémica. Las más frecuentes son las originadas por la infiltración medular: anemia, neutropenia y trombopenia. La afectación extramedular (bazo, hígado, piel y mucosas, sistema nervioso central...) se relaciona especialmente con el componente monocítico (M4 o M5, FAB). La hiperleucocitosis extrema ($>100 \times 10^9/L$) se puede manifestar clínicamente como leucostasis, que afecta principalmente al tejido cerebral (cefalea, alteración del nivel de consciencia) y pulmonar (insuficiencia respiratoria con infiltrados intersticiales bilaterales). Además, la LMA puede cursar con alteraciones de la coagulación (diátesis hemorrágica, trombótica o coagulación intravascular diseminada) y se puede acompañar al diagnóstico o al inicio del tratamiento del síndrome de lisis tumoral biológico o clínico (hiperuricemia, alteraciones hidroelectrolíticas como hipocalcemia y/o hiperpotasemia, acidosis metabólica e insuficiencia renal obstructiva con oligoanuria en casos severos).

1.1.9. Tratamiento de LMA

El primer paso en el tratamiento de la LMA consiste en determinar si el paciente es candidato a tratamiento intensivo con objetivo curativo. En general los pacientes jóvenes (<65 años) y sin comorbilidades relevantes se consideran aptos para recibir tratamiento de alta intensidad. Sin embargo, la edad no debe ser un criterio excluyente a la hora de iniciar un tratamiento intensivo ya que pacientes mayores de 65 años con un buen estado clínico, sin comorbilidades y sin factores genéticos desfavorables también podrían beneficiarse del mismo, por lo tanto, la decisión debe individualizarse. Por el contrario, en los pacientes mayores con comorbilidades y/o factores de riesgo genéticos desfavorables el riesgo supera al beneficio y se deben considerar estrategias alternativas encaminadas a aumentar la supervivencia (Dohner, H. *et al*, 2017).

Todos los pacientes incluidos en este estudio recibieron tratamiento con intención curativa, por lo que en este trabajo detallaremos principalmente esta opción terapéutica.

1.1.9.1 Tratamiento intensivo de primera línea

El tratamiento estándar de la LMA se basa en la quimioterapia. El objetivo del tratamiento es alcanzar una respuesta morfológica completa y eliminar la enfermedad residual. Se administra en primer lugar un ciclo de inducción que debe incluir antraciclinas (daunorrubicina o idarrubicina) y citarabina, siendo los esquemas 3+7 los más empleados, alcanzando RC en un 60%-80% de los pacientes jóvenes. Tras la inducción, se administran varios ciclos de consolidación que pueden repetir la misma combinación empleada en la inducción, incluir citarabina a altas dosis u otros fármacos como el mitoxantrone. Actualmente, se dispone de la presentación dual liposomal de citarabina y daunorrubicina (CPX-351) en base a un ensayo clínico fase 3 que mostró un incremento de la tasa de RC y mayor SG en pacientes de 60 a 75 años con LMA secundaria a terapia o LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia (Lancet *et al*, 2018).

La consolidación puede seguirse de una intensificación con trasplante autólogo o alogénico de progenitores hematopoyéticos tras valoración individual del riesgo genético, la presencia de EMR tras la inducción, estado general del paciente y disponibilidad de donante. El empleo de trasplante autólogo es controvertido ya que no se ha demostrado superioridad frente al empleo de quimioterapia en términos de supervivencia global (SG), aunque algunos estudios sugieren una mayor supervivencia libre de evento (SLE) y supervivencia libre de recaída en los pacientes de riesgo bajo e

intermedio según la ELN 2010 (Vellenga *et al*, 2011, Pffirmann *et al*, 2012). Por ello, se considera una opción clínica en pacientes de bajo riesgo en primera RC y en pacientes de riesgo intermedio sin donante emparentado HLA-idéntico (Duarte *et al*, 2019).

El trasplante alogénico aumenta el potencial antileucémico del tratamiento gracias al efecto injerto contra leucemia. Sin embargo, las complicaciones derivadas del trasplante alogénico son múltiples y asocian una elevada mortalidad, destacando la inmunosupresión prolongada con el subsecuente riesgo de infecciones potencialmente mortales y la enfermedad injerto contra hésped. Por ello, el riesgo-beneficio debe de ser cuidadosamente valorado, de tal manera que, en primera RC el trasplante alogénico no se recomienda en pacientes de bajo riesgo mientras que todos los pacientes de alto riesgo aptos para el procedimiento deben recibir un alotrasplante. En los pacientes de riesgo intermedio el trasplante alogénico debe ser la primera opción si existe un donante familiar histocompatible y considerarse individualmente en caso contrario. En los pacientes que por edad o comorbilidades el riesgo de un trasplante alogénico mieloablatoivo no sea asumible, se puede considerar un trasplante alogénico de intensidad reducida que conserva el efecto injerto contra leucemia con una mortalidad relacionada con el trasplante inferior (Dohner, H. *et al*, 2017, Duarte *et al*, 2019).

1.1.9.2 Tratamiento intensivo en recaída o resistentes

Tras la recaída o en pacientes resistentes a la inducción, se emplean esquemas de rescate de quimioterapia, sin que exista un estándar establecido. Por ello, siempre se debe considerar la inclusión de los pacientes en ensayos clínicos. Si se consigue alcanzar una RC, el trasplante alógeno está indicado en todos los casos en los que el paciente sea elegible para el procedimiento (Duarte *et al*, 2019).

1.1.9.3 Terapias dirigidas y opciones de futuro

Entre los fármacos dirigidos a dianas fenotípicas, para la LMA se dispone de gentuzumab ozogamicin (GO). Se trata de un anti-CD33 autorizado actualmente para la LMA *de novo* con positividad para dicho marcador. GO fue aprobado en 2010 para pacientes con LMA refractaria o en recaída, pero se retiró en 2010 a consecuencia de una elevada toxicidad. Sin embargo, los resultados de un meta-análisis reciente indican una menor tasa de recaídas y una ventaja en la SG con el empleo de GO en combinación con QT, lo que ha llevado a su re-autorización. El análisis por subgrupos de riesgo citogenético demuestra un beneficio en el tratamiento de la en la LMA con citogenética favorable o de riesgo intermedio, siendo más evidente en los pacientes de

cariotipo de bajo riesgo. Por el contrario, no se observaron mejores resultados en el subgrupo de citogenética desfavorable (Hills *et al*, 2014).

La caracterización molecular al diagnóstico de la LMA ha permitido desarrollar terapias dirigidas a dianas terapéuticas, aunque muchas de ellas se encuentran aún en fase de investigación. Los inhibidores de *FLT3* de primera generación, que presentan una actividad anti-tirosin-kinasa amplia que puede afectar a otras dianas (*KIT* o *PDGFR*), han mostrado buenos resultados en los ensayos clínicos (Stone *et al*, 2017). Esto ha llevado a la aprobación de uno de ellos, midostaurina, en pacientes con LMA y mutaciones en *FLT3* en combinación con QT en inducción y consolidación, y como monoterapia de mantenimiento en aquellos pacientes que alcancen RC. Los inhibidores de *FLT3* de segunda generación (quizartinib, crenolanib y gilteritinib) presentan una actividad más selectiva sobre *FLT3* (Bohl *et al*, 2019). Gilteritinib ha sido autorizado recientemente por la FDA para pacientes con *FLT3* mutado en segunda línea de tratamiento.

Otros genes como *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *IDH1* o *IDH2* constituyen también dianas terapéuticas potencialmente activables. En este sentido, cabe destacar los inhibidores específicos de *IDH1* (ivosidenib) e *IDH2* (enasidenib), cuyo mecanismo de acción disminuye los niveles del oncometabolito 2-hidroxiglutarato (aumentados de manera aberrante en pacientes portadores de mutaciones en *IDH*) y por tanto, reduce la hipermetilación patológica de histonas e induce la diferenciación mieloide. Ambos fármacos en monoterapia han demostrado una tasa de respuesta cercana al 40% con beneficio en la SG en pacientes en recaída o refractarios con mutaciones en *IDH*, incluso en aquellos con VAF muy baja (DiNardo *et al*, 2018, Stein *et al*, 2019) y han sido aprobados por la FDA para pacientes con LMA en recaída o refractarios con mutaciones en *IDH1* o *IDH2* respectivamente. En combinación con QT en primera línea parecen mostrar resultados prometedores con altas tasas de respuesta y EMR negativa (Stein *et al*, 2018). Por último, ivosidenib ha sido recientemente aprobado en primera línea por la FDA en pacientes no candidatos a tratamiento curativo (≥ 75 años).

La inhibición de la vía Hedgehog (glasdegib) y la inhibición de BCL-2 (venetoclax) son objeto también de terapia dirigida en la LMA, al igual que en otros cánceres. Están implicadas en la proliferación celular y escape de la apoptosis generando resistencia a la QT, y en la regulación de la apoptosis mediada por mitocondrias, respectivamente. El empleo de glasdegib junto con Ara-C a bajas dosis ha mostrado beneficio clínico frente a Ara-C en monoterapia. Venetoclax en combinación con hipometilantes o citarabina a dosis bajas ha mostrado buenos resultados en ensayos clínicos, especialmente en pacientes de citogenética desfavorable. Ambos agentes están autorizados por la FDA

en pacientes no candidatos a QT intensiva, ≥ 75 a, en combinación con Ara-C a bajas dosis (ambos) o hipometilantes (venetoclax) (Wei *et al*, 2019, DiNardo *et al*, 2019).

Existen numerosos estudios en marcha que evalúan la combinación de nuevos fármacos con QT intensiva, con agentes hipometilantes o con QT a bajas dosis. Otras terapias en fase de experimentación como la inmunoterapia presentan resultados muy preliminares para establecer conclusiones sólidas, aunque parecen augurar resultados prometedores. Por tanto, es esperable que el arsenal terapéutico específico de diana disponible en Europa sea dinámico y se incremente en los próximos años. En este sentido y siempre que exista disponibilidad, se debe considerar la inclusión de pacientes jóvenes en ensayos clínicos con fármacos dirigidos a dianas en primera línea de tratamiento o sucesivas.

Por otro lado, algunos tratamientos no específicos de diana pueden presentar beneficios en subgrupos concretos de pacientes con LMA definidos por alteraciones moleculares concretas. Algunos estudios sugieren que los pacientes con mutaciones en los genes relacionados con la metilación como *DNMT3A* y *TET2* podrían beneficiarse de una dosis intensificada de daunorrubicina en inducción o del tratamiento con hipometilantes en combinación con quimioterapia convencional, respectivamente (Patel *et al*, 2012, Yamazaki *et al*, 2015).

1.2. Secuenciación masiva o NGS.

1.2.1. Concepto y aplicaciones

La secuenciación masiva o NGS es un método de secuenciación de ácidos nucleicos en el que se analizan en paralelo múltiples secuencias del genoma, por lo tanto, permite el análisis de numerosos genes y muestras en un único experimento.

El Proyecto Genoma Humano empleó la secuenciación masiva para obtener la primera secuencia genómica completa en el año 2003. Desde entonces, la tecnología ha evolucionado, se han multiplicado las aplicaciones de la NGS y los costes se han reducido drásticamente, de tal manera que, actualmente, la secuenciación masiva puede ser aplicable en el ámbito clínico con grandes resultados y un coste-beneficio aceptable.

La NGS se emplea en la actualidad no sólo en la secuenciación de ADN, sino también en secuenciación de ARN, estudios de expresión génica y epigenética

(metilación), biopsia líquida, tipaje HLA o análisis microbiológico (Rehm *et al*, 2013, Goodwin *et al*, 2016).

1.2.2. Tipos de secuenciación masiva

En función de la región del genoma a analizar, la secuenciación masiva puede dividirse en tres tipos: secuenciación genómica, exómica y dirigida (Rehm *et al*, 2013).

- *Secuenciación genómica completa*: la región de estudio es el genoma completo, incluyendo exones e intrones. Se obtiene una mayor información y permite detectar alteraciones desconocidas previamente. La aplicación investigacional de la secuenciación genómica ha generado grandes avances en los últimos años en la detección de nuevas mutaciones somáticas y hereditarias. Como desventajas cabe destacar el complejo análisis bioinformático posterior, la dificultad de interpretación de los datos en especial en las regiones no codificantes y un mayor coste.
- *Secuenciación exómica*: la región de estudio es el exoma (1-2% del genoma) que incluye únicamente las regiones codificantes del ADN y aproximadamente el 85% de las alteraciones causantes de enfermedades. La secuenciación exómica permite detectar nuevas variantes en genes patogénicos conocidos e identificar nuevos genes asociados a la enfermedad. Reduce los costes respecto a la secuenciación genómica y limita el estudio bioinformático posterior.
- *Secuenciación dirigida*: se estudian genes o regiones concretas de los mismos. Esta modalidad es la más adecuada para la traslación de la NGS a la práctica clínica ya que permite centrar la secuenciación en regiones genómicas de interés clínico y simplifica el análisis bioinformático e interpretación de los resultados con un menor coste. Esta aproximación consigue una mayor profundidad de lectura en las regiones de estudio y aumenta la sensibilidad analítica y especificidad.

1.2.3. Metodología de la secuenciación masiva

Las muestras deben ser procesadas previamente a proceder a la secuenciación. Este proceso varía ligeramente entre las diferentes plataformas de NGS pero precisa de unos pasos comunes (Rehm *et al*, 2013):

- Preparación de la muestra: extracción de ácidos nucleicos, generación de librerías (incluye la unión de códigos específicos de muestra y adaptadores) y enriquecimiento de las librerías (amplificación clonal).
- Secuenciación.

- Análisis bioinformático de los datos: análisis de la calidad de la secuenciación, detección de nucleótidos (*base calling*), alineamiento con la secuencia de referencia, llamada de variantes (*variant calling*) y filtrado de variantes.

1.2.4. Tecnologías y plataformas de secuenciación masiva

Existen diversas tecnologías de secuenciación que presentan diferencias en el procesamiento de las muestras y métodos de detección, lo que se refleja en unas fortalezas y debilidades en los resultados específicas para cada una (Tabla 7) (Yohe *et al*, 2015). Cada tecnología se asocia a una plataforma concreta, destacando dos de ellas:

1.2.4.1 Secuenciación por síntesis con bloqueo reversible

Se emplean nucleótidos terminadores marcados con fluoróforos. En el proceso de elongación de la cadena de ADN el nucleótido complementario correspondiente hibrida con la cadena y se produce un bloqueo reversible de la elongación. Este nucleótido unido emite una señal fluorescente que es captada por láseres. Posteriormente se libera el fluoróforo concluyendo el ciclo. De esta manera, la reacción de secuenciación continua, añadiendo en cada ronda una única base. Este proceso se realiza sobre un soporte sólido (*flow cell*) y se forman simultáneamente numerosos *cluster*. La plataforma Illumina emplea este tipo de secuenciación.

1.2.4.2 Secuenciación mediante ion semiconductor

Durante la reacción de secuenciación, se añade un único tipo de nucleótido en cada ciclo y si éste es complementario a la cadena de ADN a secuenciar, se produce la hibridación. En caso contrario, se realiza un lavado de los nucleótidos libres y se inicia un nuevo ciclo con un nucleótido diferente. Cada vez que un nucleótido complementario hibrida con la hebra de ADN se libera un proton H^+ y se modifica el pH. Los cambios de pH se detectan mediante un micropHmetro y la señal se digitaliza gracias a un chip semiconductor. Si en un ciclo se produce la hibridación de más de un nucleótido, el cambio de pH se intensifica. En función de la intensidad de señal detectada se determina el número de nucleótidos que forman la secuencia. Es la tecnología empleada por la plataforma Ion Torrent.

Tabla 7. Comparación entre las plataformas de NGS más empleadas, adaptado de (Yohe *et al*, 2015).

Plataforma	Illumina	Ion Torrent
Amplificación clonal	<i>Flow cell</i>	PCR de emulsión y microesferas
Método de detección	Fluorescencia	Cambios en pH
Longitud de las lecturas (pb)	100-300	100-400
Ventajas	Buena precisión global	Rapidez de secuenciación
Errores de secuenciación más frecuentes	Sustituciones en regiones ricas en GC	INDELs en regiones con homopolímeros (3%) Sustituciones en regiones con <i>strand-bias</i> (<0.1%)

1.2.5. Interpretación de las variantes

La clasificación de las variantes constituye un reto, en especial en los casos de secuenciación genómica o exómica. A pesar de que cada vez se dispone de herramientas de consulta más completas, el proceso no está exento de limitaciones, destacando la heterogeneidad interlaboratorio (Rehm *et al*, 2013, Yohe *et al*, 2015).

Se dispone de bases de datos públicas útiles para la interpretación de variantes somáticas:

- *Bases de datos poblacionales*: útiles para descartar polimorfismos o SNP ya que recogen los datos de frecuencia del alelo menor (MAF). Algunos ejemplos son “dbSNP”, “1000Genomes” o “Exome Variant Server”.
- *Bases de datos oncológicas*: recogen mutaciones somáticas descritas en diferentes cánceres, útiles para confirmar la naturaleza somática de las variantes. “COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer)”, “The cancer genome atlas (TCGA)”, “My cancer genome”, “Personalized cancer therapy”, “Intogen” o “IARC (WHO) TP53 mutation database” son algunas de ellas.
- *Otras bases de datos* como “ClinVar” que contiene datos de mutaciones germinales y somáticas o “Varsome” que recoge la información de numerosas bases de datos públicas.

Existen también herramientas de predicción *in silico* de patogenicidad, de especial utilidad en aquellas mutaciones no descritas o estudiadas previamente como “SIFT”, “PolyPhen2”, “MutationAssessor”, “MutationTaster”, “PROVEAN” o “Condel”.

Finalmente, se han desarrollado algoritmos de clasificación de variantes en función de su impacto clínico. Estas clasificaciones son de utilidad para la armonización de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios y homogeneización de los

informes clínicos. La categorización es dinámica, es decir, una variante concreta puede cambiar de clase en función de nuevos hallazgos, por lo que es necesario realizar actualizaciones periódicas.

En 2015, un consenso del *American College of Medical Genetics and Genomics* y la *Association for Molecular Pathology* propuso una clasificación de variantes en 5 grupos: patogénicas, probablemente patogénicas, de significado incierto, probablemente benignas y benignas, aplicable a enfermedades hereditarias. La asignación a una de las categorías se realiza tras valorar una serie de criterios de evidencia (Richards *et al*, 2015).

Tabla 8. Propuesta de clasificación de variantes somáticas (Sukhai *et al*, 2016)

Variante	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Clase 5
Reportada previamente	Sí, patogénica	Sí, patogénica	No	No	No
Accionable	En el mismo tumor/tejido	En diferente tumor/tejido	Desconocido	Desconocido	Desconocido
Otras variantes en el mismo gen accionables			En el mismo tumor/tejido	En diferente tumor/tejido	Desconocido
Efecto en algoritmos de predicción			3A: patogénico 3B: desconocido 3C:benigno	4A: patogénico 4B: desconocido 4C:benigno	

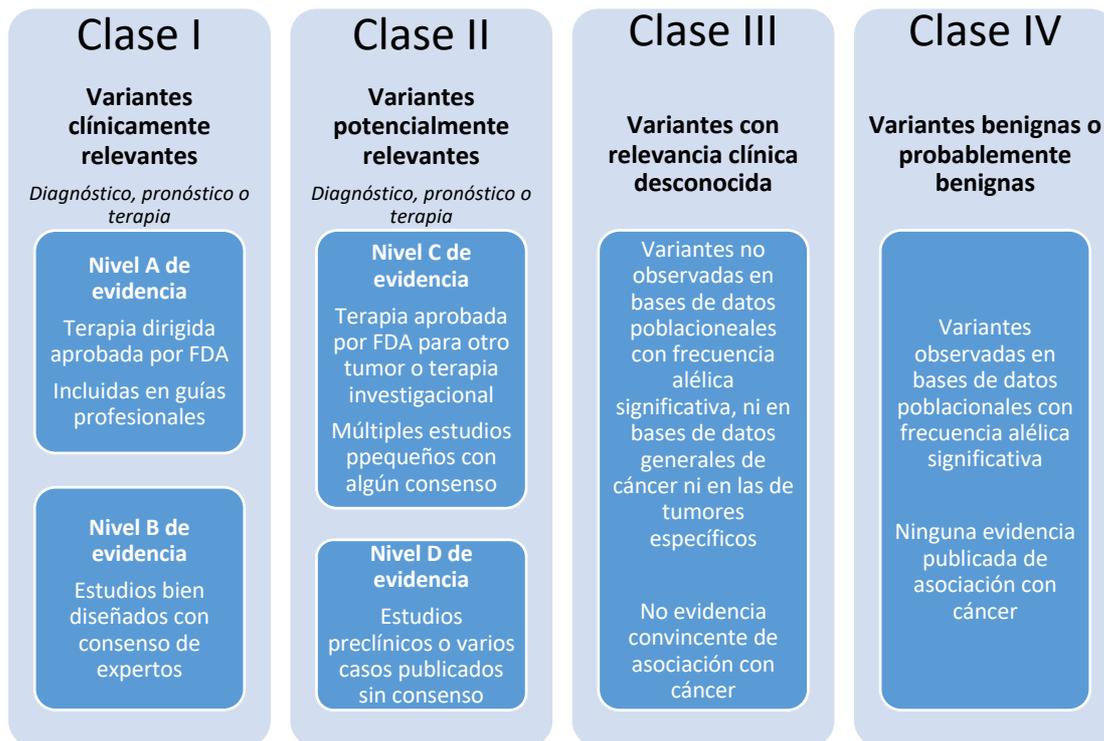
Sukhai *et al* desarrollaron el primer sistema de clasificación de variantes somáticas para lo que diseñaron un protocolo de clasificación basado en cuatro puntos (Tabla 8 (Sukhai *et al*, 2016):

- Variantes en genes descritos previamente como patogénicos o variantes que los algoritmos de predicción definen como patogénicos.
- Tipo de tumor o de tejido en el que se ha descrito la variante.
- Recurrencia de la variante.
- Variante en gen accionable en patología tumoral. La accionabilidad del gen se refiere a su utilidad clínica en términos diagnósticos, terapéuticos (diana molecular) o pronósticos.

Más recientemente, un nuevo documento de consenso de varias sociedades científicas americanas ha propuesto una clasificación aplicable a las variantes obtenidas de la secuenciación en pacientes con cáncer (Li *et al*, 2017). En este caso, las variantes

se categorizan en 4 clases: clase I: variantes clínicamente relevantes, clase II: variantes potencialmente relevantes desde el punto de vista clínico, clase III: variantes con relevancia clínica desconocida y clase IV: variantes benignas o probablemente benignas (Figura 6).

Figura 6. Clasificación de las variantes según su significación clínica. (Adaptado de Li et al, 2017).



Se puede observar que las dos clasificaciones de mutaciones somáticas comparten muchos puntos en común, sin evidencia de superioridad de una de ellas, por lo que ambas son aplicables indistintamente.

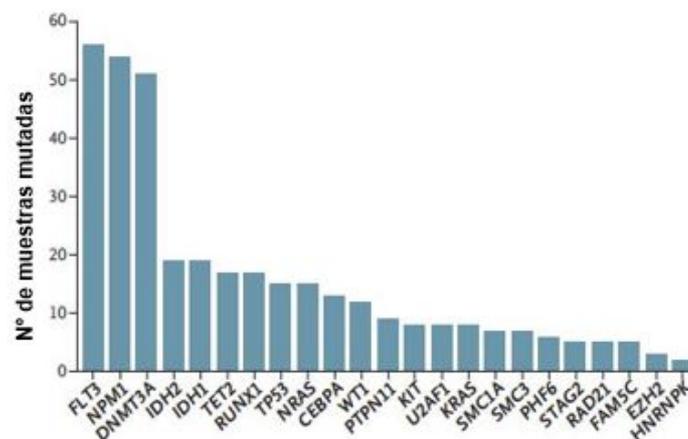
1.3. Secuenciación masiva en LMA

Las técnicas de NGS han contribuido a la detección de nuevas alteraciones moleculares en la LMA con implicaciones en el ámbito clínico, como se refleja en las aportaciones a la clasificación y algoritmos de estratificación del riesgo desarrollados recientemente. Además, han aportado luz a la compleja patogenia de la enfermedad permitiendo desarrollar nuevas hipótesis en cuanto a la arquitectura y evolución clonal. Varios estudios significativos han marcado este progreso. En 2008, la LMA se convirtió en la primera enfermedad de la que se obtenía la secuencia genómica completa (Ley et

al, 2008). Este trabajo abordó la secuenciación de un paciente con LMA de CN y abrió paso a la detección de nuevas alteraciones moleculares no descritas hasta el momento en genes relacionados con cambios epigenéticos (*IDH* y *DNMT3A*). Estudios posteriores del mismo grupo encontraron que dichas mutaciones se encontraban recurrentemente mutadas en la LMA y sugerían un impacto pronóstico desfavorable para *DNMT3A* (Mardis *et al*, 2009, Ley *et al*, 2010).

La publicación en 2013 del trabajo del TCGA constituye otro hito en el empleo de NGS en LMA. Se trata de la serie más amplia hasta esa fecha, que incluía 200 pacientes con LMA *de novo* analizados mediante secuenciación genómica o exómica completa. Este estudio puso de relieve la gran heterogeneidad genética de la LMA, encontrando mutaciones en un gran número de genes, de los cuales 23 eran recurrentes (Figura 7). Se observó que casi la totalidad de pacientes analizados presentaban al menos una mutación conductora con una media de 13 alteraciones genéticas por paciente (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Figura 7. Genes recurrentemente mutados en la LMA en la serie del TCGA.



Se analizó la expresión génica y metilación en la mayoría de los pacientes incluidos, encontrando una correspondencia entre patrones específicos de expresión génica, epigenética y alteraciones genéticas específicas. Algunas de ellas se correspondían con subgrupos diagnósticos consolidados (genes de fusión CBF), otras con entidades provisionales en el momento del estudio (*CEBPA* bialélico, *NPM1*) y otras con nuevos subgrupos funcionales (*RUNX1*) no descritos hasta ese momento. Los hallazgos de este y posteriores trabajos contribuyeron de manera fundamental a la consolidación de las entidades moleculares en la clasificación de la LMA. De este modo, la LMA con mutaciones en *NPM1* y la LMA con mutaciones bialélicas en *CEBPA* fueron

recogidas en la actualización de la OMS 2017 como entidades definitivas y la LMA con mutaciones en *RUNX1* fue incorporada como entidad provisional. Este estudio identificó patrones relacionales de asociación entre genes, siendo la más significativa la asociación entre *NPM1*, *FLT3* y *DNMT3A*, y patrones de exclusión, como *TP53* y *RUNX1* con *NPM1* y *FLT3*. Por último, una contribución decisiva de este estudio del TCGA fue la categorización en 9 grupos funcionales de las mutaciones conductoras encontradas, con implicaciones en la patogenia de la enfermedad (Tabla 1) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Posteriormente, numerosos trabajos han estudiado el espectro mutacional de la LMA mediante secuenciación masiva dirigida en series amplias o subgrupos concretos de LMA con diversas metodologías, la mayoría de ellos mediante secuenciación de un gran número de genes (>50). Los primeros trabajos publicados en los que se aborda el estudio de la LMA mediante secuenciación dirigida emplearon paneles de genes genéricos de cáncer que englobaban algunas mutaciones recurrentes en la LMA. Posteriormente la secuenciación se centró en genes exclusivamente mieloides, con paneles comerciales o *custom*. La Tabla 9 muestra resumidamente las características de algunos de los principales estudios publicados (Luthra *et al*, 2014, Ohgami *et al*, 2015, Wang *et al*, 2016, Cher *et al*, 2016, Au *et al*, 2016, Shin *et al*, 2016, Metzeler *et al*, 2016, Lin, P. H. *et al*, 2017, Papaemmanuil *et al*, 2016).

De especial relevancia es el reciente trabajo de Papaemmanuil *et al*. Se trata del mayor estudio de NGS dirigida realizado en LMA en el que se incluyeron 1540 pacientes tratados con esquemas intensivos y se secuenciaron 111 genes portadores de mutaciones conductoras. Se encontraron 5234 mutaciones conductoras en 76 genes con 2 o más mutaciones en el 86% de los pacientes analizados. Este estudio culmina con una propuesta de nueva clasificación basada en las alteraciones genómicas. Los pacientes se categorizaron en 14 grupos, 11 de ellos con alteraciones definidas (Tabla 10).

Tabla 9. Resumen de los principales trabajos publicados que emplean NGS para el estudio de la LMA.

Estudio	Genes analizados (n)	Pacientes (n)	Subgrupo de estudio	Tipo de panel /Tecnología	Análisis
<i>Luthra et al, Haematologica 2014</i>	54 hotspot	60	-	Comercial no LMA específico + 4 genes custom/ Illumina	Frecuencia mutaciones, validación técnica y clínica
<i>Ohgami et al, Mod Pathol 2015</i>	19 45 hotspot	93	-	Custom / Illumina	Frecuencia y asociación entre mutaciones; factores pronóstico
<i>Wang et al, Oncotarget 2016</i>	401 hotspot	95	Citogenética riesgo intermedio	Custom / Illumina	Frecuencia y asociación entre mutaciones; factores pronóstico
<i>Cher et al, Blood Cancer J 2016</i>	54 15 completos y 39 hotspot	72	LMA-CBF	Comercial / Illumina	Factores pronóstico
<i>Au et al, Diagn Pathol 2016</i>	54 15 completos y 39 hotspot	46	-	Comercial / Illumina	Frecuencia mutaciones, validación clínica
<i>Shin et al, Oncotarget 2016</i>	19	114	-	Custom / Illumina	Frecuencia y asociación entre mutaciones; factores pronóstico
<i>Metzeler et al, Blood 2016</i>	68 37 completos y 31 hotspot	664	-	Custom / Illumina	Frecuencia y asociación entre mutaciones; factores pronóstico
<i>Papaemmanuil et al, NEJM 2016</i>	111	1154	-	Custom / Illumina	Frecuencia y asociación entre genes; factores pronóstico
<i>Lin et al, Cancer Med 2017</i>	260 completos y hotspot	112	LMA <i>de novo</i>	Comercial / Illumina	Frecuencia y asociación entre mutaciones; factores pronóstico

Tabla 10. Categorías de la clasificación genómica (Papaemmanuil et al 2016).

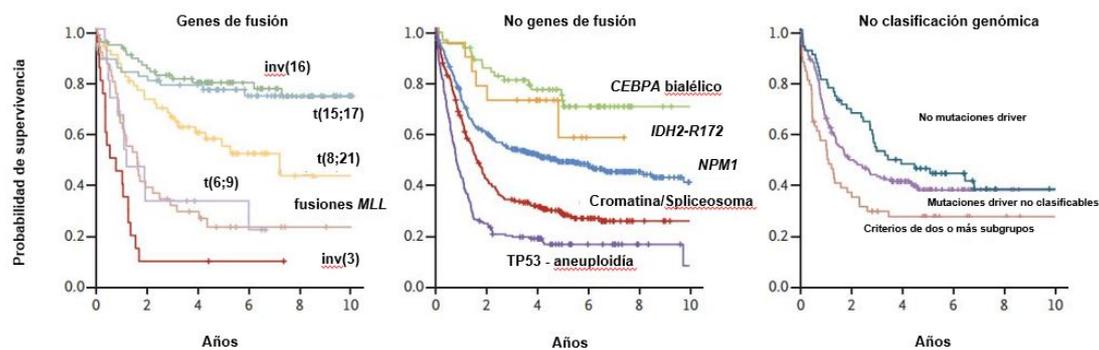
¹Requiere una o más mutaciones conductoras en *RUNX1*, *ASXL1*, *BCOR*, *STAG2*, *EZH2*, *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2* o *MLL-PTD*. Si coexisten con otras mutaciones definitorias de clase, se requiere la presencia de dos o más mutaciones en dichos genes. ²Requiere mutación en *TP53*, cariotipo complejo o en ausencia de otras mutaciones definitorias de clase, al menos una de las siguientes alteraciones cromosómicas: -7/7q, -5/5q, -4/4q, -9q, -12/12p, -17/-17p, -18/18q, -20/20q, +11/11q, +13, +21, o +22.
*Categorías no descritas previamente.

Clasificación genómica	Frecuencia (%)
LMA con <i>NPM1</i> mutado	27
LMA con mutaciones en genes de splicing y/o modificadores de cromatina ^{1*}	18
LMA con mutaciones en <i>TP53</i> y/o aneuploidias cromosómicas ^{2*}	13
LMA con inv(16) o t(16,16)	5
LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEBPA</i>	4
LMA con t(15,17)	4
LMA con t(8,21)	4
LMA con genes de fusión con <i>MLL</i>	3
LMA con inv(3)	1
LMA con mutaciones en <i>IDH2-R172*</i>	1
LMA con t(6,9)	1
LMA con otras mutaciones <i>driver</i>	11
LMA sin mutaciones <i>driver</i>	4
LMA con criterios de ≥ 2 grupos genómicos	4

Esta clasificación tiene implicaciones pronósticas e incluye 9 subgrupos de LMA previamente conocidos y define 3 nuevas categorías: LMA con mutaciones en genes de splicing y/o modificadores de la cromatina, LMA con mutaciones en *IDH2-R172* y LMA con mutaciones en *TP53* y/o aneuploidias cromosómicas. Los pacientes portadores de la mutación *IDH2-R172* presentan un pronóstico favorable mientras que los otros dos nuevos subgrupos (*TP53* y splicing/cromatina) se asocian con un pronóstico adverso (Figura 8). El tamaño muestral permitió analizar con mayor profundidad las interacciones génicas en distintos subgrupos. Por ejemplo, este estudio fue capaz de demostrar que las alteraciones en *TP53* y el CC, aunque fuertemente asociados entre sí, mantienen un valor pronóstico adverso independiente, incrementándose el riesgo si coexisten.

Asimismo, las tasas de supervivencia se ven acortadas si se asocian en un mismo paciente mutaciones en genes modificadores de la cromatina, genes del spliceosoma y/o genes reguladores de la transcripción.

Figura 8. SG en las diferentes categorías sugeridas en la clasificación genómica (curvas de Kaplan-Meier). Adaptado de Papaemmanuil et al, 2016.



La clasificación genómica requiere una validación independiente para confirmar el valor pronóstico de las alteraciones, especialmente, aquellas representadas en bajo porcentaje como la mutación *IDH2-R172*. Este estudio, al incluir un elevado número de pacientes, permitió detectar nuevas asociaciones génicas y en algunos casos precisar el subtipo de mutación dentro del mismo gen que forma parte de la asociación (*NPM1* se asocia con *NRAS-G12/13* pero no con *NRAS-Q61*; *IDH2-R140* e *IDH2-R172* presentan diferentes patrones de asociación).

Finalmente, la NGS ha sido fundamental en dos aspectos concretos. En primer lugar, para ilustrar la complejidad de las relaciones entre las diferentes alteraciones genéticas, observándose patrones no aleatorios de asociación y exclusión entre los diversos genes implicados en el desarrollo de la LMA. Su papel en la patogénesis y las posibles implicaciones de estos patrones específicos en el pronóstico y el tratamiento están aún por dilucidar.

En segundo lugar, para esclarecer los patrones de evolución clonal en la LMA, tanto en la génesis de la enfermedad como en las recaídas. El análisis de la VAF ha permitido analizar la estructura clonal de la LMA. El TCGA encontró un clon fundador y al menos un subclon en más de la mitad de los pacientes y Papaemmanuil et al precisaron que las mutaciones en modificadores epigenéticos forman parte del clon fundador y están siempre asociadas a otras lesiones, sugiriendo que la adquisición de alteraciones genéticas sigue un patrón no aleatorio.

2.HIPÓTESIS

En los últimos años la investigación biomédica y traslacional ha dado a conocer nuevas alteraciones moleculares útiles para optimizar el manejo clínico de los pacientes con LMA. El estudio integrado de estas alteraciones permitiría una mejor clasificación en grupos de riesgo así como ofrecer tratamientos más adecuados y específicos a cada paciente, atendiendo a la idea de aplicar una de medicina de precisión.

Para poder identificar estos biomarcadores moleculares el laboratorio clínico debe adaptarse tecnológicamente. En este sentido, la NGS ha demostrado ser una herramienta prometedora que permite un análisis integrado de la complejidad de las neoplasias hematológicas. La posibilidad de analizar simultáneamente alteraciones moleculares con impacto clínico nos permitiría realizar un nuevo enfoque diagnóstico en el que pasamos de analizar biomarcadores de forma individual a establecer paneles de marcadores aplicables al diagnóstico de rutina.

3.OBJETIVOS

1. Selección y caracterización de los pacientes del estudio mediante la recogida de datos clínico-biológicos al diagnóstico obtenidos por técnicas convencionales y datos de supervivencia.
2. Selección de un panel de NGS dirigida sencillo y aplicable al diagnóstico habitual, que incluya genes frecuentemente mutados en LMA, basándonos en la literatura. Siempre que sea posible, la secuenciación se limitará a las regiones *hotspot* en las que se localizan las mutaciones.
3. Validación técnica del panel de NGS incluyendo el análisis de los parámetros de secuenciación, validez, precisión y límite de detección.
4. Validación clínica de este panel en una serie de pacientes con LMA *de novo* mediante comparación con técnicas convencionales empleadas al diagnóstico.
5. Análisis del espectro mutacional en nuestra serie de pacientes: frecuencia mutacional y relaciones de concurrencia o exclusividad entre las diferentes alteraciones genéticas detectadas.
6. Determinación de la relación entre las alteraciones genéticas identificadas y las características clínico-biológicas de los pacientes.
7. Evaluación del impacto de la incorporación al diagnóstico habitual de las nuevas alteraciones genéticas.
8. Análisis del valor pronóstico de las mutaciones encontradas de manera individual y mediante la asignación a los subgrupos definidos en los algoritmos de estratificación del riesgo. Se evaluará su asociación con la respuesta al tratamiento y parámetros de supervivencia (SG, SLE e incidencia acumulada de recaída (IAR)).

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes y muestras

En el estudio se incluyeron los pacientes diagnosticados de LMA *de novo* entre junio de 1999 y julio de 2014 en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: diagnóstico de LMA no promielocítica, edad inferior a 65 años, candidatos a tratamiento intensivo y con muestra de ADN de MO al diagnóstico disponible y de calidad óptima.

Las muestras fueron obtenidas al diagnóstico mediante punción de MO esternal o en cresta ilíaca posterosuperior y posteriormente almacenadas en el Biobanco La Fe. Todos los pacientes se encontraban exhaustivamente caracterizados desde el punto de vista clínico y biológico (técnicas de citomorfología, inmunofenotipo, cariotipo, hibridación in situ fluorescente y técnicas convencionales de biología molecular). Los subtipos de LMA al diagnóstico se establecieron de acuerdo con las clasificaciones FAB y OMS. El cariotipo se determinó mediante citogenética convencional y el riesgo citogenético se evaluó en base a las recomendaciones del MRC (Grimwade *et al*, 2010).

Los pacientes recibieron tratamiento intensivo según el protocolo asistencial PETHEMA para menores de 65 años vigente al diagnóstico (LMA99, LMA2007 o LMA2010). En resumen, la totalidad de los pacientes recibió un primer ciclo de inducción basado en antraciclinas y citarabina. A continuación, los pacientes se estratificaron en función de la respuesta obtenida y la presencia de factores de pronóstico adverso recibiendo diferentes esquemas de consolidación tal y como se detalla en las Figuras I, II y III del anexo.

Se recogieron y analizaron variables clínicas, biológicas, respuesta al tratamiento, recaída y supervivencia. Todas las muestras fueron proporcionadas por el Biobanco La Fe en el momento del estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe y se ajustó a las recomendaciones de la Declaración de Derechos Humanos, la Conferencia de Helsinki y los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

4.2. Estudio de las alteraciones moleculares

4.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

El ADN se obtuvo en un procedimiento automatizado con el robot MagNaPure (Roche, Indianapolis, IN) empleando el kit MagNa Pure LC Large Volume (Roche). Para la técnica de NGS empleada en este estudio se cuantificó el ADN empleando el kit Qubit DNA BR (Thermo Fisher, San Diego, CA), se evaluó la pureza de las muestras de ADN mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop 2000® (Thermo Fisher). La integridad de las muestras se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras que presentaron una relación de absorbancia A260/A280 entre 1,8 y 2, y una única banda gruesa en la electroforesis en agarosa fueron consideradas como aptas para el estudio.

Los ácidos nucleicos obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

4.2.2. Líneas celulares y controles

Para los estudios de precisión y límite de detección de la técnica de NGS se utilizaron líneas celulares humanas.

Se empleó ADN comercial de las líneas celulares OCI3-AML (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) y HCT 116 (Horizon, Cambridge, UK). La línea celular OCI3-AML contiene las mutaciones puntuales p.Arg882Cys (c.2644C>T) en *DNMT3A* en heterocigosis y p.Gln61Leu (c.182A>T) en *NRAS* en homocigosis. Además es portadora de la inserción p.Arg228fs (c.859_860insTCTG) en *NPM1* en heterocigosis. La línea celular HCT 116 contiene las mutaciones puntuales p.Gly13Asp (c.38G>A) en *KRAS* y p.Asp816Val (c.2447A>T) en *KIT*, ambas en heterocigosis.

La línea celular HL60 se cultivó mediante métodos estándar y la extracción de ADN se realizó empleando el kit Blood DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Posteriormente se cuantificó el ADN con el kit Qubit DNA BR. Esta línea celular contiene la mutación puntual p.Gln61Leu (c.182A>T) en *NRAS* en heterocigosis.

Además, se utilizó como control negativo una muestra de un control sano sin mutaciones en los genes *DNMT3A*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS* ni *KIT*.

4.2.3. Caracterización molecular mediante NGS

4.2.3.1 Panel de genes

Se seleccionó el panel Ion Torrent AmpliSeq AML Community panel (Thermo Fisher). Este panel incluye las regiones *hotspot* de los genes *ASXL1*, *BRAF*, *CBL*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RUNX1* y *WT1*; y la secuencia codificante completa de *CEBPA*, *DNMT3A*, *GATA2*, *TET2* y *TP53*. En la Tabla 11 se detallan todas las regiones incluidas en el panel. Este panel únicamente requiere 40 ng de ADN genómico y analiza 21.9Kb en total. Para ello, se utilizan 264 amplicones que se dividen en cuatro grupos o *pools* de cebadores. Cada uno de ellos necesita 10 ng de ADN genómico y contienen 124, 113, 12 y 15 pares de cebadores, respectivamente.

Tabla 11. Genes y regiones incluidas en el panel de NGS.

Genes	Región diana
<i>ASXL1</i>	Exón 12
<i>BRAF</i>	Codón 600
<i>CBL</i>	Exones 8-9
<i>CEBPA</i>	Todos los exones
<i>DNMT3A</i>	Todos los exones
<i>FLT3</i>	Codones 676, 830-850
<i>GATA2</i>	Todos los exones
<i>IDH1</i>	Exón 4
<i>IDH2</i>	Exón 4
<i>JAK2</i>	Exón 14
<i>KIT</i>	Exones 8, 10, 11, 17
<i>KRAS</i>	Exones 2, 3, 4
<i>NPM1</i>	Exón 12
<i>NRAS</i>	Exones 2, 3, 4
<i>PTPN11</i>	Exones 3, 7, 8, 13
<i>RUNX1</i>	Exones 3-8
<i>TET2</i>	Todos los exones
<i>TP53</i>	Todos los exones
<i>WT1</i>	Exones 7, 9

4.2.3.2 Preparación de la muestra

Para generar las librerías se siguieron los siguientes pasos: en primer lugar, se amplificaron las dianas, a continuación, se realizó una digestión parcial de las secuencias de cebadores, posteriormente se ligaron los adaptadores a los amplicones, se purificó el producto y se normalizaron las librerías amplificadas.

4.2.3.2.1 Paso 1: Amplificación del ADN

Las librerías se generaron a partir de 40 ng de ADN genómico por cada muestra y se amplificaron con el Ion Ampliseq library kit 2.0 (Thermo Fisher). Previamente, se normalizó la concentración de ADN de todas las muestras a 10 ng/μL. La mezcla de reactivos para la reacción de amplificación es igual para los cuatro *pools* de cebadores y se detalla en la Tabla 12.

Tabla 12. Reactivos y volúmenes empleados en la reacción de amplificación.

Reactivo	Volumen (μL)
5x AmpliSeq™ HiFi Mix	2
2x Ion AmpliSeq™ Primer Pool	5
ADN genómico, 10 ng	1
H ₂ O estéril	2
Total	10

Sin embargo las condiciones de la PCR difieren por la diferencia de pares de oligonucleótidos en los distintos *pools*. Los *pools* 1 y 2 (en torno a 120 parejas de cebadores) requieren de un programa de 18 ciclos (Tabla 13), mientras que para los *pools* 3 y 4 (con 12 y 15 parejas de cebadores) se emplea un programa de 21 ciclos (Tabla 14).

Tabla 13. Características de la PCR de amplificación de los *pools* 1 y 2.

Número de ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	Activación enzimática	99	120
18	Desnaturalización	99	15
	Hibridación y extensión	60	240

Tabla 14. Condiciones de la PCR de amplificación de los *pools* 3 y 4.

Número de ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	Activación enzimática	99	120
21	Desnaturalización	99	20
	Hibridación y extensión	62	240

Tras la amplificación se combinaron los *pools* para obtener un total de dos mezclas de amplicones, una constituida por los *pools* 1 y 3, y otra constituida por los *pools* 2 y 4, tal y como se describe en la Tabla 15.

Tabla 15. Combinación de los distintos *pools* de amplicones.

Componente	Volumen (µL)
Pool 1 o Pool 2	3.7
Pool 3 o Pool 4	10
H ₂ O estéril	6.3
Total	20

4.2.3.2.2 Paso 2: Digestión enzimática de las secuencias de cebadores

Se añadieron 2 µL de reactivo FuPa a cada muestra amplificada obteniendo un volumen total de 22 µL. A continuación, se siguió el siguiente programa en el termociclador: 50°C durante 10 minutos, 55°C durante 10 min, 60°C durante 20 minutos y finalmente 10°C hasta un máximo de una hora.

4.2.3.2.3 Paso 3: Ligación de adaptadores a los amplicones y purificación de las librerías

Posteriormente, las librerías se etiquetaron con el kit Ion Xpress Barcode Adapter (Thermo Fisher) de tal manera que a cada muestra se le asignó un código o *barcode* distinto y para todas las librerías procedentes de la misma muestra se empleó el mismo código en los diferentes *pools*. Para ello, se combinaron los *barcodes* y los adaptadores P1 según las indicaciones del fabricante. Seguidamente, se realizó una reacción de dilución (Tabla 16) para lo que se añadió a cada librería 2 µL de la mezcla de adaptadores y *barcodes* correspondiente, 4 µL de Switch Solution y 2 µL de ligasa de ADN, alcanzando un volumen total por pocillo de 30 µL.

Tabla 16. Condiciones del termociclador para la reacción de ligación.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
22	30
72	10
10	Máximo 1 hora

Las librerías se purificaron antes de ser amplificadas realizando un doble lavado con el kit Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman-Coulter, Brea, CA).

4.2.3.2.4 Paso 4: Normalización y amplificación de las librerías

Las librerías purificadas se normalizaron a 100 pM empleando el Ion Library Equalizer™ Kit (Thermo Fisher). Este procedimiento no requiere cuantificación previa de la librería. A continuación, las librerías marcadas se amplificaron clonalmente y se enriquecieron mediante una PCR de emulsión de forma automatizada utilizando el equipo Ion Torrent One Touch 2 (Thermo Fisher) y las esferas Ion Sphere Particles (ISP) (Thermo Fisher). En este proceso de expansión clonal, cada fragmento de ADN contenido en las librerías es biotinilado a nivel del *barcode* y se une a una única ISP a través del adaptador. Tras la amplificación, cada ISP queda recubierto por múltiples copias del mismo fragmento de ADN. Finalmente, las librerías amplificadas se purifican para eliminar las ISP no ensambladas a ADN.

4.2.3.3 Secuenciación y control de calidad

En función de si la secuenciación se realizó en la plataforma Ion Proton (Thermo Fisher) o en el equipo Ion PGM (Thermo Fisher) se emplearon los chips Ion P1 o Ion 318™ (Thermo Fisher), respectivamente. Se establecieron como valores mínimos de calidad un 90% de uniformidad y una profundidad de cobertura media de al menos 500X para continuar con el análisis de la muestra. Las muestras que no cumplieron estos criterios fueron secuenciadas de nuevo.

4.2.3.4 Análisis de los datos: lectura de nucleótidos, alineamiento, llamada y anotación de variantes

Se empleó el programa Torrent Suite™ versión 5.2.1 (Thermo Fisher) para la extracción de las lecturas de cada muestra. Este mismo software realiza el alineamiento de la secuencia contra el genoma humano de referencia hg19 utilizando la herramienta TMAP.

La llamada de las variantes o *variant calling* se realizó a partir del fichero BAM obtenido en el paso anterior y utilizando la herramienta Variant Caller Plugin versión 5.2.1.38 (Thermo Fisher) que genera un archivo VCF por cada muestra. La profundidad de lectura y el *strand bias* se analizaron mediante la herramienta Coverage Analysis Plugin versión 5.2.1.2 (Thermo Fisher). Los fragmentos con *strand bias* intrínseco o baja profundidad de lectura fueron revisados mediante visualización directa del alineamiento frente al genoma de referencia con el software *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (Thorvaldsdottir *et al*, 2013).

La anotación de las variantes se realizó empleando el programa Ion Reporter Software version 5.2 (Thermo Fisher) a partir de los ficheros VCF.

4.2.3.5 Filtrado de las variantes

Todas las variantes anotadas fueron revisadas y filtradas para seleccionar únicamente aquellas clínicamente relevantes y técnicamente válidas según el siguiente orden:

1. Selección de variantes localizadas en regiones codificantes y que generan un cambio en el aminoácido resultante. Para ello, se excluyeron del análisis las variantes intrónicas y las sinónimas.
2. Selección de variantes con una frecuencia mutacional clínicamente significativa. Por lo tanto, los polimorfismos o SNPs, es decir, las variantes con MAF mayor o igual de 1% y las incluidas en las bases de datos poblacionales *dbSNP* y *1000 Genomes Project* no se incluyeron en el análisis posterior.
3. Selección de variantes con un mínimo de 100 lecturas en la posición alterada.
4. Selección de mutaciones puntuales con 20 o más lecturas del alelo mutado e INDELS con 25 o más lecturas del alelo mutado.
5. Selección de variantes con VAF de al menos 3% para mutaciones puntuales y del 5% para inserciones o deleciones.
6. Visualización directa de las variantes en el visor genómico IGV con el objetivo de excluir posibles errores de secuenciación (homopolímeros, *strand bias*...)
7. Revisión individual de cada una de las variantes empleando bases de datos públicas (ClinVar, Varsome, Cosmic). Las mutaciones descritas previamente como germinales fueron excluidas del análisis posterior. Las mutaciones no descritas previamente se investigaron aplicando algoritmos de predicción de su efecto deletéreo (SIFT, PROVEAN y PolyPhen2).

4.2.3.6 Clasificación de las variantes

Las variantes se categorizaron en 4 clases en base a las guías y estándares vigentes según su significación clínica (Li *et al*, 2017): clase I: variantes clínicamente relevantes, clase II: variantes potencialmente relevante desde el punto de vista clínico, clase III: variantes con relevancia clínica desconocida, clase IV: variantes benignas o probablemente benignas.

4.2.4. Validación técnica del método de NGS

4.2.4.1 Parámetros de la secuenciación

En todas las muestras se determinó la uniformidad, el porcentaje de lecturas mapeadas correctamente (*on-target*), la profundidad de lectura y el *strand bias* o sesgo de cadena.

4.2.4.2 Validez

La sensibilidad y especificidad del método estudiado se calculó sobre los archivos BAM obtenidos de la secuenciación de tres líneas celulares (HL-60, OCI3-AML y HCT 116) caracterizadas ampliamente y cuya secuencia génica se encuentra disponible públicamente. Para ello se aplicó el paquete *caret* de R versión 6.0-79, se filtraron las coordenadas cubiertas por el panel con los archivos *.bed* y se compararon los resultados de la secuenciación con la secuencia genómica de referencia de estas líneas celulares. El cálculo se realizó aplicando un algoritmo basado en BWA-MEM para el alineamiento y GATK para la identificación de variantes. La sensibilidad y especificidad esperadas con el algoritmo empleado son de 85% y 99% respectivamente (Elloumi, M, 2017). Se elaboraron tablas de contingencia con los valores de los verdaderos positivos (VP), los verdaderos negativos (VN), los falsos positivos (FP) y los falsos negativos (FN). Se consideraron VP a las mutaciones esperadas según la secuencia de referencia que fueron identificadas tras la secuenciación con el panel de estudio. Se consideraron VN a todas las posiciones genómicas en las que no se esperaba encontrar una mutación en base a la secuencia de referencia y en las que la secuenciación con el panel de estudio no encontró cambio de nucleótido. Se consideraron FP a las mutaciones identificadas en la secuenciación que no se encontraban presentes en la secuencia genómica de referencia. Finalmente, se consideraron FN las posiciones genómicas en las que era esperable encontrar una mutación según la secuencia de referencia, en las que, sin embargo, el panel estudiado no detectó dicha mutación.

La sensibilidad se calculó como la proporción de VP detectados por el panel y el total de positivos (cambio de nucleótido) encontrados en la secuencia de referencia de la línea celular (suma de VP y FN) $[VP/(VP+FN)]$ y la especificidad se calculó como la proporción de VN detectados por el panel de estudio y el total de posiciones genómicas de la secuencia de referencia que no presentaron cambio de nucleótido (suma de VN y FP) $[VN/(VN+FP)]$.

4.2.4.3 Precisión y límite de detección

Definimos la reproducibilidad como la concordancia entre las dos plataformas empleadas en este estudio (Ion PGM e Ion Proton). Consideramos como precisión intermedia la concordancia de resultados empleando la misma plataforma, pero diferentes equipos (en nuestro caso, dos Ion PGM) y distintos operadores. Por último, la repetibilidad expresa la precisión del procedimiento en las mismas condiciones, con el mismo equipo y en un intervalo de tiempo corto. Se define el límite de detección como la frecuencia alélica mínima que el procedimiento es capaz de detectar para una variante única y límite de cuantificación a la frecuencia alélica mínima que puede ser identificada por el método a estudio con una precisión adecuada.

Para evaluar la reproducibilidad se secuenciaron en ambas plataformas librerías obtenidas de las muestras al diagnóstico de tres pacientes incluidos en el estudio.

Se empleó la línea celular OCI3-AML, que contiene tres regiones *hotspot* en la LMA, en la plataforma PGM para determinar el límite de detección, el límite de cuantificación, la repetibilidad y la precisión intermedia. Para ello, se elaboraron diluciones seriadas de ADN de dicha línea celular y ADN de un control sano en las siguientes proporciones: 1:5, 1:10, 1:16 y 1:50. Con ello, se obtuvieron frecuencias alélicas de 10%, 5%, 3% y 1% para las alteraciones moleculares en *DNMT3A* y *NPM1* y frecuencias alélicas de 20%, 10%, 6% y 2% para la mutación en *NRAS*.

Figura 9. Diseño del experimento de precisión y límite de detección. L: librería. X: otras muestras (no empleadas para determinar la precisión).



Se generaron siete librerías independientes por cada dilución (1:5, 1:10, 1:16 y 1:50) de la línea celular OCI3-AML. La repetibilidad se evaluó secuenciando cuatro librerías de cada muestra en dos carreras diferentes en el mismo secuenciador Ion PGM, obteniendo en total cuatro secuenciaciones por cada una de las diluciones. Las librerías y la secuenciación se realizaron el mismo día y por el mismo operador. Para la precisión intermedia se emplearon también cuatro librerías que se secuenciaron en cuatro carreras diferentes (una de ellas se había utilizado también para el cálculo de la repetibilidad), obteniendo también cuatro secuenciaciones independientes por cada muestra. En este caso, los experimentos fueron realizados por dos operadores distintos, en dos equipos diferentes (ambos Ion PGM) y con más de 24 horas de diferencia.

En todos los casos, en cada carrera se incluyeron 8 muestras en un chip Ion 318™. Para los experimentos de precisión intermedia, cada carrera se completó con cuatro muestras adicionales que no se emplearon para la determinación de la precisión del método. Se consideró aceptable un coeficiente de variación (CV) menor o igual al 20%.

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación se emplearon todas las librerías construidas. La distribución de las muestras y las carreras realizadas para este experimento se detallan en la Figura 9.

4.2.5. Validación clínica de la técnica de NGS

Para evaluar la capacidad del panel seleccionado para detectar variantes patogénicas en la LMA se compararon los resultados de la NGS con los obtenidos mediante las técnicas convencionales de biología molecular empleadas hasta entonces como estándar al diagnóstico. Además, se confirmaron las nuevas mutaciones encontradas mediante secuenciación directa.

4.2.5.1 Detección de inserciones en *NPM1*, *FLT3-ITD* y *FLT3-D835*

Las mutaciones en *NPM1* se determinaron mediante amplificación por PCR de un fragmento de 197 pb del exón 12 del gen (Gale *et al*, 2008), empleando un cebador *forward* marcado con 6-FAM en su extremo 5'.

Las mutaciones en *FLT3-ITD* se analizaron siguiendo los pasos descritos con anterioridad (Thiede *et al*, 2002). Brevemente, se parte de ADN genómico que se amplificó mediante PCR empleando cebadores específicos de los exones 11 y 12. El cebador *forward* se encuentra marcado con 6-FAM en su extremo 5'.

Por último, la determinación de la mutación D835 se efectuó mediante amplificación por PCR del exón 7 de *FLT3*, empleando cebadores marcados con fluorógenos (HEX) (Murphy *et al*, 2003).

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis capilar en el equipo ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Massachusetts, US) y el *software* GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems), lo que permite diferenciar dos fragmentos en los casos mutados mediante separación por tamaños.

4.2.5.2 Detección de mutaciones en el gen *CEBPA*

Para el estudio de *CEBPA*, en primer lugar, se buscaron mutaciones mediante electroforesis capilar como técnica de screening. Para ello, se realizaron tres PCR para amplificar las regiones TAD1, TAD2 y BZIP utilizando cebadores marcados en 5' con 6-FAM en el oligonucleótido *forward* (Lin, L. I. *et al*, 2005). Cada PCR requiere 30 ng de ADN genómico. Los reactivos y las condiciones de las PCR se realizaron siguiendo un diseño publicado previamente (Fuster *et al*, 2012). Para confirmar la correcta amplificación de los fragmentos se testaron los productos de PCR en gel de agarosa al 2%. A continuación, los fragmentos amplificados se estudiaron mediante electroforesis capilar en el equipo ABI 3130 Genetic Analyzer y análisis en el *software* GeneMapper v3.7. Las muestras que resultaron positivas por electroforesis capilar se testaron en un segundo paso mediante secuenciación directa (Sanger) del exón 1.

4.2.5.3 Otros genes

Las mutaciones en otros genes incluidos en el panel que fueron detectadas con una VAF mayor del 15% por NGS se confirmaron por secuenciación directa con el kit Type-it mutation detection (Qiagen). En concreto, se estudiaron los genes *BRAF V600E*, *KIT*, *IDH1* (R132), *IDH2* (R140, R172), *TET2* y *RUNX1* empleando cebadores específicos y técnicas descritas anteriormente (Amanuel *et al*, 2012, Fuster *et al*, 2009, Paschka *et al*, 2010, Gaidzik *et al*, 2011).

4.3. Definiciones

4.3.1. Secuenciación masiva

Amplicón: fragmento de DNA resultante de la amplificación de una secuencia de interés.

Base calling: es el proceso de asignación de nucleótidos concretos en función de la señal generada en una reacción de secuenciación.

Frameshift: mutación que genera un cambio en el marco de lectura de la secuencia.

Hotspot: región genómica que presenta mutaciones de manera recurrente.

Librería: conjunto de fragmentos de DNA de una muestra, de un tamaño homogéneo y que portan adaptadores y códigos en los extremos.

Minor Allele Frequency (MAF): frecuencia del alelo menos común en una determinada posición. Este dato se extrae de la información publicada en las bases de datos poblacionales. Un porcentaje superior al 1% indica que la variante se considera un polimorfismo o SNP.

Strand-bias: desequilibrio entre las lecturas de los fragmentos genómicos amplificados de las hebras sentido (5'-3') y anti-sentido (3'-5').

VAF: (variant allele frequency): la frecuencia alélica de la variante se refiere al porcentaje de lecturas que contienen la variante mutada respecto a las lecturas de la secuencia de referencia.

Variant calling o llamada de variantes: es el proceso por el cual se identifican las variantes a partir de la información generada por la secuenciación.

4.3.2. Respuesta al tratamiento

Se evaluó la respuesta al tratamiento tras finalizar el ciclo de inducción. Para ello, se analizaron los resultados del hemograma y se realizó un examen citomorfológico de muestra de SP y de muestra de MO obtenida por punción esternal o en cresta ilíaca posterosuperior. Los criterios de respuesta se detallan a continuación:

- *Remisión Completa (RC)*: se consideró en respuesta completa a los pacientes que cumplieron todos los criterios que se enumeran a continuación:
 - Recuento absoluto de neutrófilos $\geq 1 \times 10^9/L$
 - Recuento plaquetar $\geq 100 \times 10^9/L$
 - Ausencia de blastos en SP
 - Blastos en MO $\leq 5\%$, sin bastones de Auer
 - Ausencia de enfermedad extramedular
- *Remisión Parcial (RP)*: los pacientes que cumplieron todos los criterios hematológicos de respuesta completa pero presentaron un porcentaje de

blastos en MO entre un 5% y un 25% con una disminución de al menos el 50% respecto al porcentaje de blastos al diagnóstico se consideraron en respuesta parcial.

- *Refractariedad primaria*: ausencia de RC o RP tras tratamiento intensivo.
- *Muerte por causa diferente a la LMA*: muerte antes de la evaluación de la respuesta (muerte en inducción) o muerte sin evidencia de enfermedad leucémica antes de finalizar la totalidad del tratamiento.
- *Recaída*: Tras haber alcanzado una respuesta, reaparición de enfermedad extramedular, blastos en SP o blastos en MO con un porcentaje $\geq 5\%$.

Se consideró fallo del tratamiento a todos los pacientes que no alcanzaron RC o RP tras la inducción.

4.3.3. Supervivencia

Supervivencia global (SG): se calculó para todos los pacientes incluidos en el estudio. Se consideró el tiempo comprendido entre la fecha de diagnóstico de la enfermedad y la fecha de última visita o muerte del paciente.

Supervivencia libre de evento (SLE): se calculó para todos los pacientes incluidos en el estudio. Se consideró el tiempo desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha de enfermedad refractaria, recaída desde RC o muerte por cualquier motivo, lo que ocurriera primero. Los pacientes que sobrevivieron sin enfermedad se censuraron en la fecha de última visita.

Incidencia acumulada de recaída (IAR): se calculó para los pacientes que alcanzaron RC, desde la obtención de la misma hasta la recaída. Como evento competitivo a la recaída, se consideró la muerte no debida a la LMA. Los pacientes que sobrevivieron sin enfermedad se censuraron en la fecha de última visita.

4.3.4. Otros

Cariotipo complejo: presencia de tres o más alteraciones cromosómicas no relacionadas.

4.4. Limitaciones del estudio

4.4.1. Aspectos técnicos

En primer lugar, el empleo de paneles de amplicones presenta dos limitaciones principales. Por una parte, el estudio de las regiones difíciles de amplificar puede verse afectado por problemas de cobertura, lo que puede dificultar la detección de mutaciones en dichas localizaciones. Por otra parte, la uniformidad obtenida es ligeramente inferior que empleando otros diseños (paneles de captura). En segundo lugar, el tipo de tecnología utilizada (basada en cambios de pH y transmisión de la señal por chips semiconductores) puede, por un lado, inducir errores en la detección de INDELS, en especial en las regiones de homopolímeros. Este error se puede minimizar aumentando los ciclos de secuenciación. Por otro lado, en regiones con elevado *strand bias* pueden detectarse de manera infrecuente falsas inserciones de un nucleótido o errores en la identificación de sustituciones, sin embargo, la revisión en el visor genómico IGV permite detectar estos artefactos con facilidad.

La cobertura del diseño del panel no incluye el dominio yuxtamembrana de *FLT3* en el que se localizan las ITD, por lo que este tipo de mutaciones no son evaluables por el método de NGS.

En lo referente a la interpretación de los resultados, este estudio no incluye pruebas pareadas en ADN no tumoral encaminadas a la detección de posibles alteraciones de línea germinal. En este sentido, se ha realizado una investigación exhaustiva de las bases de datos de variantes públicas y se han descartado las mutaciones descritas como germinales en estudios previos. Además, en casos seleccionados con alta sospecha del carácter germinal de la variante se ha analizado una muestra de SP en RC.

4.4.2. Aspectos clínicos

En cuanto al estudio de supervivencia, los pacientes incluidos en el estudio recibieron tratamiento intensivo en base a los protocolos asistenciales nacionales vigentes al diagnóstico. A pesar de que el tratamiento de inducción fue equivalente en todos ellos, existen diferencias en cuanto tipo de quimioterapia recibida en consolidación y los criterios para proceder a un trasplante de MO. Estas divergencias pueden influir en la asignación del pronóstico de las variables a estudio a pesar de que los grupos de estudio no presenten diferencias significativas en su distribución. Se realizó un análisis de factores pronóstico censurando a los pacientes que recibieron trasplante de

progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico en la fecha del trasplante, lo que puede contribuir a minimizar las diferencias en función del protocolo de tratamiento.

Como criterio de inclusión en el estudio se requiere una muestra de ADN disponible en cantidad y calidad óptimas, lo que podría influir en la representatividad de la muestra por efecto del azar. Para evaluar esta limitación intrínseca del diseño del proyecto se compararon las características clínico-biológicas de la serie de pacientes incluidos en el estudio con la serie total de pacientes que cumplían el resto criterios de inclusión independientemente de la disponibilidad de muestra biológica.

4.5. Análisis estadístico

En cuanto a la estadística descriptiva, las variables cuantitativas continuas se evaluaron empleando la mediana y el rango, mientras que para las variables cualitativas se utilizaron las frecuencias absoluta y relativa.

La prueba de Chi cuadrado y el test exacto de Fisher se utilizaron para comparar las variables cualitativas entre los subgrupos de pacientes. Para las variables cuantitativas continuas, se aplicó el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad. Las variables de distribución no normal se analizaron mediante los test U de Mann-Whitney y Kruskal Wallis, mientras que las de distribución normal se evaluaron mediante la t de Student. La corrección de Bonferroni se aplicó para las comparaciones múltiples. Los patrones de exclusión se analizaron aplicando los algoritmos MEGSA (Hua *et al*, 2016).

La SG y la SLE se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier. Para las comparaciones se utilizó la prueba log-rank. Se empleó la regresión múltiple de Cox para el análisis multivariante de las variables dependientes del tiempo. La probabilidad de recaída se estimó a través del cálculo de la incidencia acumulada (IA), empleando el test de Gray para las comparaciones. A este efecto, se consideraron como eventos competitivos la recaída y la muerte por otras causas. El análisis multivariante de la IA se realizó mediante el test de Fine y Gray para eventos competitivos. Para el análisis de supervivencia los pacientes que recibieron un TPH alogénico se censuraron en la fecha de dicho procedimiento.

Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. En el análisis multivariante se incluyeron las variables que alcanzaron el nivel de significación en el estudio univariante. Para el análisis estadístico se empleó el software R versión 3.2.2.

5.RESULTADOS

5.1. Características generales de la serie

Se incluyeron en el estudio un total de 162 pacientes con LMA no promielocítica tratados con quimioterapia intensiva. La mediana de edad al diagnóstico fue de 50 años, con predominio de varones frente a mujeres (59.3% vs 40.7%). La mediana de blastos fue del 68% en MO y del 46% en SP. Los recuentos hemoperiféricos medios fueron de $14.65 \times 10^9/L$ para los leucocitos, 9.3 g/dL para la hemoglobina y $55.5 \times 10^9/L$ para las plaquetas. Más de la mitad de los pacientes (61%) presentaron un cariotipo de riesgo intermedio. En cuanto al protocolo de tratamiento, los pacientes se repartieron en proporciones similares, en torno al 30% en cada uno de los 3 grupos.

Tabla 17. Características generales de la serie de estudio y comparación con la serie global independientemente de la presencia de ADN disponible.

Características	Serie de estudio n (%)	Serie global n (%)	p valor
	Mediana (rango)	Mediana (rango)	
Edad	50 (17-64)	51 (17-64)	0,71
Blastos en SP (%)	46 (0-100)	41,5 (0-100)	0,53
Blastos en MO (%)	68 (20-89)	66 (20-100)	0,49
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	14.65 (0.8-324)	13.72 (0.8-324)	0,55
Hemoglobina (g/dL)	9.3 (4.9-14.2)	8.9 (4.9-14.2)	0,44
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	55.5 (5-572)	59 (5-572)	0,72
	n (%)	n (%)	
Sexo			
Hombre	96 (59.3)	133 (58.8)	0,93
Mujer	66 (40.7)	93 (41.2)	
Riesgo citogenético			
Bajo	24 (14.8)	30 (13.3)	0,91
Intermedio	98 (60,4)	139 (61.5)	
Alto	31 (19,1)	41 (18.1)	
No disponible	9 (5.5)	16 (7.1)	
Tratamiento			
PETHEMA LMA99	51 (31.5)	97 (43)	0.04
PETHEMA LMA2007	54 (33.3)	65 (29)	
PETHEMA LMA2010	57 (35.2)	64 (28)	
TOTAL	162	226	

Resultados

Se comparó la serie de estudio (con muestra de ADN disponible, n=162) con la serie global de pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión independientemente de la presencia de ADN (n=226), sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos a excepción de la distribución entre los distintos tipos de tratamiento.

Las características de ambas series, así como la comparación entre ellas, se recogen en detalle en las siguientes tablas: Tabla 17, Tabla 18, Tabla 19 y Tabla 20. La caracterización previa de los pacientes, que incluía el cariotipo y únicamente las mutaciones en tres genes (*NPM1*, *CEBPA* y *FLT3*), permitió clasificar a los pacientes de la serie de estudio y la global de acuerdo con los criterios FAB, OMS 2008 y ELN 2010.

Tabla 18. Clasificación OMS 2008 de la serie de estudio y comparación con la serie global.

Clasificación OMS 2008	Serie de estudio	Serie global	p valor
	n (%)	n (%)	
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	95 (58,6)	112 (49,6)	
LMA con t(8;21); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9 (5,6)	12 (5,4)	
LMA con inv(16) o t(16;16); <i>CBFB-MYH11</i>	15 (9,3)	18 (8,1)	
LMA con t(9;11); <i>MLLT3-KMT2A</i>	2 (1,2)	3 (1,4)	
LMA con t(6;9); <i>DEK-NUP214</i>	1 (0,6)	3 (1,4)	
LMA con inv(3) o t(3;3)	3 (1,8)	5 (2,3)	
LMA con <i>NPM1</i> mutado (entidad provisional)	54 (33,3)	59 (26,7)	
LMA con <i>CEBPA</i> mutado (entidad provisional)	11 (6,8)	12 (5,4)	
LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia	42 (26)	58 (25,6)	
LMA no especificada (NOS)	25 (15,3)	51 (22,5)	0.91
LMA con mínima diferenciación	4 (2,5)	6 (2,7)	
LMA sin maduración	8 (4,9)	19 (8,6)	
LMA con maduración	6 (3,7)	10 (4,5)	
Leucemia aguda mielomonocítica	3 (1,8)	7 (3,2)	
Leucemia aguda monoblástica/monocítica	3 (1,8)	4 (1,8)	
Leucemia aguda eritroide	1 (0,6)	4 (1,8)	
Panmielosis aguda con mielofibrosis	0	1 (0,4)	
No clasificadas	0	5 (2,2)	
TOTAL	162	226	

Tabla 19. Clasificación FAB de la serie de estudio y comparación con la serie global.

Clasificación FAB de la LMA	Serie de estudio	Serie global	p valor
	n (%)	n (%)	
M0 - indiferenciada	7 (4,3)	10 (4,4)	0,99
M1 – sin maduración	46 (28,4)	62 (27,4)	
M2 – con maduración	42 (25,9)	64 (28,3)	
M4 - mielomonocítica	42 (25,9)	55 (24,3)	
M5 - monoblástica	17 (10,5)	22 (9,7)	
M6 – eritroide	7 (4,3)	10 (4,4)	
M7 – megacarioblástica	1 (0,6)	3 (1,3)	
TOTAL	162	226	

Tabla 20. Clasificación según la ELN 2010 de la serie de estudio y comparación con la serie global.

Riesgo ELN 2010	Serie de estudio	Serie global	p valor
	n (%)	n (%)	
Bajo	58 (35,8)	69 (30,5)	0,92
Intermedio 1	43 (26,5)	59 (26,1)	
Intermedio 2	24 (14,8)	34 (15)	
Alto	28 (17,3)	39 (17,3)	
No clasificadas	9 (5,6)	25 (11)	
TOTAL	162	226	

5.2. Validación técnica del panel de NGS

5.2.1. Parámetros de la secuenciación

Se secuenciaron las muestras de los 162 pacientes incluidos en el estudio. Se realizaron un total de 165 secuenciaciones (112 en la plataforma Ion Proton y 53 en la plataforma Ion PGM) ya que tres pacientes se secuenciaron en ambas plataformas para examinar la reproducibilidad, tal y como se detalla más adelante. La media de lecturas mapeadas por muestra fue de 2.000.000 en Ion Proton y de 500.000 en Ion PGM.

En ambas plataformas se alcanzó un porcentaje de lecturas *on-target* mayor del 88% y una uniformidad media superior al 93%. La media de la profundidad de lectura

por base obtenida fue mayor de 6.000 para Proton y superior a 2.000 para PGM (Tabla 21).

Tabla 21. Parámetros de la secuenciación con el panel NGS.

		Lecturas mapeadas	On Target (%)	Profundidad media de lectura	Uniformidad (%)
Proton	Media	1.988.976	88,76	6.204	93,61
	Rango	256.145-35.000.248	34,25-96,29	1.107-25.768	90,16-96,42
	Desviación estándar	4.178.692	14,06	4.783	1,49
PGM	Media	489.143	91,55	2.082	94,89
	Rango	134.761-834.560	49,51-99,45	1.009-3.876	90,30-97,83
	Desviación estándar	140.848	14,18	676	1,94

La profundidad media de lectura por gen en la plataforma PGM fue mayor de 1000X en todos los genes estudiados a excepción de *BRAF* en la que fue de 942X. En la plataforma Ion Proton la totalidad de los genes analizados mostraron una profundidad media de lectura superior a 1000X. En ambas plataformas la mayoría de los amplicones analizados no mostraron strand bias y su profundidad media de lectura fue superior a 500X (97% y 99,14% en Ion PGM y en Ion Proton, respectivamente), siendo más homogénea en el caso del Ion PGM. Sin embargo, se observó una profundidad de lectura inferior a 100X de manera constante en los codones 70-75 del gen *DNMT3A* (fragmento NM_022552.4) y los primeros 200 codones de *CEBPA* (fragmento NM_004364.4) (Figura 10). Algunos amplicones concretos mostraron un desbalance de lectura entre ambas cadenas significativo, especialmente en la plataforma PGM. En este equipo, los fragmentos *ASXL1_235.1.76662* y *GATA2_47.1.16110* presentaron un *strand bias* de 40.4X y 108.05X a favor de la hebra sentido y el fragmento *DNMT3A_23.66955* se encontró sesgado 45.62X hacia la hebra antisentido (Figura 11). Estos amplicones se revisaron sistemáticamente en el visor genómico IGV en todas las muestras.

Figura 10. Amplicones con profundidad media de lectura por amplicón inferior a 1000X en alguna de las dos plataformas.

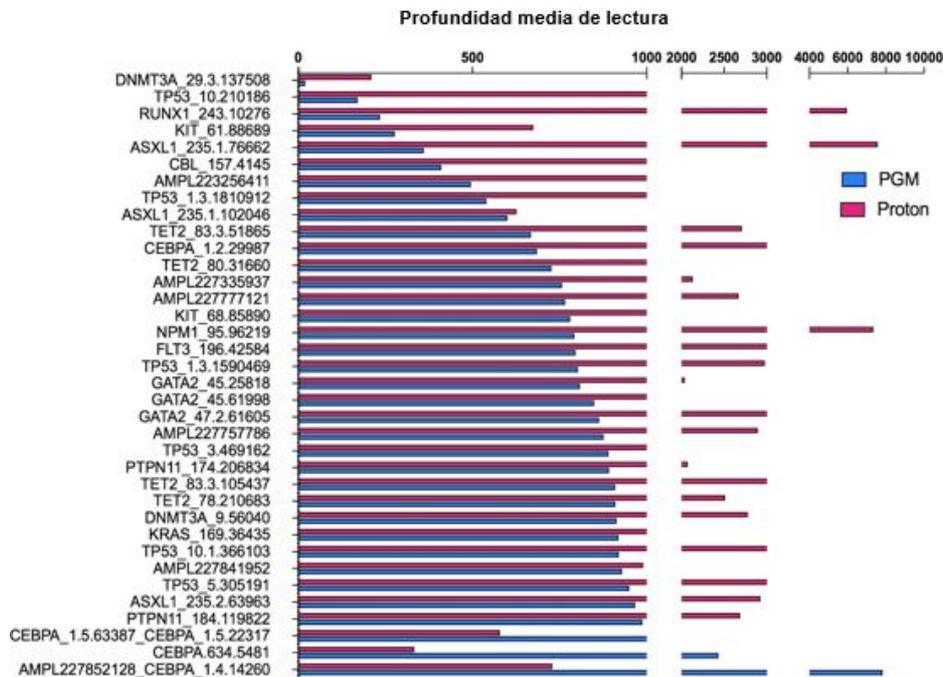
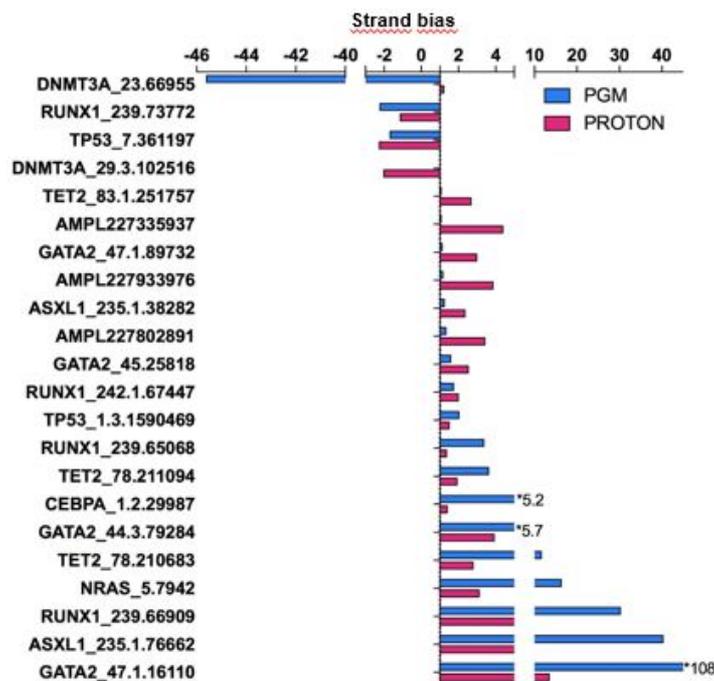


Figura 11. Amplicones con strand bias mayor o igual a 2X. Los valores positivos indican sesgo hacia la cadena sentido y los valores negativos hacia la cadena antisentido. *muestra el valor del strand bias cuando no está indicado en el eje X.



5.2.2. Validez

La secuencia de nucleótidos identificada tras la secuenciación de las líneas celulares OCI3-AML, HCT 116 y HL-60 sin filtrar se comparó con los respectivos genomas de referencia disponibles públicamente. Este análisis mostró una sensibilidad global del 89,2% (IC 95%, 87.55%-90.77%) y una especificidad del 99,9% (IC 95%, 99.87%-99.90%) en las 21.993 posiciones cubiertas por el panel de NGS. Las tablas de contingencia individuales de todas las carreras realizadas se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22. Valores absolutos del experimento de validez. *Genoma de referencia (*gold standard*). Las carreras se refieren a los resultados obtenidos de la secuenciación con el panel de NGS.

		OCI3-AML*				HCT116*	
		Positivo	Negativo			Positivo	Negativo
CARRERA 1	Positivo	949	20	CARRERA 2	Positivo	948	27
	Negativo	101	20923		Negativo	102	20916
	TOTAL	1050	20943		TOTAL	1050	20943
		OCI3-AML*				HL60*	
		Positivo	Negativo			Positivo	Negativo
CARRERA 3	Positivo	938	20	CARRERA 4	Positivo	894	28
	Negativo	112	20925		Negativo	156	20915
	TOTAL	1050	20943		TOTAL	1050	20943
		OCI3-AML*				HCT116*	
		Positivo	Negativo			Positivo	Negativo
CARRERA 5	Positivo	940	30	CARRERA 6	Positivo	948	22
	Negativo	110	20913		Negativo	102	20921
	TOTAL	1050	20943		TOTAL	1050	20943

5.2.3. Precisión y límite de detección

5.2.3.1 Reproducibilidad

La secuenciación de las librerías generadas a partir de muestras de tres pacientes en ambas plataformas (PGM y Proton) tras el filtrado de variantes mostró una concordancia del 100% (Tabla 23). Las muestras empleadas presentaban mutaciones en *CEBPA* y *GATA2* (muestra 1), *IDH2* y *NPM1* (muestra 2) e *IDH2*, *TET2* y *DNMT3A* (muestra 3).

Tabla 23. Reproducibilidad entre las plataformas Ion Proton e Ion PGM.

	Plataforma	VAF (%)		Profundidad de lectura	
		Proton	PGM	Proton	PGM
Muestra 1	CEBPA c.332_339del7	61.25	49.44	511	3519
	CEBPA c.878_880del3	46.83	49.02	662	824
	GATA2 c.1085G>A	45.39	44.07	802	1425
Muestra 2	IDH2 c.419G>A	41.62	46.80	913	1222
	NPM1 c.859_860insTCTG	40.39	47.45	770	1351
	IDH2 c.515G>A	44.60	46.84	1998	1488
Muestra 3	TET2 c.5103G>A	50.33	48.59	1997	1842
	DNMT3A c.1930G>A	45.50	46.56	1345	524
	DNMT3A c.2374_2374delC	44.84	46.84	1967	1844

5.2.3.2 Precisión intermedia y repetibilidad

Las mutaciones existentes se detectaron con una VAF similar a la esperada en todas las muestras con diluciones con ratio 1:5, 1:10 y 1:16 tanto en el experimento de PI como en el de repetibilidad. Sin embargo, en ambos casos, la inserción en *NPM1* fue encontrada con un CV mayor del 20% para la dilución 1:16 (VAF esperada 3%). En las muestras más diluidas (ratio 1:50) la alteración homocigota en *NRAS* (VAF esperada 2%) fue detectada con precisión. Por el contrario, no se detectaron las variantes heterocigotas (*NPM1* y *DNMT3A*, VAF esperada 1%) (Tabla 24).

5.2.3.3 Límite de detección y de cuantificación

En cuanto a las mutaciones puntuales, el límite de detección y el de cuantificación de la variante *NRAS* c.182A>T (p.Gln61Leu) fue de 1.6% y para la variante *DNMT3A* c.2644C>T (p.Arg882Cys) fue 2.4%. Para la inserción *NPM1* c.863_864insTCTG (p.Trp288fs) el límite de detección fue de 3% y el de cuantificación 4.3% (Tabla 24).

Por lo tanto, los experimentos de precisión y límite de detección/cuantificación confirman que el método es capaz de encontrar de manera fiable INDELS y mutaciones puntuales por encima de los límites establecidos en el estudio para la selección de variantes: VAF mínima de 5% y 3% respectivamente.

Tabla 24. Repetibilidad, precisión intermedia y límite de detección del panel de NGS. DE: desviación estándar. CV: coeficiente de variación. A: operador A. B: operador B. ND: no detectado. NC: no calculable.

PRECISIÓN INTERMEDIA Y LÍMITE DE DETECCIÓN		CARRERA		5 - B	4 - A	3 - B	2 - A	MEDIA	DE	CV (%)
		VAF ESPERADA (%)	VAF (%)							
OCI3-AML 1:5	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	10	12.2	10.5	13.3	10.9	11.2	0.6	7.9	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	10	12.2	11.4	10.5	10.7	11.4	0.8	6.6	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	20	19.7	19.0	19.6	19.5	19.4	0.4	1.9	
OCI3-AML 1:10	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	5	4.2	3.6	5.3	4.3	4.5	0.9	19.4	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	5	6.9	9.0	8.9	6.0	9.0	1.2	13.2	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	10	10.6	10.9	10.5	10.6	10.7	0.2	1.9	
OCI3-AML 1:16	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	3	3.0	2.4	2.7	2.6	2.7	0.3	10.5	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	3	3.7	5.8	5.1	5.0	4.9	1.1	22.0	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	6	5.5	5.8	5.7	5.5	5.7	0.2	2.8	
OCI3-AML 1:50	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	1	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	1	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	2	2.3	2.1	2.3	2.3	2.2	0.1	4.8	

REPETIBILIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN		RUN		1	1	2	2	MEDIA	DE [‡]	CV (%)
		VAF ESPERADA (%)	VAF (%)							
OCI3-AML 1:5	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	10	10.9	12.3	11.2	11.5	11.5	0.6	5.2	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	10	10.7	10.2	10.4	10.0	10.3	0.3	2.9	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	20	19.5	19.6	18.9	19.0	19.3	0.4	1.8	
OCI3-AML 1:10	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	5	4.3	4.2	3.6	3.2	3.8	0.5	13.6	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	5	6.0	4.3	5.0	4.7	5.0	0.7	14.5	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	10	10.6	10.4	10.2	9.7	10.2	0.4	3.8	
OCI3-AML 1:16	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	3	2.6	2.0	2.4	2.5	2.4	0.2	10.6	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	3	5.0	4.2	3.0	4.4	4.2	0.8	20.2	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	6	5.5	5.4	5.6	5.3	5.5	0.1	2.4	
OCI3-AML 1:50	<i>DNMT3A</i> c.2644C>T	1	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	
	<i>NPM1</i> c.863_864insTCTG	1	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	
	<i>NRAS</i> c.182A>T	2	2.3	1.6	2.0	2.0	2.0	0.3	14.5	

5.3. Validación clínica del panel de NGS

5.3.1. Caracterización molecular mediante NGS

El panel de secuenciación dirigida detectó 4341 variantes en los 162 pacientes estudiados. Tras aplicar los filtros, se seleccionaron 339 variantes en 18 genes de los 19 analizados. La profundidad media de lectura y la frecuencia alélica media para estas mutaciones fueron de 1.592,52 (107-4.000) y 36,43% (3-99,63) respectivamente. Un 64% (n=216) de las variantes identificadas fueron mutaciones puntuales o SNV (*Single Nucleotide Variations*) y un 36% (n=123) INDELS. En cuanto a la distribución por genes se encontraron 64 mutaciones en *NPM1*, 52 en *DNMT3A*, 28 en *CEBPA*, 25 en *NRAS*, 23 en *TET2*, 19 en *IDH2*, 18 en *TP53*, 16 en *FLT3*, 15 en *RUNX1*, 13 en *GATA2* y *KIT*, 12 en *ASXL1*, 11 en *PTPN11* e *IDH1*, 9 en *WT1*, 7 en *KRAS*, 2 en *CBL* y 1 en *BRAF*. La distribución por gen y paciente se muestra en la Figura 12 y todas las variantes encontradas se detallan en la Tabla complementaria I. La media de mutaciones por muestra detectadas mediante el panel de NGS fue de 2,09 (rango, 0-8). Considerando las mutaciones en *FLT3*-ITD (n=37), detectadas por métodos convencionales, el número total de alteraciones moleculares encontradas en la serie de estudio fue de 376, con una media de 2,32 mutaciones por muestra. Un 92% (n=149) de los pacientes mostraron al menos una alteración molecular. Teniendo en cuenta la citogenética, el 96% (n=156) de los pacientes estudiados portaba alteraciones. De los 6 pacientes que no mostraron ningún cambio genético, el cariotipo no fue valorable en uno de ellos.

En los genes cuya secuencia codificante completa estaba cubierta por el panel, se analizó la distribución de las mutaciones a lo largo del gen (Figura 13). En *CEBPA* la mayoría de las mutaciones (61,5%) se localizaron en el dominio BZIP (en el extremo C-terminal de la proteína) mientras que un 15,4% se situaron en el dominio TAD1 (extremo N-terminal). Las mutaciones en *DNMT3A* se distribuyeron a lo largo de toda su secuencia codificante, con un 61,5% en el codón R882. En el gen *GATA2* las mutaciones se situaron alrededor de los dos dedos de zinc en el extremo C-terminal. Las mutaciones en *TET2* se localizaron principalmente en el dominio enzimático entre los aminoácidos 1100 y 1950. Por último, en *TP53* las mutaciones se agruparon en el dominio de unión al ADN entre los aminoácidos 100 y 300.

Figura 12. Distribución de todas las mutaciones detectadas por gen y paciente.

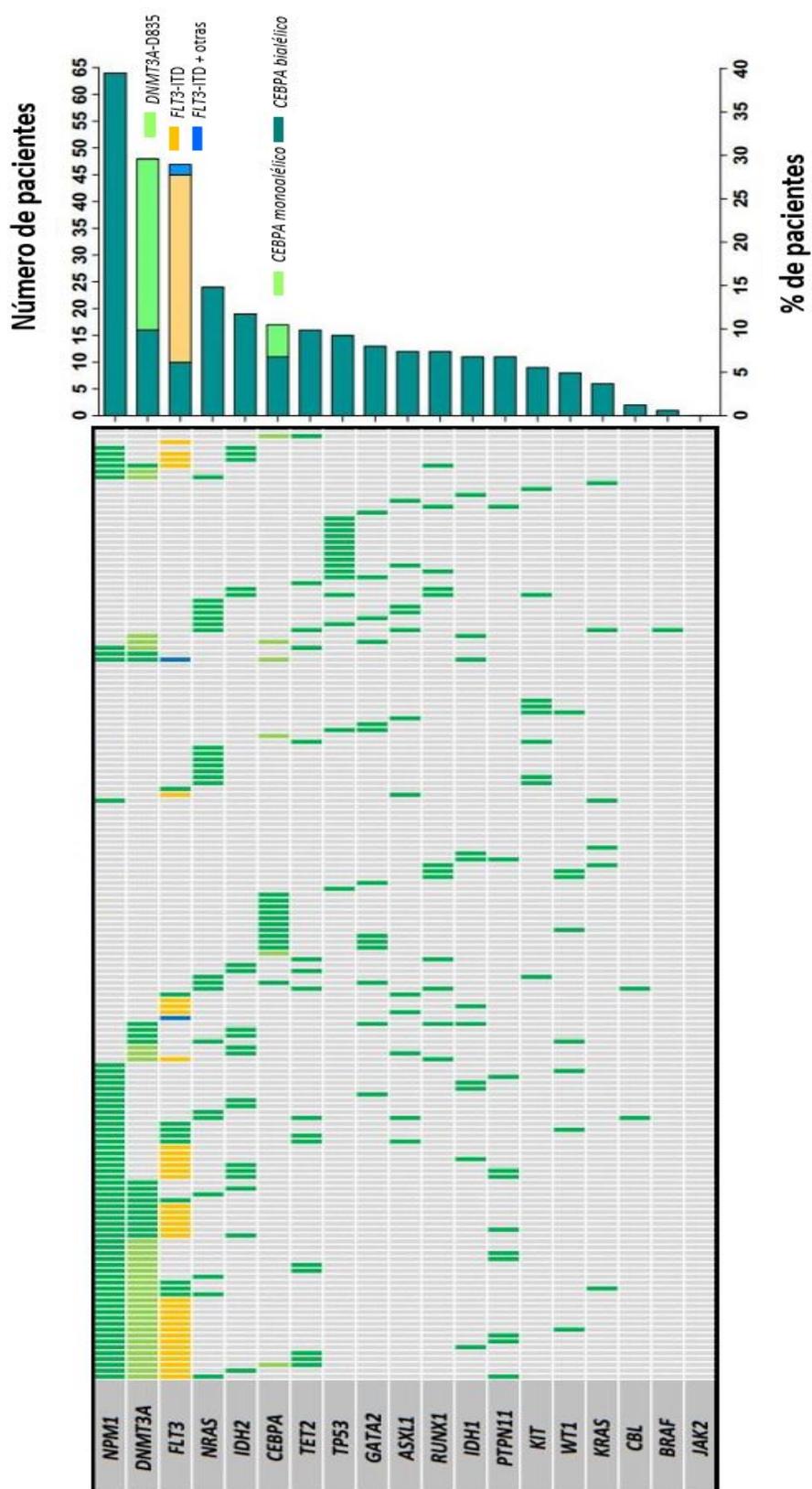
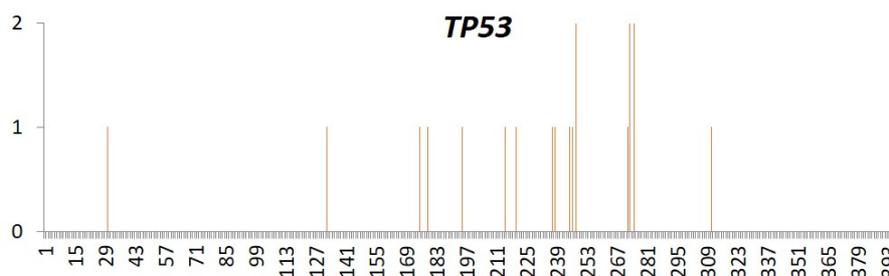
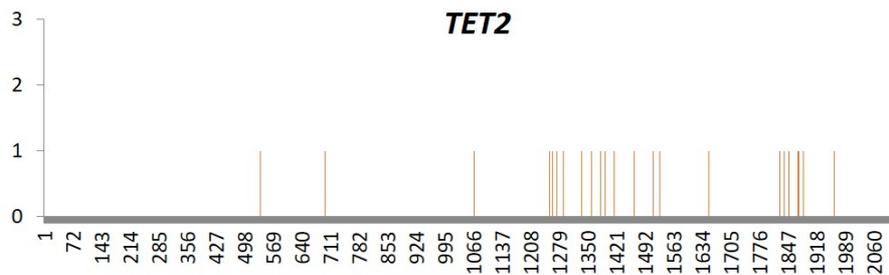
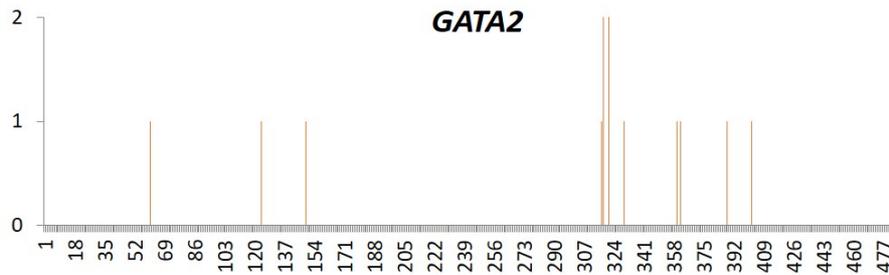
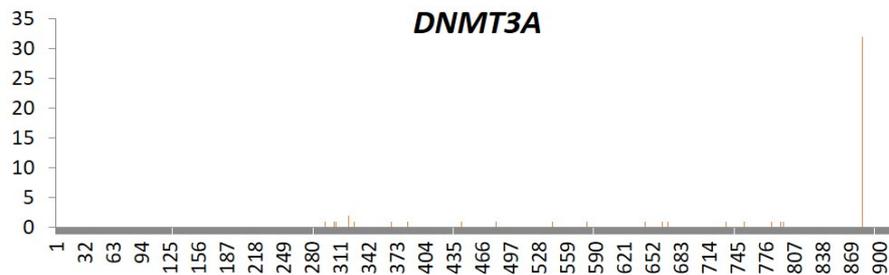
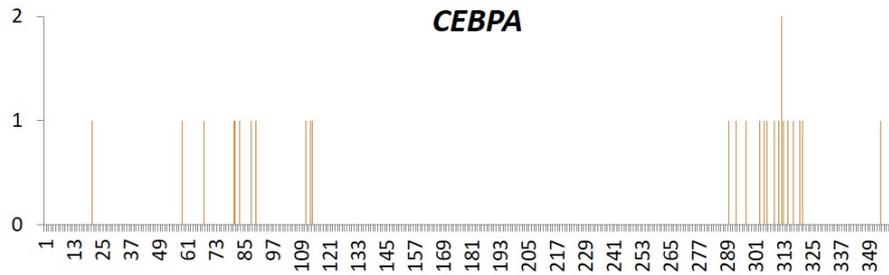


Figura 13. Posición y frecuencia de las mutaciones encontradas con el panel de NGS.

Número de mutaciones



5.3.2. Sensibilidad analítica

Para demostrar la capacidad del método para detectar mutaciones clínicamente relevantes se compararon los resultados del panel de NGS en los 162 pacientes incluidos en el estudio con los obtenidos en la caracterización molecular realizada de rutina al diagnóstico de la LMA.

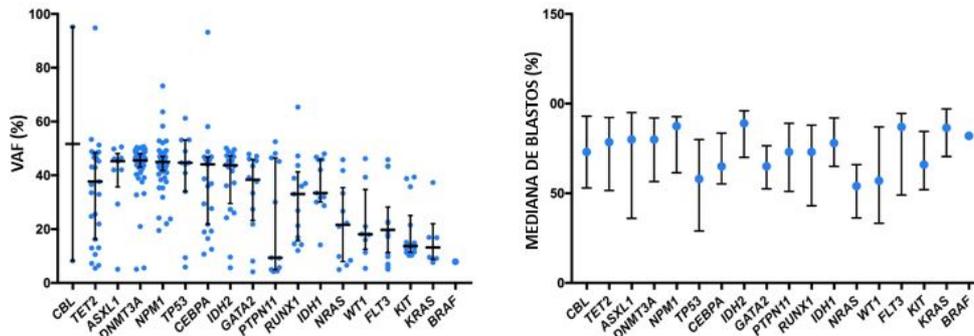
Las técnicas convencionales al diagnóstico mostraron mutaciones de *NPM1* (p.T288fs) en 56 pacientes, *FLT3*-ITD en 37 pacientes, mutaciones en *FLT3*-D835 en 4 pacientes y 13 mutaciones en *CEBPA* (7 pacientes). Excluyendo *FLT3*-ITD (no incluido en el diseño del panel), todas las alteraciones moleculares encontradas por técnicas convencionales (n=73) fueron detectadas por el panel de NGS. Por lo tanto, la sensibilidad y la especificidad del panel de NGS fueron ambas del 100%. Además, el panel reveló 17 mutaciones adicionales. De ellas, 8 se encontraban fuera de la región de estudio de las técnicas convencionales y 9 habían sido consideradas previamente como negativas (5 en *NPM1*, 3 en *FLT3*-D835 y 1 en *CEBPA*). Estas 9 mutaciones discrepantes se confirmaron mediante secuenciación directa (método de Sanger). La nueva mutación detectada en *CEBPA* se trató de una mutación puntual, por lo tanto, no puede ser detectada mediante electroforesis capilar, el método convencional empleado previamente.

Además, en los casos con muestra disponible, se confirmaron mediante secuenciación directa el 100% de las mutaciones detectadas por el panel de NGS con VAF superior al 15% en los genes *BRAF* (V600), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140, R172), *TET2* y *RUNX1*.

5.3.3. Análisis de la VAF

Las mutaciones en genes relacionados con las vías de señalización (*FLT3*, *KIT*, *KRAS*, *BRAF*) mostraron una VAF media inferior, mientras que las mutaciones relacionadas con estados preleucémicos (*TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*) presentaron una VAF media más alta, independientemente del porcentaje de blastos ($p < 0,001$) (Figura 14).

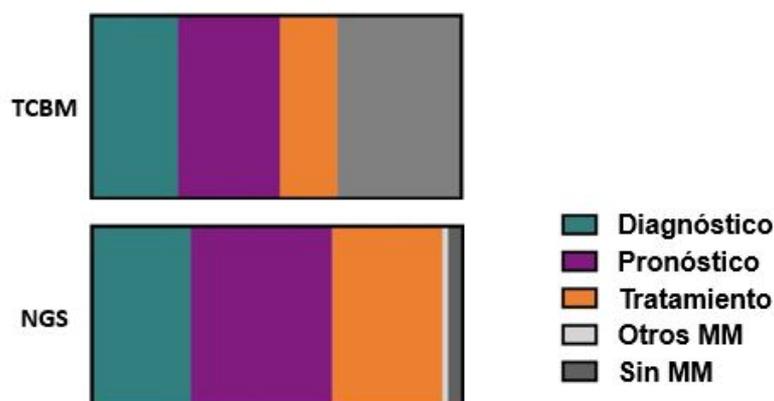
Figura 14. Carga mutacional por gen. VAF por gen (izquierda). Cada punto representa una mutación, la VAF media está representada por una línea horizontal, las líneas verticales representan el rango intercuartílico; Mediana de blastos por gen en la serie de estudio (derecha). Los puntos representan la mediana del % de blastos y las líneas verticales el rango intercuartílico.



5.3.4. Impacto clínico

Se valoró la capacidad del panel para detectar marcadores moleculares útiles para el diagnóstico, pronóstico o tratamiento frente a las técnicas convencionales rutinarias. El panel de NGS estudiado reveló marcadores moleculares en un 88,9% de los pacientes frente al 45,7% encontrado mediante las técnicas convencionales (Figura 15).

Figura 15. Número de pacientes con marcadores moleculares útiles para el diagnóstico (*NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*), pronóstico (*NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *FLT3*, *IDH2-R172*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *TP53*) o tratamiento (*FLT3*, *IDH1/2*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*). TCBM: Técnicas convencionales de biología molecular. MM: marcadores moleculares.



5.4. Clasificación y pronóstico

El estudio mediante NGS permitió categorizar a los pacientes de la serie de estudio de acuerdo con las nuevas recomendaciones basadas en los criterios OMS 2017 (diagnóstico) y ELN 2017 (pronóstico) y la clasificación genómica, que incluyen nuevos criterios moleculares.

5.4.1. Clasificación

Acorde a la clasificación OMS 2017, un 18,5% (n=30) de los casos presentaban anomalías citogenéticas recurrentes, un 45,6% (n=74) mostraron alteraciones moleculares recurrentes, un 3,7% (n=6) se encuadraron dentro de las categorías provisionales, un 20% (n=32) mostraron cambios relacionados con la mielodisplasia y un 12,3% (n=20) permanecieron dentro del grupo de LMA no especificada. La distribución detallada se refleja en la Tabla 25.

Tabla 25. Clasificación OMS 2017 de la serie de estudio.

Clasificación OMS 2017	Serie de estudio n (%)
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	
Citogenéticas	30 (18,5)
LMA con t(8;21); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9 (5,5)
LMA con inv(16) o t(16;16); <i>CBFB-MYH11</i>	15 (9,3)
LMA con t(9;11); <i>KMT2A -MLLT3</i>	2 (1,2)
LMA con t(6;9); <i>DEK-NUP214</i>	1 (0,6)
LMA con inv(3) o t(3;3); <i>GATA2, MECOM</i>	3 (1,8)
Moleculares	80 (49,4)
LMA con <i>NPM1</i> mutado	63 (38,9)
LMA con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i>	11 (6,8)
LMA con <i>RUNX1</i> mutado (entidad provisional)	6 (3,7)
LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia	32 (20)
LMA no especificada (NOS)	20 (12,3)
LMA con mínima diferenciación	2 (1,2)
LMA sin maduración	7 (4,3)
LMA con maduración	6 (3,7)
Leucemia aguda mielomonocítica	2 (1,2)
Leucemia aguda monoblástica/monocítica	3 (1,9)

5.4.2. Clasificación genómica

En cuanto a la clasificación genómica, la mayoría de los pacientes (más de un 35%) se englobaron en el subgrupo con mutaciones en *NPM1*, seguido del subgrupo con mutaciones en *TP53* y/o aneuploidías cromosómicas (más de un 10%). Entre un 6% y un 10% de los pacientes se clasificaron en los subgrupos con mutaciones en genes de splicing y/o modificadores de la cromatina, cariotipo con inv(16) o t(16,16), mutaciones bialélicas en el gen *CEBPA* y mutaciones en otros genes conductores. Con menor frecuencia (entre un 6% y un 3%) se detectaron la traslocación t(8,21), la inv(3) y mutaciones en el codón 172 de *IDH2* (Tabla 26). Los grupos menos representados (menos de un 3%) fueron los que presentaban genes de fusión con *MLL* y t(6,9). Únicamente 6 pacientes (3,7%) no presentaron mutaciones conductoras en los genes analizados y 5 (3,1%) pacientes cumplieron criterios de 2 o más subgrupos.

Tabla 26. Clasificación genómica de los pacientes de la serie de estudio.

Clasificación genómica	Serie de estudio n (%)
LMA con <i>NPM1</i> mutado	59 (36,4)
LMA con mutaciones en genes de splicing y/o modificadores de cromatina	11 (6,8)
LMA con mutaciones en <i>TP53</i> y/o aneuploidias cromosómicas	23 (14,2)
LMA con inv(16) o t(16,16)	14 (8,6)
LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEBPA</i>	11 (6,8)
LMA con t(8,21)	9 (5,5)
LMA con genes de fusión con <i>MLL</i>	2 (1,2)
LMA con inv(3)	5 (3,1)
LMA con mutaciones en <i>IDH2-R172</i>	5 (3,1)
LMA con t(6,9)	1 (0,6)
LMA con otras mutaciones <i>driver</i>	11 (6,8)
LMA sin mutaciones <i>driver</i>	6 (3,7)
LMA con criterios de ≥ 2 grupos genómicos	5 (3,1)
TOTAL	162

5.4.3. Clasificación ELN 2017

Se estableció el pronóstico de los pacientes de la serie de estudio de acuerdo a los grupos de riesgo definidos por la ELN según la clasificación de 2017 (Dohner, H. *et*

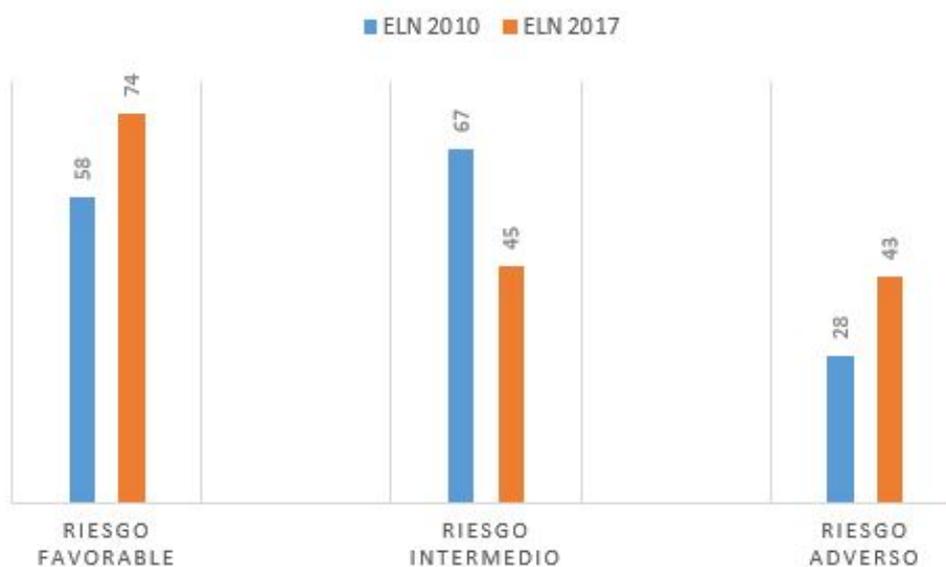
Resultados

al, 2017) (Tabla 27). El empleo de unos criterios moleculares ampliados respecto al estándar previo (ELN 2010) permite asignar más pacientes a los grupos de riesgo bajo (30% vs 45,7%) y alto (17% vs 26,5%), disminuyendo notablemente el porcentaje de pacientes pertenecientes al subgrupo de riesgo intermedio (40% vs 27,7%). Ciento veinticinco pacientes se mantienen en los grupos asignados según los criterios de 2010 (57 riesgo bajo, 40 riesgo intermedio y 28 riesgo alto). Veintiocho pacientes (18% de la serie de estudio) se reasignan a otro grupo de riesgo diferente: 1 paciente pasa de riesgo bajo a riesgo intermedio, 13 pacientes de riesgo intermedio (6 de riesgo intermedio I y 7 de riesgo intermedio II) a riesgo bajo y 14 pacientes de riesgo intermedio (7 de riesgo intermedio I y 7 de riesgo intermedio II) a riesgo alto (Figura 16).

Tabla 27. Grupos de riesgo de la serie de estudio según los criterios ELN 2017.

Grupos de riesgo ELN 2017	Serie de estudio n (%)
Riesgo bajo	74 (45,7)
Riesgo intermedio	45 (27,7)
Riesgo alto	43 (26,5)
TOTAL	162

Figura 16. Pacientes asignados a cada grupo de riesgo según los criterios establecidos por la ELN 2010 y 2017. El porcentaje detallado sobre la columna corresponde a la proporción de pacientes en el grupo de riesgo correspondiente respecto a la n de la serie de estudio.



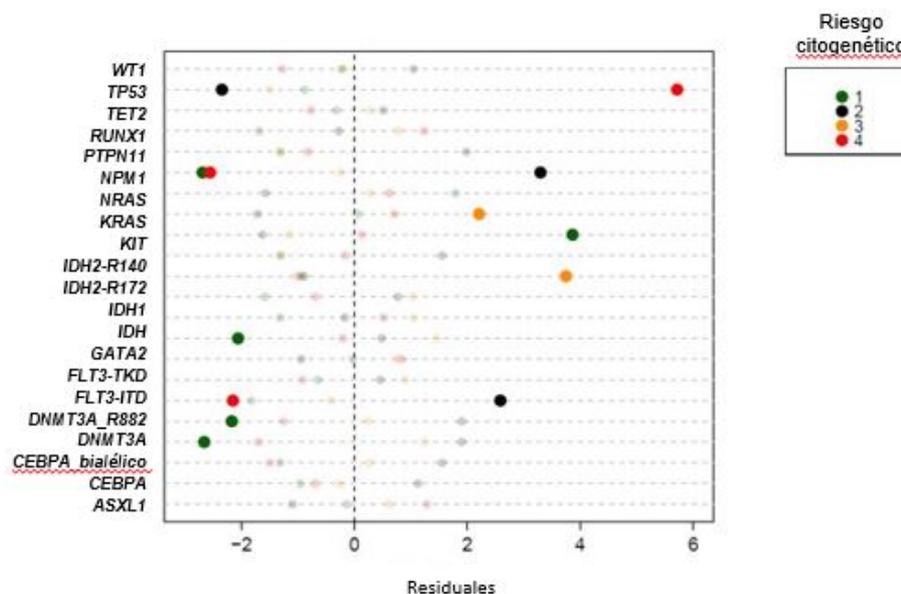
5.5. Relación entre las alteraciones genéticas

5.5.1. Relación del perfil mutacional y los grupos citogenéticos

Las mutaciones en *TP53* se asociaron fuertemente a la citogenética de alto riesgo y al CC ($p < 0,01$). Se encontró una asociación significativa entre las alteraciones genéticas en *KIT* y *NRAS* y los pacientes con cariotipo de bajo riesgo ($p = 0,01$), esta relación fue especialmente marcada en los casos con *inv(16)*. Entre los pacientes de citogenética de riesgo intermedio, se relacionaron con CN las mutaciones en los genes *NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A* ($p < 0,01$), *PTPN11* y *CEBPA* ($p = 0,03$). Se asociaron con cariotipo de riesgo intermedio diferente de normal las mutaciones en *IDH* ($p = 0,04$), a expensas fundamentalmente de *IDH2-R172* que se relacionó significativamente a la trisomía del cromosoma 8 ($p = 0,04$).

Por el contrario, las mutaciones en *KRAS* y el CN fueron excluyentes entre sí ($p < 0,01$). También resultaron excluyentes las mutaciones en *NPM1* y en *FLT3-ITD* con el CC ($p = 0,04$ y $p = 0,02$ respectivamente) (Figura 17).

Figura 17. Asociación entre mutaciones y riesgo citogenético. La desviación respecto a los valores esperados se señala empleando los residuales del chi-cuadrado de Pearson. Riesgo citogenético: 1 = Favorable; 2 = CN; 3= Intermedio, no CN; 4= Adverso



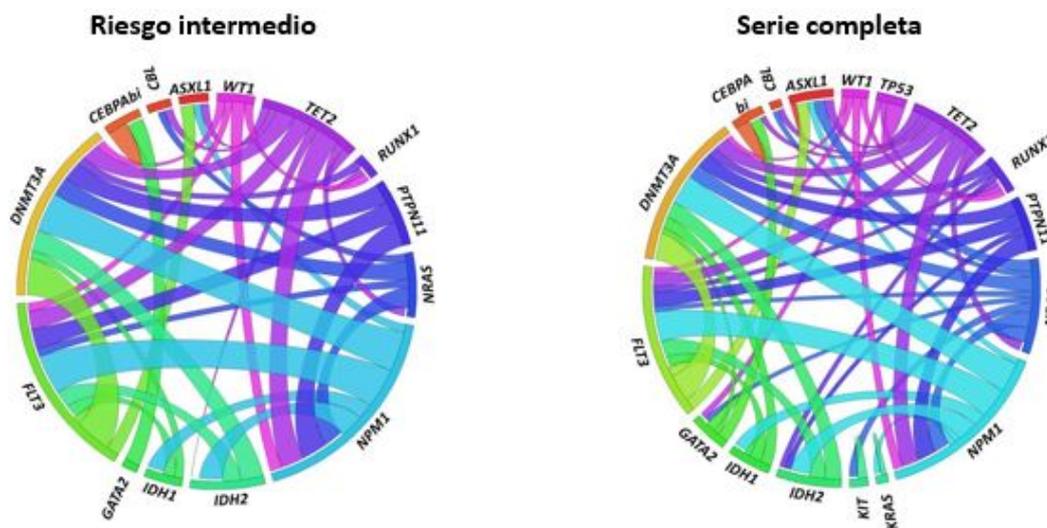
5.5.2. Número de mutaciones

Los pacientes de riesgo intermedio y el subgrupo de CN fueron portadores de un mayor número de mutaciones en comparación con los pacientes de riesgo favorable y adverso ($p < 0,01$). Cuando coexistieron 3 o más mutaciones en un mismo paciente los genes más frecuentemente involucrados fueron *NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*, *PTPN11*, *TET2* e *IDH* (especialmente *IDH2-R140*) ($p < 0,05$). Por el contrario, las alteraciones en *TP53* raramente se acompañaron de mutaciones adicionales ($p = 0,04$).

5.5.3. Asociaciones y exclusiones entre genes

Se encontró una relación significativa en la serie de estudio entre los genes *NPM1-FLT3-DNMT3A* ($p < 0,01$). Este triplete de genes también se asoció con *PTPN11* ($p < 0,05$). Otras asociaciones estadísticamente significativas fueron las siguientes: *CEBPA-GATA2* ($p < 0,01$), *NPM1-FLT3-ITD-IDH2-R140* ($p < 0,03$), *DNMT3A-IDH2-R172* ($p = 0,03$), *NRAS-CBL* ($p = 0,02$) y *TET2-CBL* ($p < 0,01$) (Figura 18).

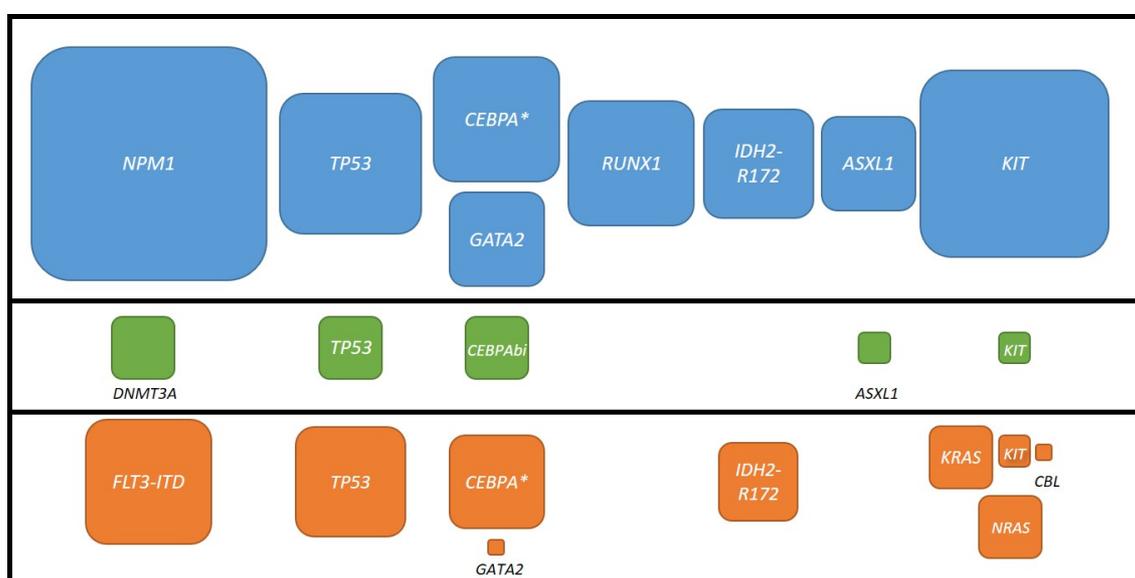
Figura 18. Diagrama de circos que muestra los patrones de asociación génica en los pacientes de riesgo citogenético intermedio (izquierda) y la serie completa (derecha).



El análisis MEGS reportó 26 grupos de genes excluyentes mutuamente que incluían un total de 14 genes (Figura IV), siendo *TP53* el gen más excluyente al estar presente en 20 de esos grupos. Estos grupos se resumen en tres conjuntos de genes que se detallan en la Figura 19. El grupo más significativo contenía los genes *NPM1*, *KIT*, *TP53*, *CEBPA*, *RUNX1*, *IDH2-R172* y *ASXL1*.

Figura 19. Esquema de las relaciones de exclusión entre los genes en nuestra serie de pacientes, resumidas en tres conjuntos de genes (azul, verde y naranja).

El tamaño del cuadrado es proporcional al número de grupos del MEGS en el que gen está incluido. Los genes no excluyentes entre sí dentro de cada conjunto están posicionados en vertical. *CEBPA**: Incluye mutaciones monoalélicas y bialélicas en el gen. *CEBPAbi*: únicamente incluye las mutaciones bialélicas.



5.6. Relación entre las alteraciones moleculares y las características clínicas e inmunofenotípicas

5.6.1. Alteraciones moleculares y características clínicas

Los portadores de doble mutación en *CEBPA* mostraron una edad inferior al diagnóstico. Por el contrario, las mutaciones en *TET2*, *DNMT3A-R882*, *TP53* y *NPM1* se asociaron a pacientes de mayor edad. Las mutaciones en *NPM1*, *FLT3* y *DNMT3A* se asociaron con mayor recuento leucocitario al diagnóstico y al sexo femenino; mientras que una presentación pancitopénica de la LMA fue más frecuente en los pacientes con mutaciones en *TP53*, *IDH1* y en *GATA2*. Los pacientes con mutaciones

Resultados

en *CEBPA* presentaron con menos frecuencia anemia al diagnóstico y más trombopenia. Un recuento plaquetar bajo también se asoció a las mutaciones en *FLT3-D835* mientras que, por el contrario, las mutaciones en *IDH* se relacionaron con menos trombopenia, especialmente en *IDH2-R172*. En la serie de estudio las mutaciones en *KRAS* y *TP53* se observaron más frecuentemente en pacientes con peor estado general al diagnóstico (ECOG 2-4). Las alteraciones en *TP53* y *NRAS* se asociaron con mayor frecuencia a displasia trilineal (Tabla 28).

Tabla 28. Variables clínicas y genes que mostraron una correlación significativa.

Variable	Gen	Mutado (%)	No mutado (%)	p
Edad (>50 años)	<i>CEBPA</i> bi	18,2	56,3	0,014
	<i>TET2</i>	87,4	50	0,004
	<i>DNMT3A-R882</i>	53,1	33,8	0,044
	<i>TP53</i>	46,7	22,4	0,038
	<i>NPM1</i>	65,6	45,9	0,014
Sexo Femenino	<i>FLT3-ITD</i>	56,8	36,1	0,026
	<i>DNMT3A</i>	56,3	34,2	0,009
	<i>NPM1</i>	54,7	31,6	0,004
Leucocitos > 50x10 ⁹ /L	<i>FLT3-ITD</i>	43,2	12,6	< 0,001
	<i>DNMT3A</i>	35,4	11,2	0,001
	<i>NPM1</i>	31,3	12,2	0,003
Anemia	<i>CEBPA</i>	41,2	73,1	0,007
Trombopenia	<i>CEBPA</i>	100	73,8	0,016
	<i>FLT3-D835</i>	100	74,7	0,046
	<i>IDH2-R172</i>	20	78,3	0,002
Pancitopenia	<i>IDH1</i>	36,4	7,3	0,001
	<i>GATA2</i>	30,8	7,4	0,005
	<i>TP53</i>	40	6,1	< 0,001
ECOG 2-4	<i>KRAS</i>	50	16,8	0,038
	<i>TP53</i>	46,7	15,1	0,002
Displasia trilineal	<i>NRAS</i>	25	8,8	0,02
	<i>TP53</i>	40	8,2	< 0,001

5.6.2. Alteraciones moleculares y marcadores inmunofenotípicos

Se observaron perfiles inmunofenotípicos asociados con algunas mutaciones. Por ejemplo, los pacientes con mutaciones en *CEBPA* expresaron frecuentemente CD7 y CD34, siendo negativos para CD11b y CD4. Los pacientes con mutaciones en *NPM1*, *FLT3*-ITD y *DNMT3A* mostraron perfiles de expresión similares con ausencia de CD34. *NPM1* y *FLT3* se relacionan con la expresión de CD4, mientras que *NPM1* y *DNMT3A* se asociaron con la presencia de CD14, CD36 y CD11b.

5.7. Respuesta al tratamiento de inducción

Ciento veintidós pacientes (75%) alcanzaron una respuesta (completa o parcial) al tratamiento de inducción. Cuarenta pacientes no alcanzaron respuesta, de ellos, 26 (16%) fueron refractarios y 14 (9%) murieron durante la inducción.

5.7.1. Análisis de factores con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción

5.7.1.1 Análisis univariante

En el análisis univariante, las variables clínicas con impacto pronóstico adverso en la respuesta al tratamiento en este estudio fueron la edad mayor de 50 años y la presentación hiperleucocitaria, asociándose ambas variables con una mayor mortalidad durante la inducción.

En cuanto a las variables genéticas, la citogenética de riesgo alto y el CC mostraron significativamente una menor tasa de respuesta. Las mutaciones en *RUNX1* y *TP53* se asociaron con resistencia al tratamiento y las alteraciones moleculares en *FLT3* con mayor tasa de mortalidad durante la inducción. Los pacientes con mutaciones en *NPM1* sin alteraciones en *FLT3*-ITD mostraron una mayor tasa de respuesta respecto a aquellos pacientes sin cambios en *NPM1* o con mutaciones en ambos genes ($p=0,04$). Este último grupo de pacientes (*NPM1* mutado/*FLT3*-ITD mutado) presentó una peor respuesta al tratamiento de inducción asociada a un incremento de mortalidad ($p=0,035$) (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción. CTG: Citogenética.

Variable	n	Respuesta (%)	Resistencia (%)	Muerte (%)	p
Edad (años)					
< 50	75	84	15	1	0,006
> 50	87	68	17	15	
Leucocitos (x10⁹/L)					
<50	130	77	18	5	0,009
>50	32	69	11	22	
CTG riesgo alto					
No	122	83	10	7	< 0,001
Sí	31	45	45	10	
Cariotipo complejo					
No	135	78	13	8	0,004
Sí	18	50	44	6	
FLT3					
No mutado	111	78	17	4	0,03
Mutado	47	70	12	17	
RUNX1					
No mutado	150	77	14	8	0,04
Mutado	12	50	41	8	
TP53					
No mutado	145	78	13	9	0,003
Mutado	15	47	47	7	
NPM1/FLT3-ITD					
NPM1-/FLT3-ITD-	95	75	20	5	0,04
NPM1+/FLT3-ITD-	32	88	6	6	
NPM1+/FLT3-ITD+	30	67	13	20	

Por último, la clasificación de riesgo citogenético, la ELN 2017 y la clasificación genómica mostraron valor pronóstico en la respuesta a la inducción ($p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,01$, respectivamente). El riesgo citogenético adverso se asoció con una mayor tasa de resistencia al tratamiento, sin observarse diferencias en cuanto a la respuesta entre los grupos citogenéticos de riesgo favorable e intermedio (88% vs 82%). La clasificación de la ELN 2017 mostró una tasa de respuesta decreciente en función del riesgo (86%, 76% y 56% para los grupos favorable, intermedio y adverso respectivamente), con una tasa de resistencia a la inducción marcadamente superior en el grupo de riesgo desfavorable (37%, 13% y 5%, respectivamente). En cuanto a la clasificación genómica, los pacientes con mutaciones en *TP53* y/o aneuploidías

cromosómicas, los portadores de la inversión del cromosoma 3 y, en menor medida, los pacientes con mutaciones en los genes de splicing y/o modificadores de cromatina se asociaron con resistencia al tratamiento (48%, 40% y 27% respectivamente) (Tabla 30).

Tabla 30. Impacto en la respuesta al tratamiento de inducción según los grupos de riesgo de las clasificaciones citogenética, ELN 2017 y genómica.

Grupo de riesgo	n	Respuesta (%)	Resistencia (%)	Muerte (%)	p
Citogenética					
Favorable	24	88	4	8	< 0,001
Intermedio	98	82	11	7	
Adverso	31	45	45	10	
ELN 2017					
Favorable	74	86	5	8	< 0,001
Intermedio	45	76	13	11	
Adverso	43	56	37	7	
Clasificación genómica					
<i>NPM1</i> mutado	59	78	8	13	0,01
Genes de splicing y/o modificadores de cromatina	11	73	27	0	
<i>TP53</i> y/o aneuploidias cromosómicas	23	44	48	9	
inv(16) o t(16,16)	14	93	0	7	
<i>CEBPAbi</i>	11	91	9	0	
t(8,21)	9	78	11	11	
Genes de fusión con <i>MLL</i>	2	100	0	0	
inv(3)	5	40	40	20	
<i>IDH2-R172</i>	5	80	20	0	
t(6,9)	1	0	100	0	
Otras mutaciones <i>driver</i>	11	91	0	9	
Sin mutaciones <i>driver</i>	6	100	0	0	

5.7.1.2 Análisis multivariante

El análisis multivariante demostró como factores pronóstico independientes desfavorables la edad mayor a 50 años, el cariotipo de riesgo adverso citogenético y la presencia de mutaciones en *FLT3* (Tabla 31, Figura 20).

Figura 20. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción.

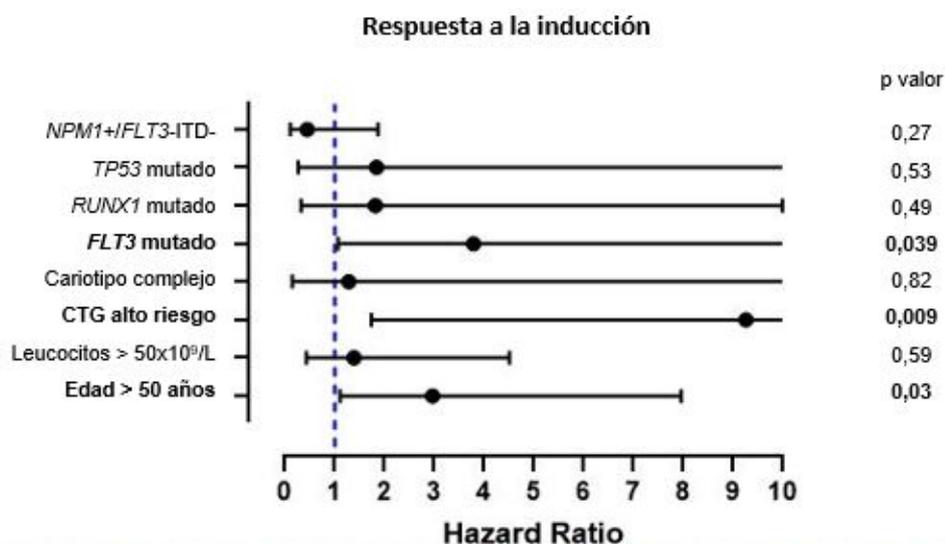


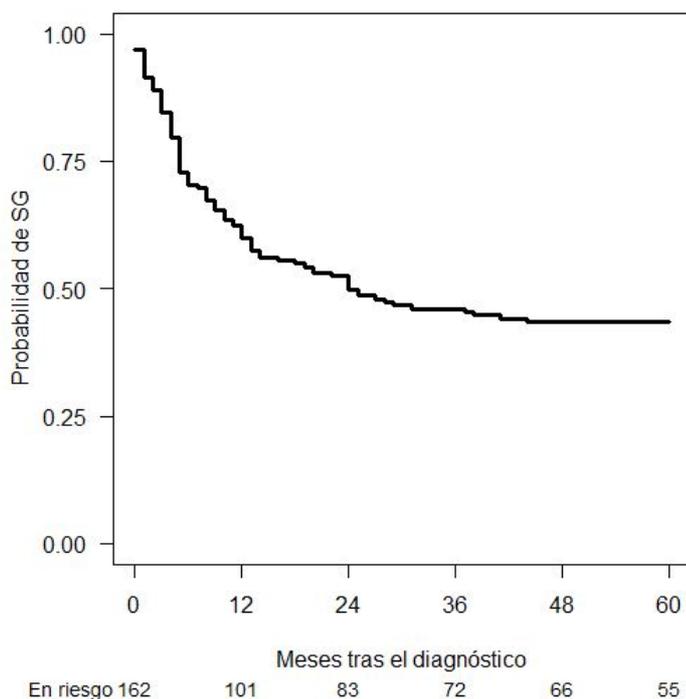
Tabla 31. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento de inducción. CTG: citogenética.

Variable	p	HR	IC 95%
Edad > 50 años	0,03	2,97	1,11 – 7,96
Leucocitos >50x10 ⁹ /L	0,59	1,39	0,43 – 4,51
CTG alto riesgo	0,009	9,26	1,74 – 49,27
Cariotipo complejo	0,82	1,28	0,15 – 10,59
<i>FLT3 mutado</i>	0,039	3,79	1,07 – 13,42
<i>RUNX1 mutado</i>	0,49	1,82	0,33 – 9,99
<i>TP53 mutado</i>	0,53	1,84	0,27 – 12,72
<i>NPM1+/FLT3-ITD-</i>	0,27	0,45	0,11 – 1,87

5.8. Supervivencia

5.8.1. Supervivencia global (SG)

Sesenta y dos pacientes (38%) continuaban vivos con una mediana de seguimiento tras el diagnóstico de 77 meses (15 – 217). La mediana de SG fue de 24 meses y la SG a los 5 años fue del 43,5 % (IC 95%, 36,5-51,9) (Figura 21).

Figura 21. SG, curva de Kaplan-Meyer.

5.8.1.1 Análisis de factores pronóstico con impacto en la SG

5.8.1.1.1 Análisis univariante

Las variables clínicas con valor pronóstico desfavorable en la SG fueron la edad mayor de 50 años, el ECOG igual o superior a 2, la hiperleucocitosis al diagnóstico superior a $50 \times 10^9/L$ y la ausencia de respuesta al tratamiento de inducción.

El CC y el subgrupo de la clasificación genómica que engloba CC, aneuploidías y mutaciones de *TP53* mostraron un impacto pronóstico adverso, mientras que los pacientes portadores de la inversión del cromosoma 16 o $t(16,16)$ presentaron una mayor SG. Dentro de las alteraciones moleculares, las mutaciones en *FLT3*-ITD y *TP53* se asociaron con inferior SG y los pacientes con *NPM1* positivo y *FLT3*-ITD no mutado se relacionaron con una SG más prolongada (Tabla 32, Figura 22).

Tabla 32. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la SG.

Variable	n	Mediana (meses)	SG a 5 años (%)	IC 95%	p
Edad (años)					
< 50	75	99	57	46,7 – 69,4	<0,001
> 50	87	11	31,9	23,4 – 43,4	
ECOG					
0-1	132	44	49,6	41,8 – 59	<0,001
2-4	29	6	17,2	7,7 – 38,3	
Leucocitos (x10⁹/L)					
<50	130	29	47,4	39,5 – 56,8	0,02
>50	32	13	27,5	15,5 – 48,6	
Respuesta a inducción					
No	40	3	17,5	8,9 – 34,3	<0,001
Sí	122	68	52	43,8 – 61,7	
CG TP53/CC					
No	135	41	48,5	40,7 – 57,8	<0,001
Sí	27	6	18,5	8,4 – 40,9	
Inv(16) / t(16,16)					
No	147	22	41,1	33,8 – 49,9	0,04
Sí	15	NA	66,7	46,6 - 95,3	
Cariotipo complejo					
No	135	37	47	39,3 – 56,3	<0,001
Sí	18	5,5	16,7	5,9 – 46,8	
NPM1/FLT3-ITD					
NPM1-/FLT3-ITD-	95	28	42,5	33,5 – 53,8	0,03
NPM1+/FLT3-ITD-	32	105	62,5	47,8 – 81,7	
NPM1+/FLT3-ITD+	30	12	30	17,4 – 51,8	
FLT3-ITD					
No mutado	119	68	50,1	41,8 – 60	0,03
Mutado	37	12	26,5	15,4 – 45,6	
TP53					
No mutado	147	31	46,6	39,1 – 55,4	<0,001
Mutado	15	5	13,3	3,8 – 48,4	

Figura 22. SG en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante.

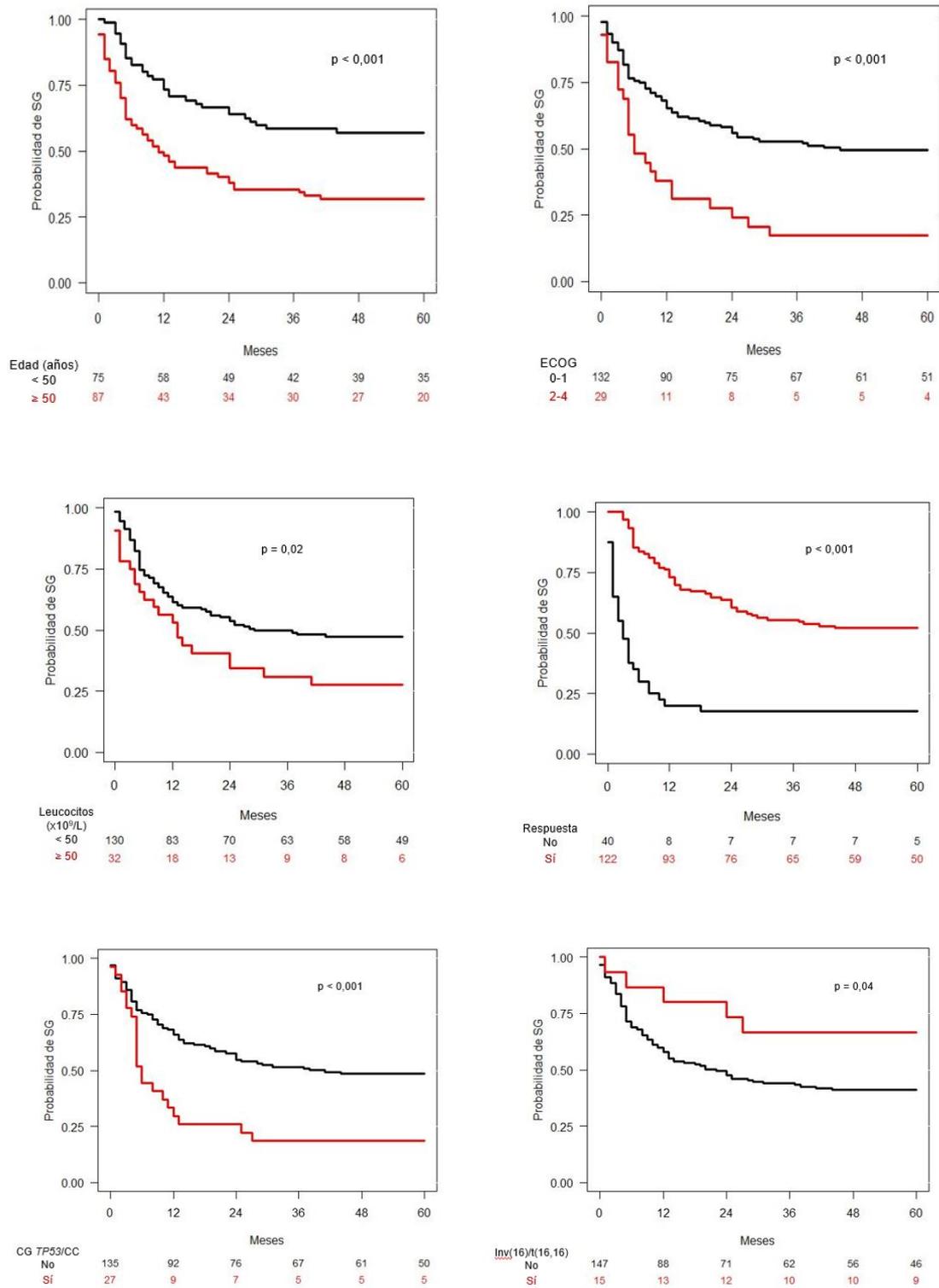
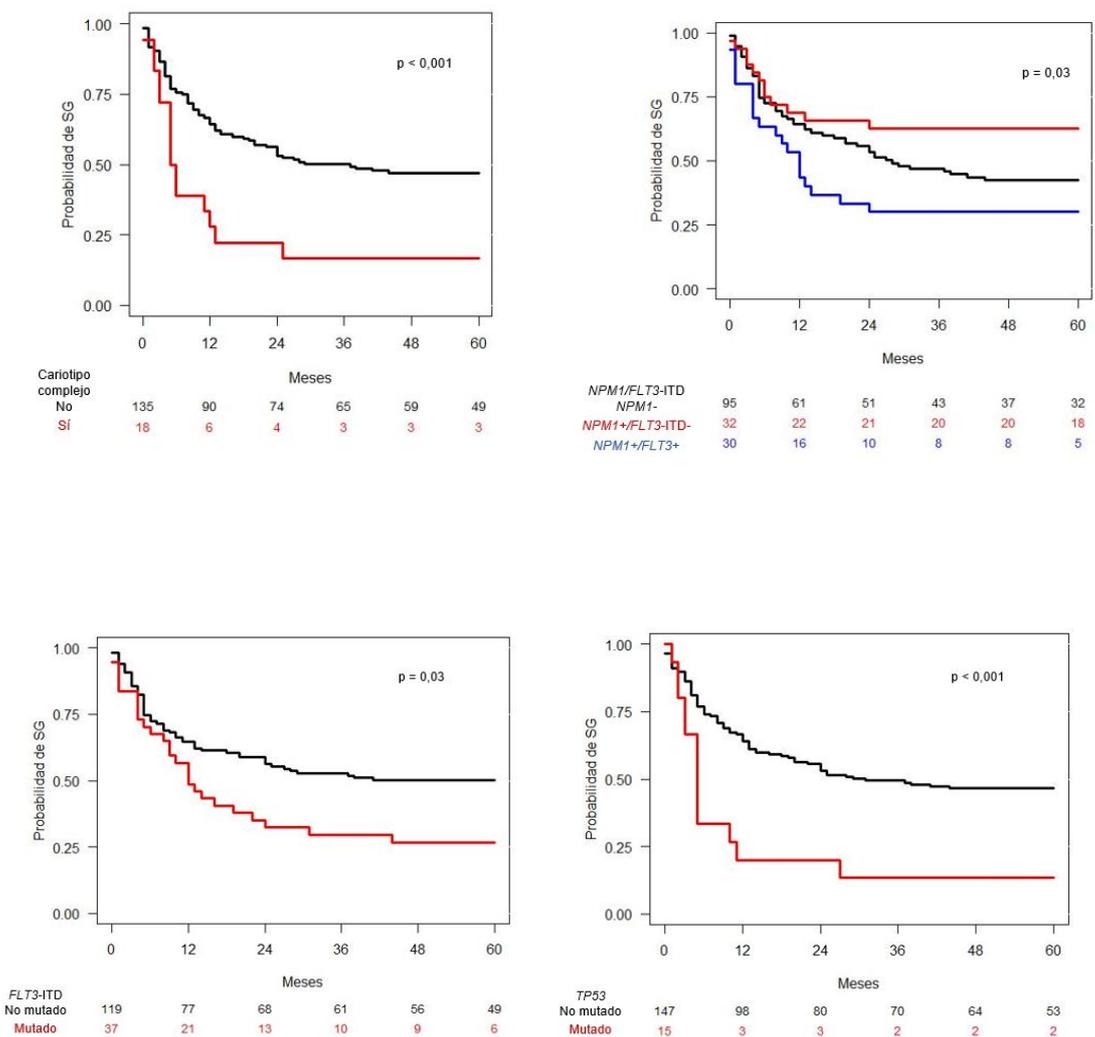


Figura 22. SG en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante (continuación).



5.8.1.1.2 Análisis multivariante

El análisis multivariante mostró como variables con valor pronóstico independiente la edad mayor de 50 años, la ausencia de respuesta al tratamiento de inducción, el CC y la presencia de mutaciones en *FLT3-ITD*. Todos ellos mostraron un impacto negativo en la SG (Tabla 33, Figura 27).

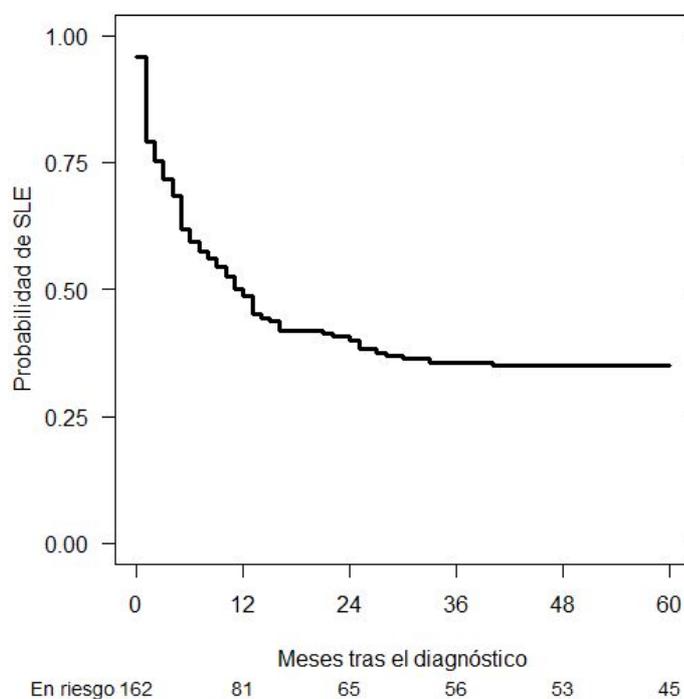
Tabla 33. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la SG.

Variable	p	HR	IC 95%
Edad > 50 años	<0,001	2,27	1,49 – 3,46
ECOG \geq 2	0,051	1,65	0,99 -2,75
Leucocitos $>50 \times 10^9/L$	0,11	1,52	0,91 – 2,55
No respuesta a inducción	<0,001	4,08	2,61 – 6,41
Inv(16)/t(16,16)	0,51	0,72	0,28 – 1,89
Cariotipo complejo	0,005	3,72	1,49 – 9,29
<i>NPM1+ / FLT3-ITD-</i>	0,24	0,67	0,35 – 1,31
<i>FLT3-ITD</i> mutado	0,03	1,67	1,04 – 2,70
<i>TP53</i> mutado	0,28	1,70	0,64 – 4,50

5.8.2. Supervivencia libre de evento (SLE)

Cincuenta y un pacientes (31,5%) continuaban vivos y libres de recaída con una mediana de seguimiento tras el diagnóstico de 77 meses (15 – 217). La mediana de SLE fue de 11,5 meses y la SLE a los 5 años fue del 35% (IC 95%, 28,4-43,2) (Figura 23).

Figura 23. SLE, curva de Kaplan-Meier.



5.8.2.1 Análisis de factores pronóstico con impacto en la SLE

5.8.2.1.1 Análisis univariante

Las variables clínicas con impacto pronóstico en la SLE en la serie de estudio fueron la edad mayor a 50 años y el ECOG mayor o igual a 2.

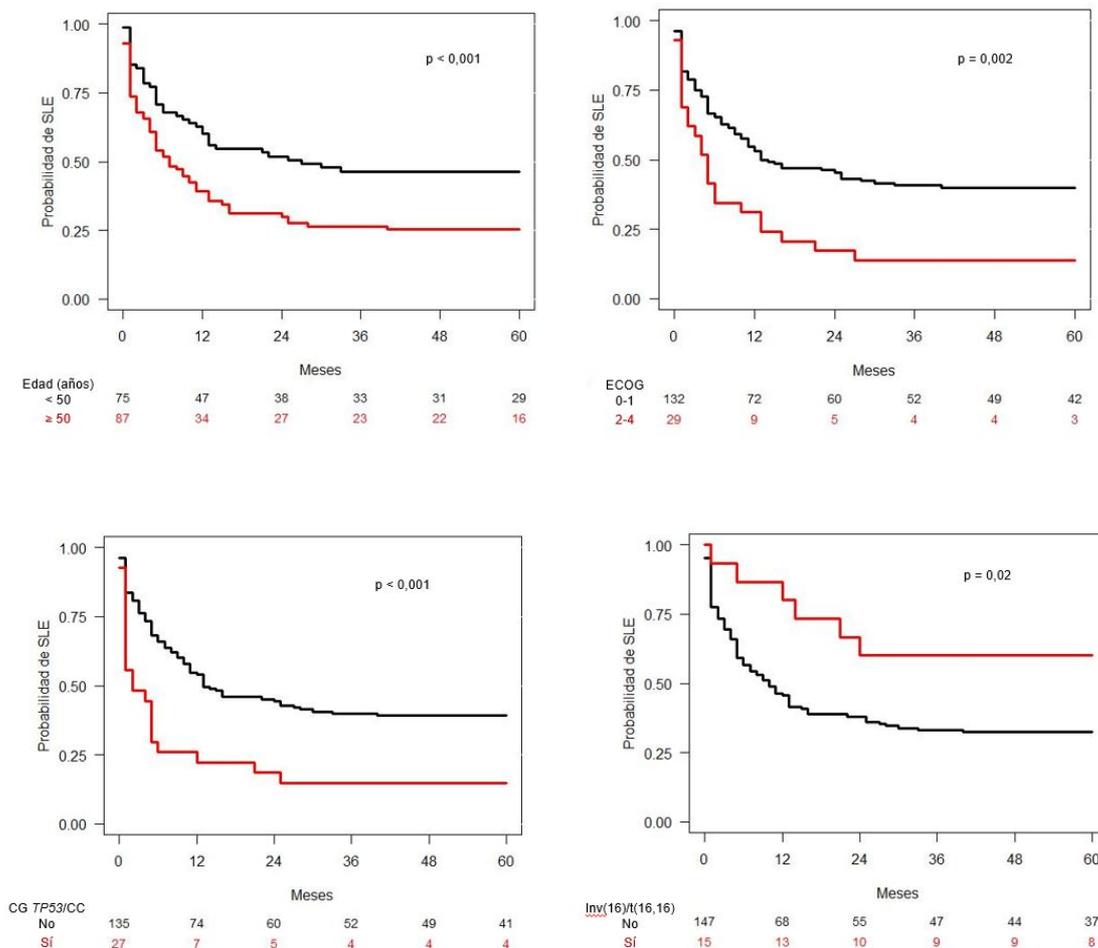
Tabla 34. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la SLE.

Variable	n	Mediana (meses)	SLE a 5 años (%)	IC 95%	p
Edad (años)					
< 50	75	27	46,4	36,4 – 59,3	<0,001
> 50	87	7	25,3	17,6 – 36,3	
ECOG					
0-1	132	13,5	40	32,4 – 49,3	0,002
2-4	29	5	13,8	5,5 – 34,3	
CG TP53/CC					
No	135	13	39,1	31,6 – 48,3	<0,001
Sí	27	2	14,8	5,9 – 36,6	
Inv(16) / t(16,16)					
No	147	10	32,5	25,7 – 41	0,02
Sí	15	NA	60	39,7 – 90,7	
Cariotipo complejo					
No	135	13	38,4	31 – 47,5	<0,001
Sí	18	3	11,1	3 - 41	
Genes mutados					
< 4	137	13	37,8	30,5 – 46,9	0,04
> 4	25	7	20	9,1 – 43,8	
RUNX1					
No mutado	150	13	37,8	30,8- 46,5	<0,001
Mutado	12	3,5	0	NC	
TP53					
No mutado	147	13	37,2	30,2 – 46	0,002
Mutado	15	2	13,3	3,6 – 48,4	
KRAS					
No mutado	156	12,5	36,4	29,5 – 44,8	0,007
Mutado	6	3	0	NC	
NPM1/FLT3-ITD					
NPM1-/FLT3-ITD-	95	13	31,2	23,1 – 42,2	0,04
NPM1+/FLT3-ITD-	32	89	59,4	44,6 – 79,1	
NPM1+/FLT3-ITD+	30	6	26,7	14,7 – 48,3	

En cuanto a las variables genéticas, las mutaciones en *RUNX1*, *TP53* y *KRAS* se asociaron con una peor SLE, mientras que la presencia de *NPM1* mutado en ausencia de alteración molecular en *FLT3-ITD* conllevó una SLE más larga. El análisis univariante mostró un peor pronóstico en los pacientes portadores de mutaciones en 4 o más genes.

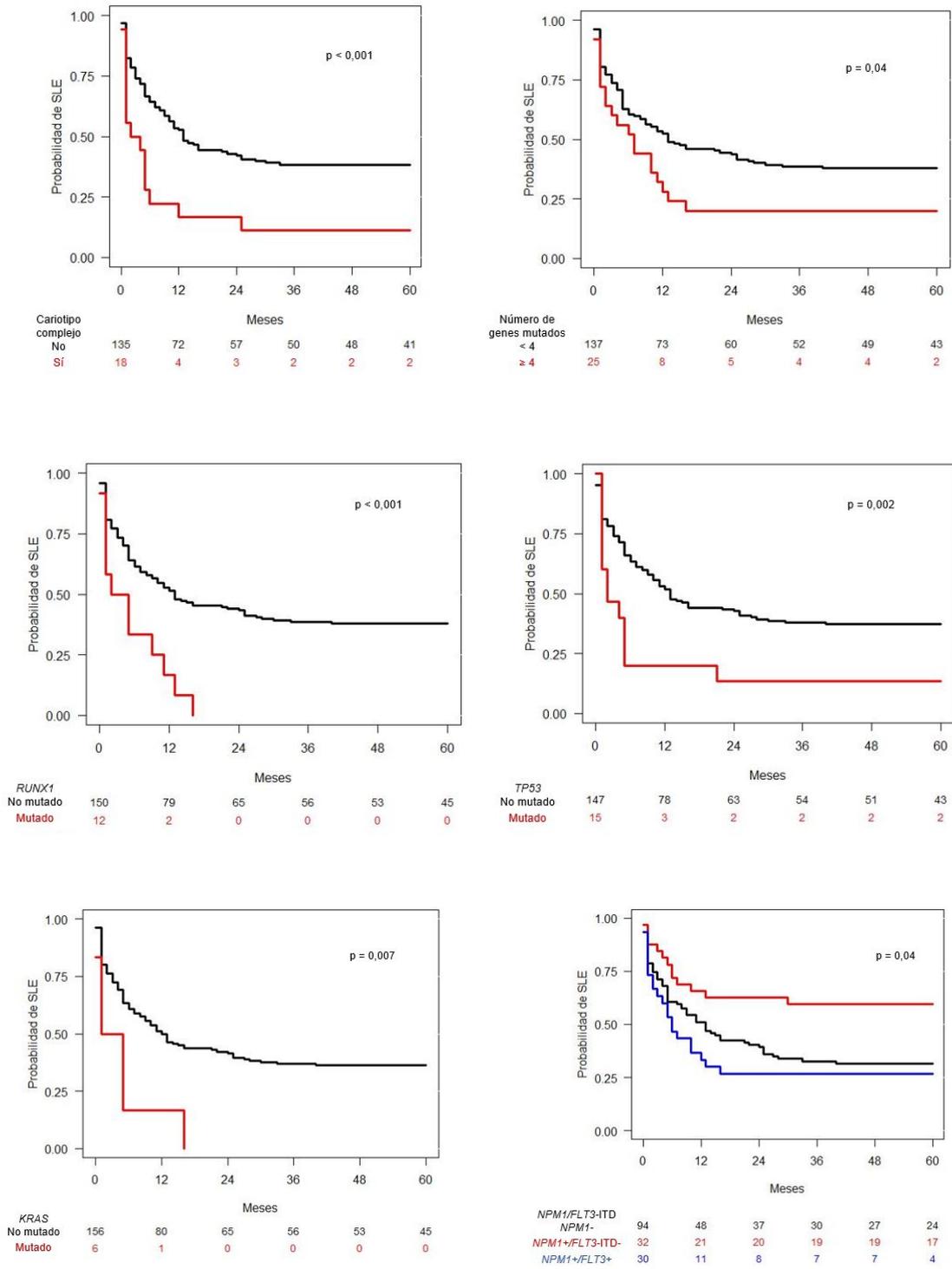
El CC y el subgrupo de la clasificación genómica que engloba CC, aneuploidías y mutaciones de *TP53* mostraron un impacto pronóstico adverso, mientras que los pacientes portadores de la inversión del cromosoma 16 o t(16,16) presentaron una mayor SLE (Tabla 34, Figura 24).

Figura 24. SLE en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante.



Resultados

Figura 24. SLE en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante (continuación).



5.8.2.1.2 Análisis multivariante

El análisis multivariante identificó como variables con valor pronóstico desfavorable independiente para la SLE, la edad superior a 50 años, el CC y las mutaciones en *KRAS*. Las inserciones en *NPM1* sin mutación concomitante de *FLT3*-ITD presentaron un impacto pronóstico favorable (Tabla 35, Figura 27).

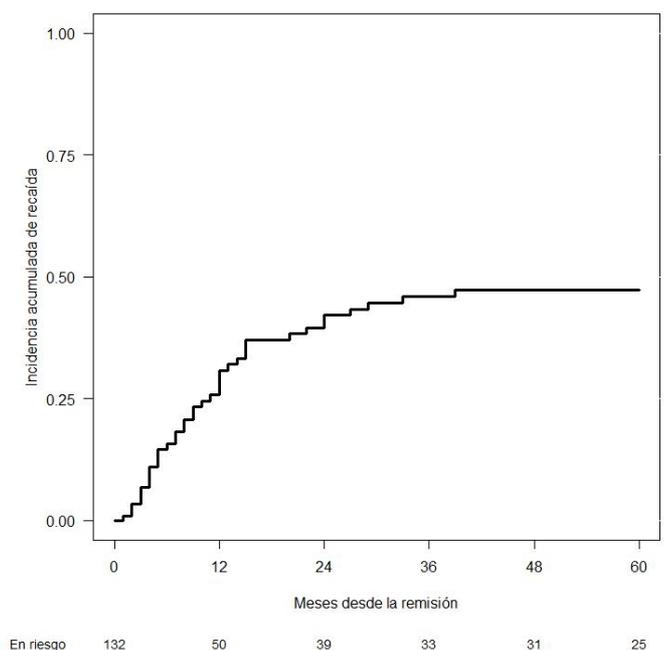
Tabla 35. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la SLE.

Variable	p	HR	IC 95%
Edad > 50 años	0,017	1,66	1,09 – 2,51
ECOG ≥ 2	0,24	1,36	0,8 – 2,3
Inv(16)/t(16,16)	0,12	0,51	0,22 – 1,20
Cariotipo complejo	0,03	2,6	1,08 – 6,31
Número de genes > 4	0,34	0,74	0,40 – 1,37
<i>RUNX1</i> mutado	0,35	1,39	0,69 – 2,83
<i>TP53</i> mutado	0,64	0,80	0,32 – 2,02
<i>KRAS</i> mutado	0,02	2,63	1,12 – 6,14
<i>NPM1</i>+/<i>FLT3</i>-ITD-	0,037	0,56	0,32 – 0,97

5.8.3. Incidencia acumulada de recaída (IAR)

Cuarenta y nueve pacientes (30,2%) presentaron una recaída en una mediana de tiempo de 10 meses (1-88). A los 5 años, los pacientes que alcanzaron respuesta al tratamiento de inducción presentaron una IAR del 47,2% (IC 95%, 36,6 – 58) (Figura 25).

Figura 25. IAR de la serie de estudio.



5.8.3.1 Análisis de factores pronóstico con impacto en la IAR

5.8.3.1.1 Análisis univariante

Las variables clínicas que se relacionaron significativamente con la IAR fueron el recuento de leucocitos al diagnóstico > 50x10⁹/L y el ECOG. El CC y dos subgrupos de la clasificación genómica (CC, aneuploidías, mutaciones de *TP53*/modificadores de la cromatina y splicing) también se asociaron a mayor incidencia de recaída.

Tabla 36. Análisis univariante de las variables con impacto pronóstico en la IAR.

Variable	n	IAR a 5 años (%)	IC 95%	p
Leucocitos (x10⁹/L)				
<50	109	42	30,3 - 54	0,047
>50	23	69	46 - 92	
ECOG				
0-1	112	44	32,5 - 55	0,019
2-4	20	75	49 - 100	
CG RUNX1/ASXL1				
No	119	43,5	32,5 - 55	0,011
Sí	13	89	NC	

Variable	n	IAR a 5 años (%)	IC 95%	p
CG TP53/CC				
No	116	45	33,6 – 55	0,005
Sí	16	100	NC	
Cariotipo complejo				
No	115	46	34,5 – 57	0,016
Sí	10	62	7 - 100	
NPM1/FLT3-ITD				
<i>NPM1-FLT3-ITD-</i>	79	56	42 – 71	0,016
<i>NPM1+FLT3-ITD-</i>	28	20	4 – 36	
<i>NPM1+FLT3-ITD+</i>	21	67	38 – 95	
FLT3-ITD				
No mutado	99	39	27,1 – 51	< 0,001
Mutado	28	77	57 – 98	
DNMT3A-R882				
No mutado	106	43	31,3 - 55	0,031
Mutado	26	62	40 - 84	
RUNX1				
No mutado	124	44.1	33,2 – 55	0,017
Mutado	8	83	NC	
TP53				
No mutado	124	45	34,2 – 56	<0,001
Mutado	8	100	NC	

En cuanto a las alteraciones moleculares, las mutaciones en *FLT3-ITD*, *DNMT3A-R882*, *RUNX1* y *TP53* presentaron mayor IAR, mientras que los pacientes portadores de inserciones en *NPM1* sin mutación en *FLT3-ITD* mostraron una incidencia de recaída menor (Tabla 36, Figura 26).

Resultados

Figura 26. IAR en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante.

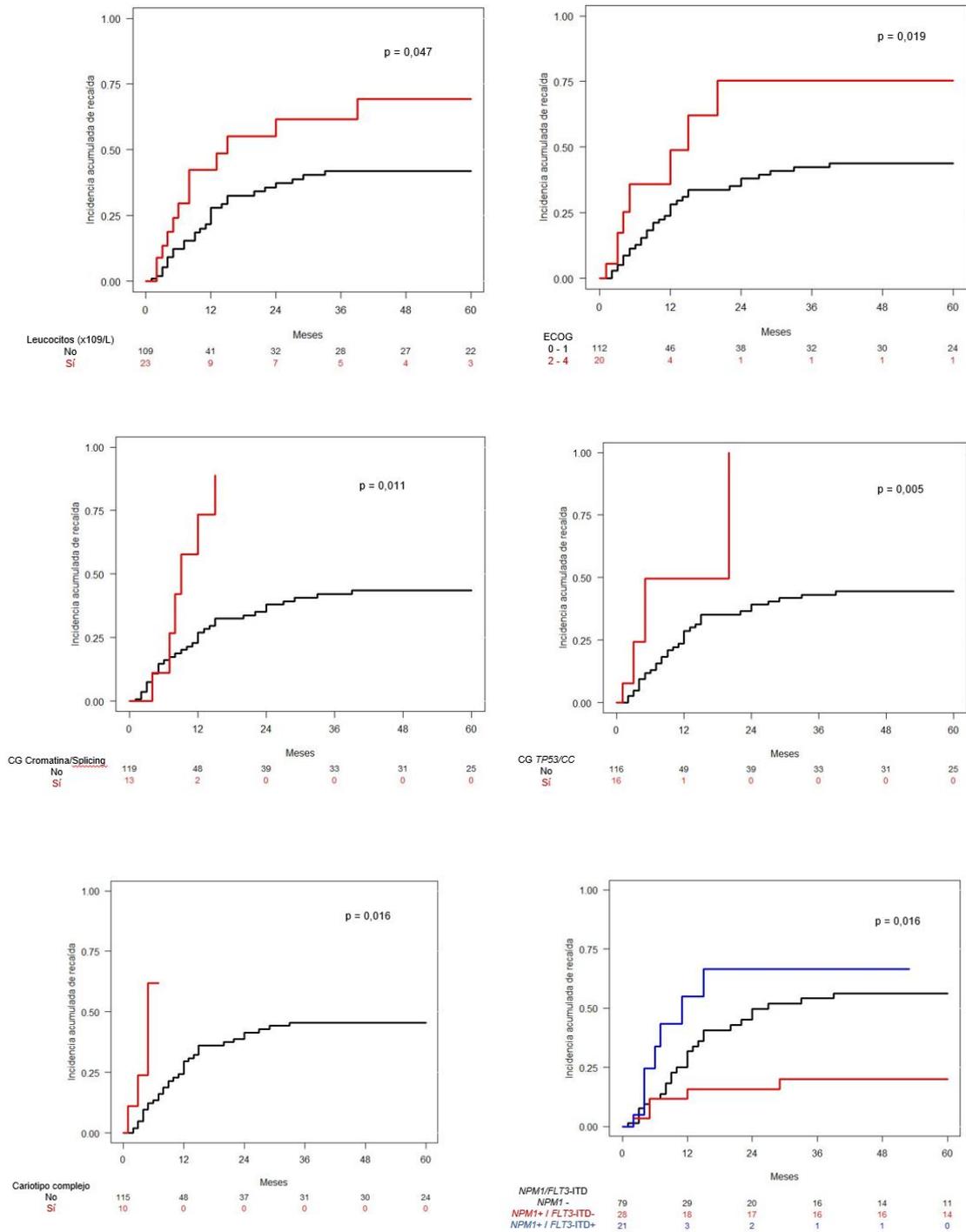
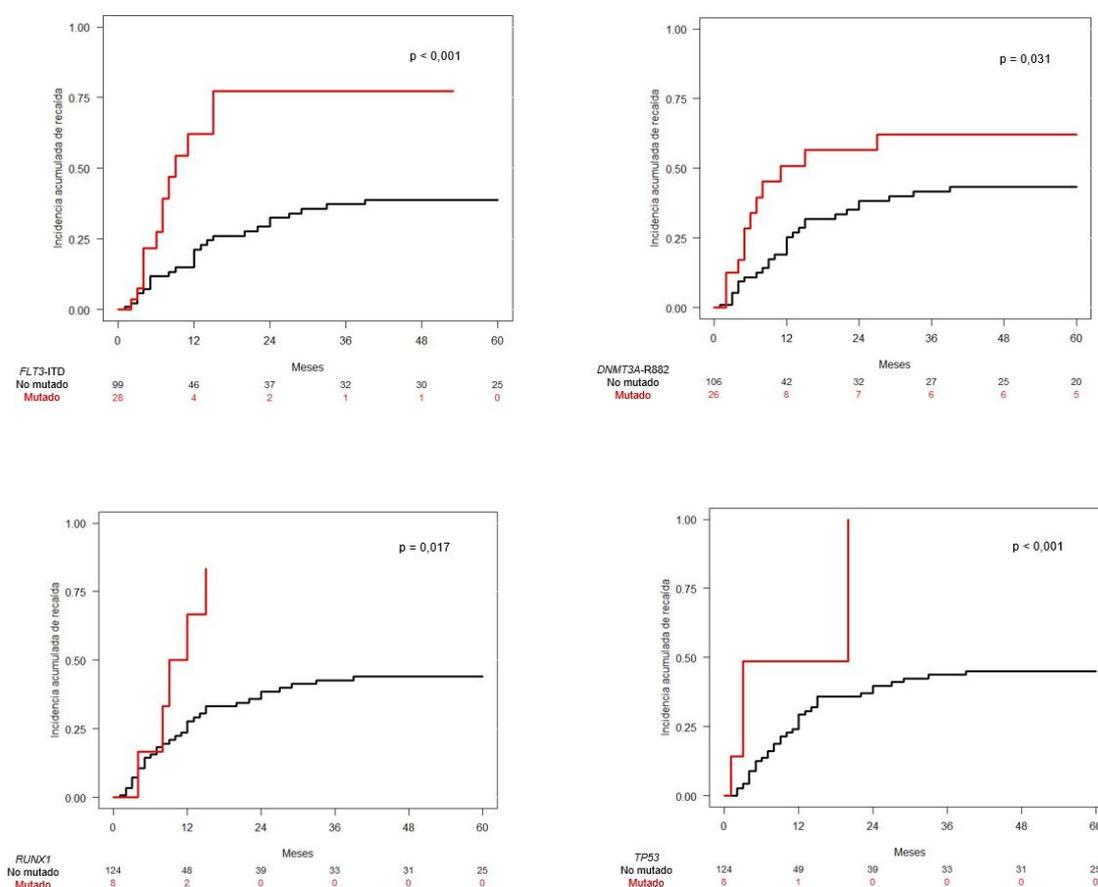


Figura 26. IAR en función de las variables que mostraron un impacto pronóstico significativo en el análisis univariante (continuación).



5.8.3.2 Análisis multivariante

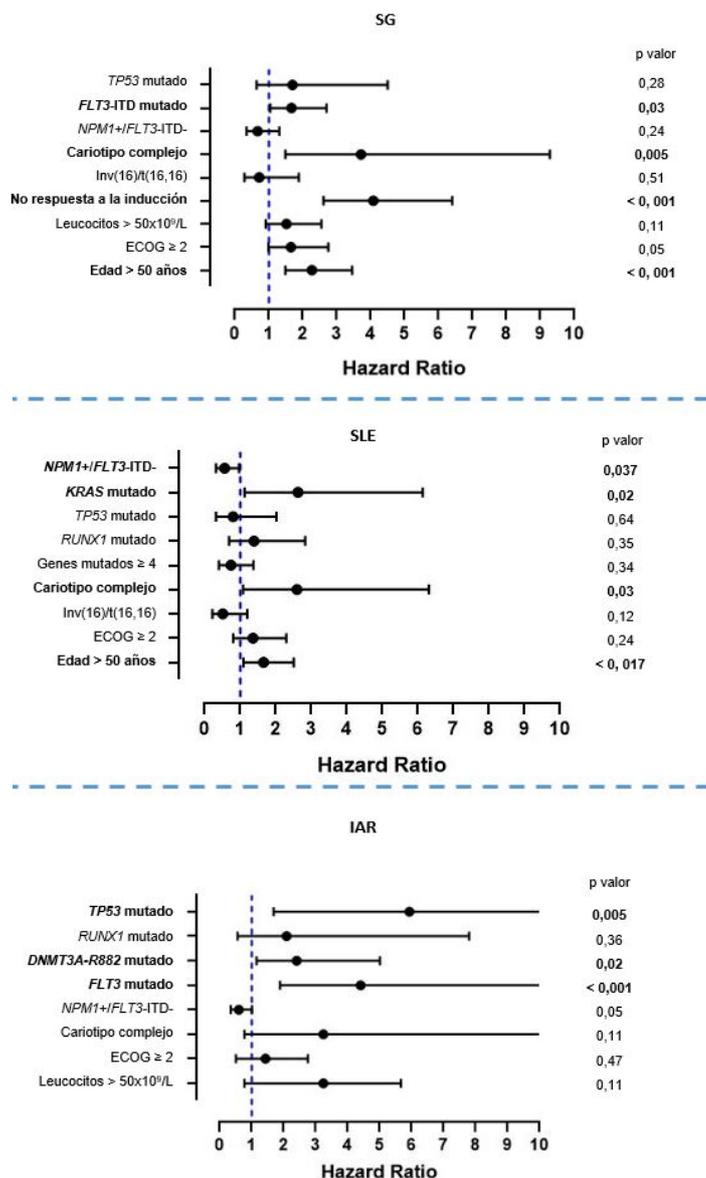
Se identificaron como factores de riesgo independiente la presencia de mutaciones en *FLT3-ITD*, *DNMT3A-R882* y *TP53*, asociándose todas ellas con mayor IAR (Tabla 37, Figura 27).

Tabla 37. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la IAR.

Variable	p	HR	IC 95%
Leucocitos >50x10 ⁹ /L	0,11	3,24	0,77 – 5,67
ECOG ≥ 2	0,47	1,43	0,51 – 2,76
Cariotipo complejo	0,11	3,24	0,77 – 13,54
<i>NPM1</i> +/ <i>FLT3-ITD</i> -	0,05	0,60	0,355 – 1,01

Variable	p	HR	IC 95%
<i>FLT3</i> -ITD mutado	< 0,001	4,41	1,89 – 10,23
<i>DNMT3A</i> -R882 mutado	0,019	2,41	1,15 – 5,01
<i>RUNX1</i> mutado	0,36	2.09	0,56 – 7,8
<i>TP53</i> mutado	0,005	5,93	1,69 – 20,8

Figura 27. Análisis multivariante de las variables con impacto pronóstico en la SG, SLE e IAR.



5.8.4. Supervivencia y clasificaciones pronósticas

Los grupos de riesgo definidos por criterios citogenéticos (Figura 28, Tabla 38), la clasificación de la ELN 2017 (Figura 29, Tabla 39) y la clasificación genómica (Tabla

40) mostraron diferencias significativas en la SG y la SLE, tanto en el análisis censurado al alotrasplante como en el análisis sin censurar. En cuanto a la IAR, la clasificación pronóstica de la ELN 2017 encontró diferencias significativas en el análisis censurado.

Figura 28. SG y SLE en función del riesgo según la clasificación citogenética.

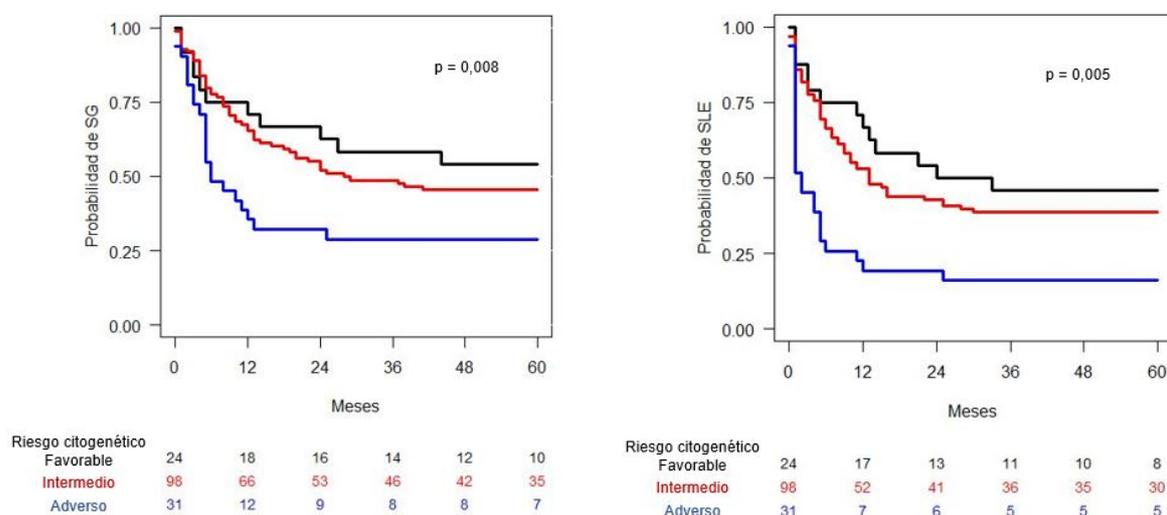


Tabla 38. Análisis de supervivencia censurado y no censurado al alotrasplante según los grupos de riesgo citogenéticos.

	Clasificación citogenética	n	Análisis no censurado			Análisis censurado		
			Mediana (meses)	% a los 5 años	p	Mediana (meses)	% a los 5 años	p
SG	Favorable	24	68	54,2	0,008	68	53,1	< 0,001
	Intermedio	98	28	45,6		15	33	
	Adverso	31	6	28,7		5	0	
SLE	Favorable	24	28,5	45,8	< 0,001	28,5	45,8	< 0,001
	Intermedio	98	13	38,6		13	40,2	
	Adverso	31	2	16,1		2	6,9	
IAR	Favorable	21	NA	29	0,06	NA	32	0,5
	Intermedio	86	NA	36		NA	49	
	Adverso	18	NA	28		5	62	

La clasificación citogenética y la clasificación ELN 2017 mostraron en el análisis censurado y no censurado que los pacientes clasificados dentro del grupo de riesgo adverso invariablemente recayeron sin trasplante alogénico. En los pacientes de riesgo desfavorable según la ELN, la SG a los 5 años mejoró con el alotrasplante de un 3% a

Resultados

un 22,4%. Los pacientes incluidos en el grupo de riesgo intermedio de la ELN 2017 se beneficiaron del trasplante alogénico con una SG a 5 años que se incrementó de un 17% a un 46,2%. Por el contrario, no hubo diferencias en el grupo de riesgo favorable (SG a 5 años 51% vs 54,1%) (Figura 29, Tabla 39).

Figura 29. SG y SLE en función del riesgo según la clasificación de la ELN de 2017 (censurados y no censurados al TPH alogénico).

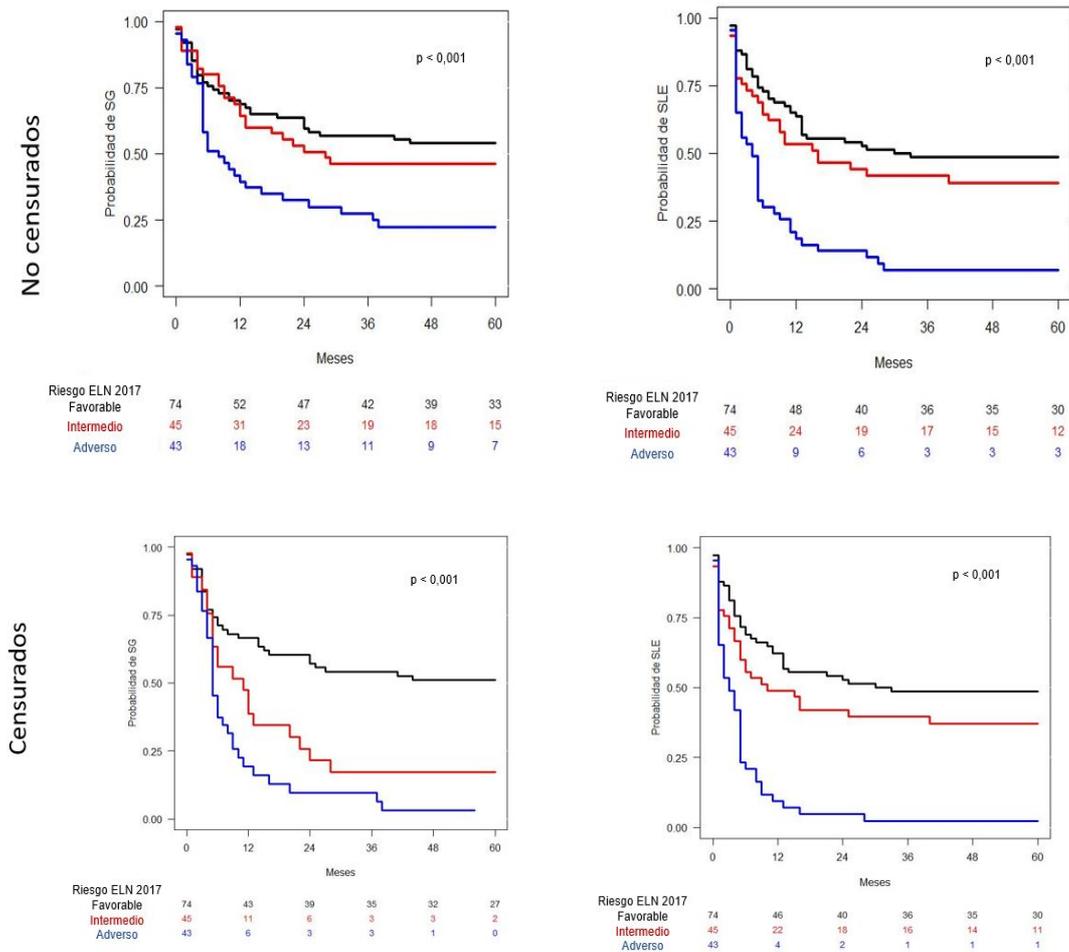


Tabla 39. Análisis de supervivencia censurado y no censurado al alotrasplante según grupos de riesgo ELN 2017.

	ELN 2017	n	Análisis no censurado			Análisis censurado		
			Mediana (meses)	% a los 5 años	p	Mediana (meses)	% a los 5 años	p
SG	Favorable	74	105	54,1		68	51	
	Intermedio	45	28	46,2	< 0,001	11	17	< 0,001
	Adverso	43	8	22,4		5	3	
SLE	Favorable	74	31,5	48,6		31,3	48,5	
	Intermedio	45	16	39,2	< 0,001	16	40,6	< 0,001
	Adverso	43	4	6,9		4	2,7	
IAR	Favorable	65	NA	41		NA	31	
	Intermedio	38	NA	26	0,6	16	74	< 0,001
	Adverso	29	NA	31		9	90	

Finalmente, la clasificación genómica permitió observar las diferencias en la SG y la SLE entre las categorías definidas por alteraciones más concretas. No se observaron diferencias significativas en la IAR (Tabla 40).

Los pacientes con inversión del cromosoma 16 presentaron una elevada SG a los 5 años (71%), seguidos de los pacientes con mutaciones bialélicas en *CEBPA* (54,5%). Sin embargo, los pacientes con t(8,21), incluidos en la categoría de riesgo favorable en las clasificaciones de riesgo citogenético y ELN, mostraron una supervivencia muy inferior (33%), más cercana a la encontrada en los grupos de alto riesgo como los genes del *splicing/cromatina* (32,7%). La categoría de peor pronóstico es la constituida por las mutaciones de *TP53* y/o aneuploidías cromosómicas con una SG del 14,5% en el análisis no censurado y nula sin alotrasplante. Los pacientes sin mutaciones *driver* conocidas (n=6) mostraron la mayor tasa de SG a 5 años (86%).

Tabla 40. Análisis de supervivencia censurado y no censurado al alotrasplante según grupos de la clasificación genómica.

	Clasificación genómica	n	Análisis no censurado			Análisis censurado		
			Mediana (meses)	% a los 5 años	p	Mediana (meses)	% a los 5 años	p
SG	<i>NPM1</i> mutado	59	24	45,1	0,006	12	40,8	< 0,001
	Genes de splicing y/o modificadores de cromatina	11	20	32,7		10	12,3	
	<i>TP53</i> y/o aneuploidías cromosómicas	23	5	14,5		4	0	
	inv(16) o t(16,16)	14	NA	71,4		NA	70,7	
	<i>CEBPAbi</i>	11	NA	54,5		33	37,5	
	t(8,21)	9	14	33,3		14	33,3	
	inv(3)	5	18	40		7	0	
	<i>IDH2-R172</i>	5	99	60		38	40	
	Otras mutaciones <i>driver</i>	11	20	27,3		11	0	
Sin mutaciones <i>driver</i>	6	NA	83,3	71	75			
SLE	<i>NPM1</i> mutado	59	13	44,1	< 0,001	13	45,2	< 0,001
	Genes de splicing y/o modificadores de cromatina	11	8	0		8	0	
	<i>TP53</i> y/o aneuploidías cromosómicas	23	2	17,4		2	4,3	
	inv(16) o t(16,16)	14	NA	64,3		NA	64,3	
	<i>CEBPAbi</i>	11	25	45,5		25	45,5	
	t(8,21)	9	11	22,2		11	22,2	
	inv(3)	5	1	20		1	20	
	<i>IDH2-R172</i>	5	28	40		NA	66,7	
	Otras mutaciones <i>driver</i>	11	15	27,3		15	31,8	
Sin mutaciones <i>driver</i>	6	NA	55,6	NA	55,6			

6. DISCUSIÓN

Esta tesis doctoral demuestra que la NGS es una herramienta aplicable al diagnóstico de la LMA, alcanzando mayor sensibilidad y rendimiento diagnóstico para el análisis de múltiples genes que las técnicas convencionales de biología molecular. En la actualidad, se requiere el estudio de un creciente número de genes para el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la LMA, por lo que los procedimientos basados en técnicas convencionales pueden resultar insuficientes o muy laboriosos para clasificar según los estándares actuales a los pacientes con LMA (Arber *et al*, 2016, Dohner, H. *et al*, 2017, Papaemmanuil *et al*, 2016), tal y como se verifica en este trabajo. A pesar de que los estudios moleculares son considerados como un apartado fundamental en el diagnóstico integrado de las enfermedades hematológicas y se acepta que los paneles de genes basados en tecnologías de NGS pueden constituir una alternativa muy útil para una caracterización molecular rápida y global de enfermedades heterogéneas desde el punto de vista genético como la LMA, por el momento no se han establecido unos criterios universales de estandarización en el ámbito del diagnóstico de rutina y los procedimientos deben de ser validados individualmente (Jennings *et al*, 2017, Endrullat *et al*, 2016, Aziz *et al*, 2015).

Este estudio se ha planteado en dos fases diferenciadas. La primera aborda la validación técnica y clínica de un panel de genes empleando una técnica de secuenciación mediante ion semiconductor y un diseño de amplicones. El objetivo de esta primera fase es diseñar una técnica reproducible y demostrar que el procedimiento es preciso, válido y capaz de detectar variantes patogénicas con significado clínico. En la segunda fase se analizan los resultados obtenidos mediante el empleo del panel validado en la primera fase en términos de relaciones entre genes, características clínicas y biológicas de los pacientes analizados e impacto en la respuesta y la supervivencia.

6.1. Validación técnica e implementación del panel a estudio

Los criterios de calidad que se han establecido en este estudio se basan en publicaciones previas en las que se validaron paneles de NGS en laboratorios clínicos y en las guías internacionales para la implementación de técnicas de NGS aplicadas al diagnóstico (Jennings *et al*, 2017, Li *et al*, 2017, Luthra *et al*, 2014, Au *et al*, 2016). En cuanto a las métricas de secuenciación, para el método empleado en este estudio los valores esperados son una uniformidad mayor o igual al 80%, un porcentaje de lecturas *on-target* en torno al 90% y unas profundidades de cobertura mínima de 100X y media

de 1000X. Los resultados de este trabajo cumplen estas expectativas obteniendo una uniformidad ampliamente superior a la esperada. Además, son similares a los publicados en otros paneles secuenciados en la plataforma Ion Torrent o Illumina (Garcia-Garcia *et al*, 2016, de Leng *et al*, 2016). A este respecto, aunque ambas plataformas (Torrent e Illumina) son comparables cuando se emplean paneles equivalentes para la detección de variantes somáticas (Misyura *et al*, 2016), los métodos basados en amplicones suelen presentar mejores tasas de lecturas *on-target*, mientras que los basados en sondas de hibridación muestran mayor uniformidad (Samorodnitsky *et al*, 2015).

La profundidad media de lectura y el *strand bias* por amplicón son determinados generalmente con buena calidad, a excepción de algunas regiones con alto contenido en CG, localizadas en genes como *GATA2*, *DNMT3A* o *CEBPA*. Estos fragmentos son de difícil análisis independientemente de la técnica empleada, ya sea por técnicas convencionales o por otras aproximaciones basadas en NGS (Naz & Fatima, 2013, Bolli *et al*, 2015, Yan *et al*, 2016), incluyendo la captura exónica (Garcia-Garcia *et al*, 2016), ya que la dificultad es intrínseca a la disposición de la secuencia génica. Dado que el *strand bias* incrementa la tasa de FP (Guo *et al*, 2012), esta limitación se minimiza en el presente trabajo mediante la revisión individual de estos fragmentos mediante visión directa en la herramienta informática IGV.

En este estudio se emplean dos plataformas de secuenciación diferentes: Ion PGM e Ion Proton. La mayor capacidad el Ion Proton constituye, en este caso, una desventaja ya que se requieren demasiadas muestras para conseguir una relación coste-efectividad y tiempo de respuesta aceptable en un laboratorio diagnóstico. Por lo tanto, se selecciona el Ion PGM como la mejor opción con finalidad diagnóstica para garantizar una respuesta rápida y optimizar los recursos del laboratorio de rutina. La secuenciación de 8 muestras por carrera empleando el panel IonAmpliseq AML en un chip 318 en la plataforma Ion PGM demuestra ser un método reproducible, sensible y específico, cumpliendo los criterios de calidad aceptados para este tipo de técnicas, de manera similar a otros paneles que incluyen genes relacionados con la línea mieloide (Luthra *et al*, 2015).

El método validado en este estudio, al igual que otros paneles NGS (Naz & Fatima, 2013, Bolli *et al*, 2015, Yan *et al*, 2016), demuestra presentar un límite de detección muy bajo. De hecho, el panel es capaz de detectar con una precisión adecuada mutaciones puntuales con una VAF de 2,4% e INDELS con una VAF de 4,3%.

Con finalidades clínicas, se establece generalmente una VAF del 5% como umbral de significación, sin embargo, una VAF entre el 3-5% puede considerarse en el caso de variantes accionables o genes recurrentemente mutados. En este último caso, las variantes encontradas pueden ser informadas incluso en el límite de detección (Luthra *et al*, 2014, D'Haene *et al*, 2015, Strom, 2016). Por ello, seleccionamos como umbral para reportar las alteraciones encontradas una VAF del 3% para las mutaciones puntuales y del 5% para las INDELS.

El análisis de la mediana de VAF en la serie de estudio muestra valores cercanos al 50% en genes como *DNMT3A*, *TET2* o *ASXL1*, y se encuentran mutaciones en *FLT3*, *KIT* o *RAS* con una VAF inferior en la clona leucémica. Estos hallazgos son consistentes con la evidencia científica actual, en la que genes relacionados con cambios epigenéticos se asocian con CHIP, son adquiridas en fases pre-leucémicas, lo que hace que muestren VAF elevadas en el seno de una LMA establecida, y pueden mantenerse estables durante muchos años (Young *et al*, 2016). Sin embargo, las alteraciones en genes pertenecientes a vías funcionales encargadas de la proliferación celular se adquieren posteriormente, únicamente en subpoblaciones de la clona leucémica y por tanto, su frecuencia alélica es inferior (Bodini *et al*, 2015, Metzeler *et al*, 2016). La alta sensibilidad de la NGS respecto a otras técnicas moleculares cobra importancia en el caso de las mutaciones subclonales, que pueden pasar desapercibidas si se emplean técnicas menos sensibles, ya que los pacientes que portan mutaciones en estos genes pueden beneficiarse de tratamientos dirigidos.

6.2. Validación clínica y utilidad diagnóstica

Teniendo presente que el objetivo del estudio es trasladar a la práctica clínica habitual el empleo de técnicas de NGS para el diagnóstico de rutina de la LMA, se selecciona un panel relativamente pequeño, a diferencia de la mayoría de los trabajos publicados en los que se analizan un número elevado de genes (> 50), incluso algunos estudios han secuenciado más de 250 o 400 genes. Únicamente 2 autores han publicado resultados de paneles con número de genes inferior a 20, ambos incluían 19 genes con un diseño custom y encontraron mutaciones en aproximadamente un 80% de los pacientes estudiados, aunque carecen de información en cuanto a la validación del panel empleado (Shin *et al*, 2016, Ohgami *et al*, 2015). En esta tesis doctoral, se encuentran alteraciones moleculares en un 92% de la población investigada, porcentajes muy similares a los publicados en series muy amplias en número de

pacientes y genes estudiados, con una distribución de frecuencias por gen superponibles a la literatura (Grimwade *et al*, 2016, Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Además, la mayoría de estas alteraciones (88,9%) presentan relevancia clínica. Esto es debido a que, a pesar de emplear un panel selectivo, se incluyen los genes con significado clínico demostrado según los estándares actuales y otros genes recurrentemente mutados en LMA con potencial significación en una de estas tres vertientes: diagnóstica, pronóstica o terapéutica. Respecto a las técnicas convencionales, el panel de NGS presenta una mayor sensibilidad, siendo capaz de detectar todas las mutaciones previamente descritas en la serie estudiada y ampliando el número de alteraciones encontradas. Los diversos patrones de concurrencias y exclusividades entre genes en la LMA ponen de manifiesto la complejidad de incorporar todas las alteraciones moleculares relevantes y sus combinaciones en el manejo clínico de la LMA. En este sentido, consideramos que, en el momento actual, los paneles dirigidos y acotados a los genes clínicamente significativos, como el testado en este trabajo u otros previamente publicados (Ohgami *et al*, 2015), pueden incorporarse a los laboratorios clínicos de manera más sencilla y coste-efectiva que paneles más amplios (Lin, P. H. *et al*, 2017, Papaemmanuil *et al*, 2016).

Una de las limitaciones más importantes del panel empleado para un análisis molecular global de la LMA es la ausencia en el diseño de la región yuxtamembrana de *FLT3* en la que se localizan las ITD. En el momento de la selección del panel a estudio existía una dificultad para la detección de *FLT3*-ITD por NGS comunicada en la mayoría de las publicaciones, en las que se infradetectaban estas mutaciones o requerían análisis adicionales (Luthra *et al*, 2014, Spencer *et al*, 2013). Esta dificultad era más marcada en los diseños por amplicones frente a los diseños por captura exónica. Sin embargo, en la actualidad, el empleo de herramientas bioinformáticas específicas para *FLT3*-ITD permite encontrar este tipo de mutaciones con una alta sensibilidad.

6.3. Características de la serie

La comparación realizada para evaluar la existencia de un sesgo de selección entre las características clínico-biológicas de la serie de pacientes incluidos en el estudio frente a la serie total de pacientes que cumplían el resto criterios de inclusión independientemente de la disponibilidad de ADN no muestra diferencias significativas en cuanto a la distribución al diagnóstico en las variables estudiadas, por lo que podemos considerar la serie de estudio como representativa de la serie global. Se

observa una proporción mayor de pacientes tratados según el esquema LMA99 en la serie global probablemente debido a una menor disponibilidad de muestras en los pacientes diagnosticados en la fase inicial del período de estudio. En cuanto a la distribución de los pacientes de acuerdo a la citogenética, la mayoría de ellos (en torno a un 60%) presentan un riesgo intermedio, similar a lo publicado en series históricas amplias, y la distribución en las categorías de la clasificación OMS 2008 es superponible a la literatura, lo que constituye otro elemento que confiere fiabilidad a la selección de pacientes (Byrd *et al*, 2002, Grimwade *et al*, 2010, Swerdlow *et al*, 2008).

6.4. Clasificación de la LMA

El conocimiento más profundo del espectro mutacional de la LMA ha permitido la elaboración de nuevas clasificaciones basadas en las alteraciones moleculares que pueden ser útiles para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a subgrupos específicos de pacientes. La clasificación OMS 2017 incorpora nuevas categorías basadas en el estado mutacional de varios genes (*NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*), todos ellos incluidos en el panel validado en este estudio, que es capaz de detectarlos con precisión permitiendo un diagnóstico correcto e incrementando el número de pacientes asignados a entidades definidas por alteraciones moleculares específicas de un 58,6% (OMS 2008) a un 67,9% (OMS 2017). Recientemente, se ha publicado una nueva clasificación genómica con implicaciones pronósticas con mínimo solapamiento entre categorías basado en análisis de más de 100 genes y más de 1500 pacientes (Papaemmanuil *et al*, 2016). Las categorías se definen por la presencia de una o varias mutaciones conductoras y/o otras mutaciones concurrentes. A pesar de que la categoría de mutaciones de modificadores de la cromatina y spliceosoma se encuentra infrarrepresentada en nuestra serie por el diseño del panel Ampliseq AML, la distribución en nuestra cohorte de pacientes en estos subgrupos es superponible a los resultados obtenidos por Papaemmanuil *et al*. La mayoría de los pacientes son asignados a una categoría definida por alguna alteración genética. De hecho, se identifica al menos una alteración conductora en un porcentaje similar a la cohorte original (96,29% frente a 96%, respectivamente). La metodología empleada en nuestro estudio incluye todos los genes con valor pronóstico definido según la clasificación de riesgo de la ELN 2017 por lo que constituye una herramienta válida para estratificar el riesgo en el ámbito clínico. En comparación con la clasificación de ELN de 2010, se observa que la nueva aproximación pronóstica de 2017 asigna un mayor número de pacientes a los grupos de riesgo bajo y alto, especialmente al primero, tal y como se ha descrito en otros estudios

recientes (Harada *et al*, 2018, Boddu *et al*, 2019). Por otro lado, el presente estudio reproduce el valor pronóstico de la citogenética como factor único. En definitiva, la metodología desarrollada en este trabajo cumple con la finalidad de asignar una categoría diagnóstica y pronóstica según los estándares actuales.

6.5. Relación entre alteraciones genéticas y asociación con características clínico-biológicas

Los patrones de asociación que se encuentran en este estudio ponen de manifiesto que las alteraciones moleculares definitorias de categoría diagnóstica (*NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*) se relacionan con CN y son excluyentes entre sí. A este respecto, también se observa una fuerte exclusividad entre estas mutaciones y otras como *TP53*, *IDH2-R172* y *ASXL1* que forman parte de los subgrupos con valor pronóstico definidos por la reciente clasificación genómica. En el caso de *TP53*, se asocian también características clínicas propias (debut pancitopénico de la LMA y displasia trilineal). Esto sugiere que en un futuro puedan constituirse entidades independientes definidas por estas mutaciones, aunque para ello que se requieren estudios pormenorizados a este respecto.

El análisis MEGSA aplicado a nuestra serie de pacientes aporta resultados similares a los encontrados por *Hua et al* en los datos publicados por el TCGA, y define como set de genes más excluyente al grupo que incluye las mutaciones en *NPM1*, *RUNX1* y *TP53*, siendo *TP53* el gen más significativamente excluyente. Sin embargo, cabe destacar que nuestro análisis es capaz de seleccionar a *CEBPA* dentro del MEGS, al contrario que el grupo de *Hua*, que no encontró un patrón de exclusividad en relación con este gen. La reciente inclusión de las mutaciones bialélicas en *CEBPA* como criterio definitorio de una entidad independiente en la clasificación de la OMS de 2017 constituye una confirmación de su naturaleza exclusiva y es coincidente con nuestro análisis. Por último, y en línea con la publicación de *Hua et al*, el grupo de genes con mayor grado de exclusividad seleccionado por nuestro estudio incluye los genes *FLT3*, *IDH2*, *NRAS*, *KIT*, y *TP53*. Estos genes se encuentran ligados funcionalmente lo que sugiere una implicación biológica de las vías de PI3K, MAPK/ERK y TP53. Dentro de las asociaciones génicas, la tríada *NPM1-FLT3-DNMT3A* constituye la asociación mas fuerte, compartiendo características clínicas (hiperleucocitosis) e inmunofenotípicas (ausencia de CD34), consistente con un patrón global específico descrito (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Cabe destacar la asociación entre las

mutaciones en *FLT3* e *IDH2*, que de ser confirmada, podría conllevar implicaciones terapéuticas ya que se dispone de tratamiento frente a las dos dianas. El empleo conjunto de ambas terapias dirigidas podría constituir un campo interesante de investigación futura.

6.6. Análisis de factores de riesgo en la supervivencia

El significado pronóstico individual de los genes estudiados o agrupados en categorías se estudia en una cohorte de pacientes jóvenes tratados con quimioterapia intensiva. A este respecto, nuestro trabajo comparte las limitaciones metodológicas inherentes a los estudios retrospectivos de cohortes, al igual que la gran mayoría de estudios moleculares en LMA publicados en la literatura con los que comparte este tipo de diseño, por lo que se debe tener en cuenta a la hora de interpretar y extrapolar las conclusiones obtenidas. El tamaño muestral, aunque significativo para pacientes de un único centro, es limitado en número a efectos de estudio de subgrupos, en especial en las mutaciones representadas en baja proporción. A pesar de estas limitaciones, la serie de estudio reproduce el valor predictivo de la citogenética, de marcadores biológicos como la edad y de marcadores moleculares bien establecidos como *FLT3*-ITD o *NPM1* tanto en la respuesta al tratamiento como en términos de supervivencia. La SG a 5 años es superponible a estudios de registro en el mismo período temporal de estudio (Dinmohamed *et al*, 2016). En cuanto a la respuesta al tratamiento de inducción, las variables clínicas (edad, ECOG) se relacionan con la mortalidad precoz, y las genéticas (mutaciones, cariotipo) con la resistencia a la primera línea. Aunque nuestros resultados no muestran impacto negativo de las mutaciones de *FLT3*-ITD en la serie global en cuanto a SLE, el análisis únicamente de los pacientes con CN sí pone en evidencia esta influencia pronóstica adversa (SLE a 5 años 46,2 vs 27,5, $p=0,007$). Por otro lado, los resultados obtenidos muestran un valor pronóstico desfavorable en genes los pacientes portadores de alteraciones moleculares en *TP53* o *RUNX1*, en concordancia con la mayoría de los datos publicados hasta el momento (Gaidzik *et al*, 2016, Bowen, D. *et al*, 2009). Los pacientes portadores de mutaciones en *RUNX1* en nuestra serie pertenecen mayoritariamente al grupo de CN.

Aunque se observan diferencias en cuanto a mediana y SG a 5 años entre los pacientes portadores de mutaciones bialélicas en *CEBPA* frente al resto, este trabajo no es capaz de detectar una correlación estadísticamente significativa probablemente en relación con un pequeño número de pacientes portadores de este estado mutacional. El

impacto pronóstico adverso de las mutaciones en *ASXL1* en la SG, la SLE e IAR descrita en la literatura (Pratcorona *et al*, 2012, Schnittger *et al*, 2013, Paschka *et al*, 2015) no se evidencia en nuestra serie en el análisis de la serie global aunque existe una tendencia a la significación en el análisis univariante. La distribución de los pacientes mutados en *ASXL1* es heterogéneo en nuestra serie y si nos limitamos al subgrupo de pacientes con CN las diferencias en cuanto a supervivencia resultan significativas (SG a 5 años 50,4 vs 0, $p=0,002$), aunque el tamaño muestral es demasiado pequeño para extraer conclusiones sólidas a este respecto.

En cuanto al papel de otros genes cuyo impacto pronóstico es controvertido, nuestro estudio encuentra una asociación entre la presencia de alteraciones en *KRAS* y una peor SLE, sin embargo, estas mutaciones no muestran valor pronóstico en la mayoría de los trabajos publicados (Bowen, D. T. *et al*, 2005, Boissel *et al*, 2006). El escaso número de pacientes portadores de la mutación en nuestro estudio implica interpretar con cautela este resultado, teniendo en cuenta, además, que las mutaciones en este gen se asocian a un peor estado general al diagnóstico en la serie estudiada, por lo que puede tratarse de un sesgo de asociación. Este trabajo también encuentra un incremento de la IAR en aquellos pacientes portadores de la mutación *DNMT3A-R882* sin que esto se traduzca en la SG ni en la SLE. Las mutaciones en este *locus* presentan valor pronóstico independiente para la IAR a pesar de que las mutaciones en *FLT3-ITD* y *DNMT3A* se encuentran biológicamente relacionadas, tal y como se demuestra en este y otros estudios (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013, Papaemmanuil *et al*, 2016). El impacto pronóstico de esta alteración molecular ha sido publicado previamente por otros autores, aunque otros estudios no han encontrado esta asociación, por lo que su papel como predictor de riesgo continúa siendo controvertido (Ley *et al*, 2010, Papaemmanuil *et al*, 2016).

Por último, la influencia pronóstica del número de mutaciones conductoras encontradas al diagnóstico en la LMA esta aún por definir. Se ha sugerido que el mayor número de genes mutados se relaciona con impacto adverso en la supervivencia. Hasta donde sabemos, únicamente dos estudios han evaluado este aspecto en un análisis multivariante. Uno de ellos encontró como factor predictivo de la SG la presencia de 3 o más mutaciones conductoras, sin embargo, el otro no encontró significación estadística en el análisis multivariante (Metzeler *et al*, 2016, Wakita *et al*, 2016). En nuestra cohorte, a pesar de que la presencia cuatro o más mutaciones conductoras implica un pronóstico adverso en el análisis univariante, el análisis multivariante no selecciona esta variable, lo que sugiere que prevalece el valor pronóstico de los genes individuales, en línea con

los hallazgos de Metzeler *et al.* El hecho de que mutaciones asociadas a peor pronóstico como *TP53* suelen aparecer de manera aislada, como demuestra el análisis de exclusividades entre genes, apoya esta teoría.

En definitiva, este trabajo concluye que el empleo la técnica de NGS dirigida estudiada es reproducible y precisa, por tanto, aplicable al diagnóstico de la LMA, tras una validación exhaustiva. Con una finalidad diagnóstica, el estudio de genes clave correctamente seleccionados o regiones recurrentes (*hotspot*) es adecuada para asignar a los pacientes a una categoría diagnóstica, evaluar el riesgo individual según los estándares actuales o identificar potenciales dianas terapéuticas, reduciendo costes y simplificando el análisis bioinformático. Es probable que los algoritmos de estratificación de riesgo y de tratamiento vigentes sean mejorados en el futuro próximo con la incorporación de nuevas mutaciones o combinaciones de ellas con implicaciones pronósticas y/o terapéuticas. Por tanto, consideramos que es necesario que los paneles dirigidos al diagnóstico de la LMA sean flexibles para la incorporación de nuevos genes que puedan ser identificados como clínicamente significativos e incluir la determinación de reordenamientos recurrentes con implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

7.CONCLUSIONES

1. El panel de genes analizado muestra una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad adecuadas para el diagnóstico clínico.
2. La técnica de NGS descrita en este trabajo detecta alteraciones moleculares recurrentes en la LMA *de novo* con precisión, siendo capaz de detectar SNVs e INDELS con una VAF inferior al 3% y 5%, respectivamente.
3. Determinadas regiones del genoma por su complejidad estructural intrínseca y algunos tipos de mutaciones como las INDELS extensas son difíciles de identificar por NGS, requiriendo análisis complementarios.
4. La inmensa mayoría de los pacientes (96%) presenta al menos una alteración genética, con una media de mutaciones por muestra de 2,32.
5. Los genes mutados recurrentemente en más de un 10% de los casos son *NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*, *CEBPA*, *NRAS*, *TET2*, *IDH2* y *TP53*.
6. La NGS es capaz de detectar todas las mutaciones encontradas por técnicas convencionales y de identificar otras mutaciones no observadas previamente.
7. Las mutaciones en genes reguladores epigenéticos se encuentran con una VAF elevada, mientras que las mutaciones en genes relacionados con la proliferación celular se detectan en proporciones más bajas, sugiriendo un patrón de adquisición secuencial de alteraciones asociado con la funcionalidad génica.
8. Mediante el empleo de NGS se identifican marcadores moleculares clínicamente relevantes en un 88,9% de los pacientes frente al 45,7% obtenido por técnicas convencionales.
9. La metodología empleada permitió clasificar a la totalidad de los pacientes analizados según los estándares diagnósticos y pronósticos actuales.
10. Las alteraciones citogenéticas y moleculares en la LMA *de novo* se relacionan siguiendo patrones concretos de asociación y exclusión, siendo más frecuentes las mutaciones en los pacientes con CN y constituyendo *TP53* el gen más excluyente.
11. Numerosos marcadores moleculares muestran impacto pronóstico independiente, destacando las mutaciones en *FLT3*-ITD que se asocian a inferior SG y a mayor IAR, las inserciones en *NPM1* sin mutación concomitante de *FLT3*-ITD que se relacionan con una SLE más prolongada, y las alteraciones en *DNMT3A*-R882 y *TP53* que conllevan una IAR más elevada.

12. Un número mayor de mutaciones conductoras no parece asociarse con tasa de respuesta y supervivencia inferiores, sino que el pronóstico viene determinado por el valor de los genes de manera individual.
13. La NGS se confirma como una herramienta eficaz para el análisis integrado del espectro mutacional de la LMA *de novo* en el diagnóstico de rutina, permitiendo profundizar en la estructura clonal de cada paciente, logrando implementar la evaluación del riesgo e identificando potenciales dianas terapéuticas que nos acercan a un tratamiento personalizado en función del riesgo individual, en un paso más hacia la medicina de precisión.

8.BIBLIOGRAFÍA

Amanuel, B., Grieu, F., Kular, J., Millward, M. & Iacopetta, B. (2012) Incidence of BRAF p.Val600Glu and p.Val600Lys mutations in a consecutive series of 183 metastatic melanoma patients from a high incidence region. *Pathology*, **44**, 357-359.

Andersen, M.K., Johansson, B., Larsen, S.O. & Pedersen-Bjergaard, J. (1998) Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica*, **83**, 483-488.

Appelbaum, F.R., Gundacker, H., Head, D.R., Slovak, M.L., Willman, C.L., Godwin, J.E., Anderson, J.E. & Petersdorf, S.H. (2006) Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, **107**, 3481-3485.

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. & Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the world health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, **127**, 2391-2405.

Au, C.H., Wa, A., Ho, D.N., Chan, T.L. & Ma, E.S.K. (2016) Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms. *Diagnostic Pathology*, **11**.

Aziz, N., Zhao, Q., Bry, L., Driscoll, D.K., Funke, B., Gibson, J.S., Grody, W.W., Hegde, M.R., Hoeltge, G.A., Leonard, D.G., Merker, J.D., Nagarajan, R., Palicki, L.A., Robetorye, R.S., Schrijver, I., Weck, K.E. & Voelkerding, K.V. (2015) College of american pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **139**, 481-493.

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Erpelinck, C., Meijer, J., van Oosterhoud, S., van Putten, W.L., Valk, P.J., Berna Beverloo, H., Tenen, D.G., Lowenberg, B. & Delwel, R. (2003) Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *The Hematology Journal : The Official Journal of the European Haematology Association*, **4**, 31-40.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the french-american-british cooperative group. *Annals of Internal Medicine*, **103**, 620-625.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. french-american-british (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, **33**, 451-458.

Boddu, P.C., Kadia, T.M., Garcia-Manero, G., Cortes, J., Alfayez, M., Borthakur, G., Konopleva, M., Jabbour, E.J., Daver, N.G., DiNardo, C.D., Naqvi, K., Yilmaz, M., Short, N.J., Pierce, S., Kantarjian, H.M. & Ravandi, F. (2019) Validation of the 2017 european LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-internal tandem duplication genotypes. *Cancer*, **125**, 1091-1100.

Bodini, M., Ronchini, C., Giaco, L., Russo, A., Melloni, G.E., Luzi, L., Sardella, D., Volorio, S., Hasan, S.K., Ottone, T., Lavorgna, S., Lo-Coco, F., Candoni, A., Fanin, R.,

Toffoletti, E., Iacobucci, I., Martinelli, G., Cignetti, A., Tarella, C., Bernard, L., Pelicci, P.G. & Riva, L. (2015) The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia: Subclonal structure revealed by undetected mutations. *Blood*, **125**, 600-605.

Bohl, S.R., Bullinger, L. & Rucker, F.G. (2019) New targeted agents in acute myeloid leukemia: New hope on the rise. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 10.3390/ijms20081983.

Boissel, N., Leroy, H., Brethon, B., Philippe, N., de Botton, S., Auvrignon, A., Raffoux, E., Leblanc, T., Thomas, X., Hermine, O., Quesnel, B., Baruchel, A., Leverger, G., Dombret, H., Preudhomme, C., Acute Leukemia French Association (ALFA) & Leucemies Aigues Myeloblastiques de l'Enfant (LAME) Cooperative Groups. (2006) Incidence and prognostic impact of c-kit, FLT3, and ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia*, **20**, 965-970.

Bolli, N., Manes, N., McKerrell, T., Chi, J., Park, N., Gundem, G., Quail, M.A., Sathiaselan, V., Herman, B., Crawley, C., Craig, J.I., Conte, N., Grove, C., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J., Varela, I., Costeas, P. & Vassiliou, G.S. (2015) Characterization of gene mutations and copy number changes in acute myeloid leukemia using a rapid target enrichment protocol. *Haematologica*, **100**, 214-222.

Bowen, D., Groves, M.J., Burnett, A.K., Patel, Y., Allen, C., Green, C., Gale, R.E., Hills, R. & Linch, D.C. (2009) TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*, **23**, 203-206.

Bowen, D.T., Frew, M.E., Hills, R., Gale, R.E., Wheatley, K., Groves, M.J., Langabeer, S.E., Kottaridis, P.D., Moorman, A.V., Burnett, A.K. & Linch, D.C. (2005) RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*, **106**, 2113-2119.

Buccisano, F., Maurillo, L., Spagnoli, A., Del Principe, M.I., Fraboni, D., Panetta, P., Ottone, T., Consalvo, M.I., Lavorgna, S., Bulian, P., Ammatuna, E., Angelini, D.F., Diamantini, A., Campagna, S., Ottaviani, L., Sarlo, C., Gattei, V., Del Poeta, G., Arcese, W., Amadori, S., Lo Coco, F. & Venditti, A. (2010) Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood*, **116**, 2295-2303.

Bullinger, L., Dohner, K. & Dohner, H. (2017) Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **35**, 934-946.

Byrd, J.C., Mrozek, K., Dodge, R.K., Carroll, A.J., Edwards, C.G., Arthur, D.C., Pettenati, M.J., Patil, S.R., Rao, K.W., Watson, M.S., Koduru, P.R., Moore, J.O., Stone, R.M., Mayer, R.J., Feldman, E.J., Davey, F.R., Schiffer, C.A., Larson, R.A., Bloomfield, C.D. & Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: Results from cancer and leukemia group B (CALGB 8461). *Blood*, **100**, 4325-4336.

Cancer Genome Atlas Research Network. (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **368**, 2059-2074.

Cher, C.Y., Leung, G.M., Au, C.H., Chan, T.L., Ma, E.S., Sim, J.P., Gill, H., Lie, A.K., Liang, R., Wong, K.F., Siu, L.L., Tsui, C.S., So, C.C., Wong, H.W., Yip, S.F., Lee, H.K., Liu, H.S., Lau, J.S., Luk, T.H., Lau, C.K., Lin, S.Y., Kwong, Y.L. & Leung, A.Y. (2016) Next-generation sequencing with a myeloid gene panel in core-binding factor AML showed KIT activation loop and TET2 mutations predictive of outcome. *Blood Cancer Journal*, **6**, e442.

Corces-Zimmerman, M.R., Hong, W.J., Weissman, I.L., Medeiros, B.C. & Majeti, R. (2014) Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 2548-2553.

Czuchlewski, D.R. & Peterson, L.C. (2016) Myeloid neoplasms with germline predisposition: A new provisional entity within the world health organization classification. *Surgical Pathology Clinics*, **9**, 165-176.

de Leng, W.W., Gadellaa-van Hooijdonk, C.G., Barendregt-Smouter, F.A., Koudijs, M.J., Nijman, I., Hinrichs, J.W., Cuppen, E., van Lieshout, S., Loberg, R.D., de Jonge, M., Voest, E.E., de Weger, R.A., Steeghs, N., Langenberg, M.H., Sleijfer, S., Willems, S.M. & Lolkema, M.P. (2016) Targeted next generation sequencing as a reliable diagnostic assay for the detection of somatic mutations in tumours using minimal DNA amounts from formalin fixed paraffin embedded material. *PloS One*, **11**, e0149405.

D'Haene, N., Le Mercier, M., De Neve, N., Blanchard, O., Delaunoy, M., El Housni, H., Dessars, B., Heimann, P., Remmelink, M., Demetter, P., Tejpar, S. & Salmon, I. (2015) Clinical validation of targeted next generation sequencing for colon and lung cancers. *PloS One*, **10**, e0138245.

DiNardo, C.D., Pratz, K., Pullarkat, V., Jonas, B.A., Arellano, M., Becker, P.S., Frankfurt, O., Konopleva, M., Wei, A.H., Kantarjian, H.M., Xu, T., Hong, W.J., Chyla, B., Potluri, J., Pollyea, D.A. & Letai, A. (2019) Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **133**, 7-17.

DiNardo, C.D., Stein, E.M., de Botton, S., Roboz, G.J., Altman, J.K., Mims, A.S., Swords, R., Collins, R.H., Mannis, G.N., Pollyea, D.A., Donnellan, W., Fathi, A.T., Pigneux, A., Erba, H.P., Prince, G.T., Stein, A.S., Uy, G.L., Foran, J.M., Traer, E., Stuart, R.K., Arellano, M.L., Slack, J.L., Sekeres, M.A., Willekens, C., Choe, S., Wang, H., Zhang, V., Yen, K.E., Kapsalis, S.M., Yang, H., Dai, D., Fan, B., Goldwasser, M., Liu, H., Agresta, S., Wu, B., Attar, E.C., Tallman, M.S., Stone, R.M. & Kantarjian, H.M. (2018) Durable remissions with ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML. *The New England Journal of Medicine*, **378**, 2386-2398.

Ding, L., Ley, T.J., Larson, D.E., Miller, C.A., Koboldt, D.C., Welch, J.S., Ritchey, J.K., Young, M.A., Lamprecht, T., McLellan, M.D., McMichael, J.F., Wallis, J.W., Lu, C., Shen, D., Harris, C.C., Dooling, D.J., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Chen, K., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., Magrini, V.J., Cook, L., McGrath, S.D., Vickery, T.L., Wendl, M.C., Heath, S., Watson, M.A., Link, D.C., Tomasson, M.H., Shannon, W.D., Payton, J.E., Kulkarni, S., Westervelt, P., Walter, M.J., Graubert, T.A., Mardis, E.R., Wilson, R.K. &

DiPersio, J.F. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, **481**, 506-510.

Dinmohamed, A.G., Visser, O., van Norden, Y., Blijlevens, N.M., Cornelissen, J.J., Huls, G.A., Huijgens, P.C., Sonneveld, P., van de Loosdrecht, A.A., Ossenkoppele, G.J., Lowenberg, B. & Jongen-Lavrencic, M. (2016) Treatment, trial participation and survival in adult acute myeloid leukemia: A population-based study in the netherlands, 1989-2012. *Leukemia*, **30**, 24-31.

Dohner, H., Weisdorf, D.J. & Bloomfield, C.D. (2015) Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **373**, 1136-1152.

Dohner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.F., Wei, A.H., Lowenberg, B. & Bloomfield, C.D. (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, **129**, 424-447.

Dohner, K., Schlenk, R.F., Habdank, M., Scholl, C., Rucker, F.G., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Frohling, S. & Dohner, H. (2005) Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood*, **106**, 3740-3746.

Duarte, R.F., Labopin, M., Bader, P., Basak, G.W., Bonini, C., Chabannon, C., Corbacioglu, S., Dreger, P., Dufour, C., Gennery, A.R., Kuball, J., Lankester, A.C., Lanza, F., Montoto, S., Nagler, A., Peffault de Latour, R., Snowden, J.A., Styczynski, J., Yakoub-Agha, I., Kroger, N., Mohty, M. & European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). (2019) Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: Current practice in europe, 2019. *Bone Marrow Transplantation*, .

Elloumi, M. (2017) Algorithms for next-generation sequencing data. Techniques, approaches, and applications.

Endrullat, C., Glöckler, J., Franke, P. & Frohme, M. (2016) Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Applied & Translational Genomics*, **10**, 2-9.

Estey, E. & Dohner, H. (2006) Acute myeloid leukaemia. *Lancet (London, England)*, **368**, 1894-1907.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettrossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G., Martelli, M.F. & GIMEMA Acute Leukemia Working Party. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England Journal of Medicine*, **352**, 254-266.

Finch, S.C. (2007) Radiation-induced leukemia: Lessons from history. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, **20**, 109-118.

Forman, D., Bray, F., Brewster, D., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Ferlay, J. & editors (2014). (2014) Cancer incidence in five continents, vol. X. IARC scientific publication no. 164.

Frohling, S., Scholl, C., Gilliland, D.G. & Levine, R.L. (2005) Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 6285-6295.

Fuster, O., Barragan, E., Bolufer, P., Cervera, J., Larrayoz, M.J., Jimenez-Velasco, A., Martinez-Lopez, J., Valencia, A., Moscardo, F. & Sanz, M.A. (2009) Rapid detection of KIT mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia using high-resolution melting analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, **11**, 458-463.

Fuster, O., Barragan, E., Bolufer, P., Such, E., Valencia, A., Ibanez, M., Dolz, S., de Juan, I., Jimenez, A., Gomez, M.T., Buno, I., Martinez, J., Cervera, J., Montesinos, P., Moscardo, F. & Sanz, M.A. (2012) Fragment length analysis screening for detection of CEBPA mutations in intermediate-risk karyotype acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, **91**, 1-7.

Gaidzik, V.I., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Zimmermann, A.S., Rock, J., Paschka, P., Corbacioglu, A., Krauter, J., Schlegelberger, B., Ganser, A., Spath, D., Kundgen, A., Schmidt-Wolf, I.G., Gotze, K., Nachbaur, D., Pfreundschuh, M., Horst, H.A., Dohner, H. & Dohner, K. (2011) RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: Results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 1364-1372.

Gaidzik, V.I., Teleanu, V., Papaemmanuil, E., Weber, D., Paschka, P., Hahn, J., Wallrabenstein, T., Kolbinger, B., Kohne, C.H., Horst, H.A., Brossart, P., Held, G., Kundgen, A., Ringhoffer, M., Gotze, K., Rummel, M., Gerstung, M., Campbell, P., Kraus, J.M., Kestler, H.A., Thol, F., Heuser, M., Schlegelberger, B., Ganser, A., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Dohner, K. & Dohner, H. (2016) RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*, **30**, 2160-2168.

Gale, R.E., Green, C., Allen, C., Mead, A.J., Burnett, A.K., Hills, R.K., Linch, D.C. & Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. (2008) The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 2776-2784.

Garcia-Garcia, G., Baux, D., Faugere, V., Moclyn, M., Koenig, M., Claustres, M. & Roux, A.F. (2016) Assessment of the latest NGS enrichment capture methods in clinical context. *Scientific Reports*, **6**, 20948.

Genovese, G., Kahler, A.K., Handsaker, R.E., Lindberg, J., Rose, S.A., Bakhoum, S.F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B.M., Fromer, M., Purcell, S.M., Svantesson, O., Landen, M., Hoglund, M., Lehmann, S., Gabriel, S.B., Moran, J.L., Lander, E.S., Sullivan, P.F., Sklar, P., Gronberg, H., Hultman, C.M. & McCarroll, S.A. (2014) Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England Journal of Medicine*, **371**, 2477-2487.

Goodwin, S., McPherson, J.D. & McCombie, W.R. (2016) Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, **17**, 333-351.

Grimwade, D. & Freeman, S.D. (2014) Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Which platforms are ready for "prime time"? *Blood*, **124**, 3345-3355.

Grimwade, D., Ivey, A. & Huntly, B.J. (2016) Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*, **127**, 29-41.

Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J., Burnett, A.K. & National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the united kingdom medical research council trials. *Blood*, **116**, 354-365.

Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A. & Goldstone, A. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. the medical research council adult and children's leukaemia working parties. *Blood*, **92**, 2322-2333.

Guo, Y., Li, J., Li, C.I., Long, J., Samuels, D.C. & Shyr, Y. (2012) The effect of strand bias in illumina short-read sequencing data. *BMC Genomics*, **13**, 666-2164-13-666.

Haferlach, C., Dicker, F., Herholz, H., Schnittger, S., Kern, W. & Haferlach, T. (2008) Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, **22**, 1539-1541.

Harada, Y., Nagata, Y., Kihara, R., Ishikawa, Y., Asou, N., Ohtake, S., Miyawaki, S., Sakura, T., Ozawa, Y., Usui, N., Kanamori, H., Ito, Y., Imai, K., Suehiro, Y., Kobayashi, S., Kitamura, K., Sakaida, E., Onizuka, M., Takeshita, A., Ishida, F., Suzushima, H., Ishizawa, K., Naoe, T., Matsumura, I., Miyazaki, Y., Ogawa, S., Kiyoi, H. & Japan Adult Leukemia Study Group JALSG. (2018) Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the japan adult leukemia study group (JALSG) AML201 study. *Leukemia Research*, **66**, 20-27.

Hasle, H., Clemmensen, I.H. & Mikkelsen, M. (2000) Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with down's syndrome. *Lancet (London, England)*, **355**, 165-169.

Higgins, C.D., dos-Santos-Silva, I., Stiller, C.A. & Swerdlow, A.J. (2001) Season of birth and diagnosis of children with leukaemia: An analysis of over 15 000 UK cases occurring from 1953-95. *British Journal of Cancer*, **84**, 406-412.

Hills, R.K., Castaigne, S., Appelbaum, F.R., Delaunay, J., Petersdorf, S., Othus, M., Estey, E.H., Dombret, H., Chevret, S., Ifrah, N., Cahn, J.Y., Recher, C., Chilton, L., Moorman, A.V. & Burnett, A.K. (2014) Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: A meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet.Oncology*, **15**, 986-996.

Hua, X., Hyland, P.L., Huang, J., Song, L., Zhu, B., Caporaso, N.E., Landi, M.T., Chatterjee, N. & Shi, J. (2016) MEGSA: A powerful and flexible framework for analyzing mutual exclusivity of tumor mutations. *American Journal of Human Genetics*, **98**, 442-455.

Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P.V., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Mermel, C.H., Burt, N., Chavez, A., Higgins, J.M., Moltchanov, V., Kuo, F.C., Kluk, M.J., Henderson, B., Kinnunen, L., Koistinen, H.A., Ladenvall, C., Getz, G., Correa, A., Banahan, B.F., Gabriel, S., Kathiresan, S., Stringham, H.M., McCarthy, M.I., Boehnke, M., Tuomilehto, J., Haiman, C., Groop, L., Atzmon, G., Wilson, J.G., Neuberg, D., Altshuler, D. & Ebert, B.L. (2014) Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England Journal of Medicine*, **371**, 2488-2498.

Jan, M., Snyder, T.M., Corces-Zimmerman, M.R., Vyas, P., Weissman, I.L., Quake, S.R. & Majeti, R. (2012) Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science Translational Medicine*, **4**, 149ra118.

Jennings, L.J., Arcila, M.E., Corless, C., Kamel-Reid, S., Lubin, I.M., Pfeifer, J., Temple-Smolkin, R.L., Voelkerding, K.V. & Nikiforova, M.N. (2017) Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: A joint consensus recommendation of the association for molecular pathology and college of american pathologists. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, **19**, 341-365.

Kayser, S., Dohner, K., Krauter, J., Kohne, C.H., Horst, H.A., Held, G., von Lilienfeld-Toal, M., Wilhelm, S., Kundgen, A., Gotze, K., Rummel, M., Nachbaur, D., Schlegelberger, B., Gohring, G., Spath, D., Morlok, C., Zucknick, M., Ganser, A., Dohner, H., Schlenk, R.F. & German-Austrian AMLSG. (2011) The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*, **117**, 2137-2145.

Kelly, L.M. & Gilliland, D.G. (2002) Genetics of myeloid leukemias. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **3**, 179-198.

Knapp, W., Strobl, H. & Majdic, O. (1994) Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry*, **18**, 187-198.

Kottaridis, P.D., Gale, R.E., Frew, M.E., Harrison, G., Langabeer, S.E., Belton, A.A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D.T., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. & Linch, D.C. (2001) The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: Analysis of 854 patients from the united kingdom medical research council AML 10 and 12 trials. *Blood*, **98**, 1752-1759.

Krishnan, A., Bhatia, S., Slovak, M.L., Arber, D.A., Niland, J.C., Nademanee, A., Fung, H., Bhatia, R., Kashyap, A., Molina, A., O'Donnell, M.R., Parker, P.A., Sniecinski, I., Snyder, D.S., Spielberger, R., Stein, A. & Forman, S.J. (2000) Predictors of therapy-related leukemia and myelodysplasia following autologous transplantation for lymphoma: An assessment of risk factors. *Blood*, **95**, 1588-1593.

Lan, Q., Zhang, L., Li, G., Vermeulen, R., Weinberg, R.S., Dosemeci, M., Rappaport, S.M., Shen, M., Alter, B.P., Wu, Y., Kopp, W., Waidyanatha, S., Rabkin, C., Guo, W., Chanock, S., Hayes, R.B., Linet, M., Kim, S., Yin, S., Rothman, N. & Smith, M.T. (2004) Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science (New York, N.Y.)*, **306**, 1774-1776.

Lancet, J.E., Uy, G.L., Cortes, J.E., Newell, L.F., Lin, T.L., Ritchie, E.K., Stuart, R.K., Strickland, S.A., Hogge, D., Solomon, S.R., Stone, R.M., Bixby, D.L., Koltz, J.E., Schiller, G.J., Wieduwilt, M.J., Ryan, D.H., Hoering, A., Banerjee, K., Chiarella, M., Louie, A.C. & Medeiros, B.C. (2018) CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for

injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **36**, 2684-2692.

Larson, R.A. (2007) Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, **20**, 29-37.

Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., Harris, C.C., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Fulton, R.S., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J.R., Lin, L., O'Laughlin, M., McMichael, J.F., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Magrini, V.J., Vickery, T.L., Hundal, J., Cook, L.L., Conyers, J.J., Swift, G.W., Reed, J.P., Alldredge, P.A., Wylie, T., Walker, J., Kalicki, J., Watson, M.A., Heath, S., Shannon, W.D., Varghese, N., Nagarajan, R., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Link, D.C., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Mardis, E.R. & Wilson, R.K. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **363**, 2424-2433.

Ley, T.J., Mardis, E.R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M.D., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B.H., McGrath, S., Hickenbotham, M., Cook, L., Abbott, R., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Pohl, C., Smith, S., Hawkins, A., Abbott, S., Locke, D., Hillier, L.W., Miner, T., Fulton, L., Magrini, V., Wylie, T., Glasscock, J., Conyers, J., Sander, N., Shi, X., Osborne, J.R., Minx, P., Gordon, D., Chinwalla, A., Zhao, Y., Ries, R.E., Payton, J.E., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Watson, M., Baty, J., Ivanovich, J., Heath, S., Shannon, W.D., Nagarajan, R., Walter, M.J., Link, D.C., Graubert, T.A., DiPersio, J.F. & Wilson, R.K. (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, **456**, 66-72.

Li, M.M., Datto, M., Duncavage, E.J., Kulkarni, S., Lindeman, N.I., Roy, S., Tsimberidou, A.M., Vnencak-Jones, C.L., Wolff, D.J., Younes, A. & Nikiforova, M.N. (2017) Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: A joint consensus recommendation of the association for molecular pathology, american society of clinical oncology, and college of american pathologists. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, **19**, 4-23.

Lin, L.I., Chen, C.Y., Lin, D.T., Tsay, W., Tang, J.L., Yeh, Y.C., Shen, H.L., Su, F.H., Yao, M., Huang, S.Y. & Tien, H.F. (2005) Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: Most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **11**, 1372-1379.

Lin, P.H., Li, H.Y., Fan, S.C., Yuan, T.H., Chen, M., Hsu, Y.H., Yang, Y.H., Li, L.Y., Yeh, S.P., Bai, L.Y., Liao, Y.M., Lin, C.Y., Hsieh, C.Y., Lin, C.C., Lin, C.H., Lien, M.Y., Chen, T.T., Ni, Y.H. & Chiu, C.F. (2017) A targeted next-generation sequencing in the molecular risk stratification of adult acute myeloid leukemia: Implications for clinical practice. *Cancer Medicine*, **6**, 349-360.

Luthra, R., Chen, H., Roy-Chowdhuri, S. & Singh, R.R. (2015) Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: Advantages and challenges. *Cancers*, **7**, 2023-2036.

Luthra, R., Patel, K.P., Reddy, N.G., Haghshenas, V., Routbort, M.J., Harmon, M.A., Barkoh, B.A., Kanagal-Shamanna, R., Ravandi, F., Cortes, J.E., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J. & Singh, R.R. (2014) Next-generation sequencing-based multigene

mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: Applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica*, **99**, 465-473.

Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Locke, D.P., Magrini, V.J., Abbott, R.M., Vickery, T.L., Reed, J.S., Robinson, J.S., Wylie, T., Smith, S.M., Carmichael, L., Eldred, J.M., Harris, C.C., Walker, J., Peck, J.B., Du, F., Dukes, A.F., Sanderson, G.E., Brummett, A.M., Clark, E., McMichael, J.F., Meyer, R.J., Schindler, J.K., Pohl, C.S., Wallis, J.W., Shi, X., Lin, L., Schmidt, H., Tang, Y., Haipek, C., Wiechert, M.E., Ivy, J.V., Kalicki, J., Elliott, G., Ries, R.E., Payton, J.E., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Watson, M.A., Baty, J., Heath, S., Shannon, W.D., Nagarajan, R., Link, D.C., Walter, M.J., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Wilson, R.K. & Ley, T.J. (2009) Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England Journal of Medicine*, **361**, 1058-1066.

Mead, A.J., Linch, D.C., Hills, R.K., Wheatley, K., Burnett, A.K. & Gale, R.E. (2007) FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **110**, 1262-1270.

Metzeler, K.H., Herold, T., Rothenberg-Thurley, M., Amler, S., Sauerland, M.C., Gorlich, D., Schneider, S., Konstandin, N.P., Dufour, A., Braundl, K., Ksienzyk, B., Zellmeier, E., Hartmann, L., Greif, P.A., Fiegl, M., Subklewe, M., Bohlander, S.K., Krug, U., Faldum, A., Berdel, W.E., Wormann, B., Buchner, T., Hiddemann, W., Braess, J., Spiekermann, K. & AMLCG Study Group. (2016) Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, **128**, 686-698.

Misyura, M., Zhang, T., Sukhai, M.A., Thomas, M., Garg, S., Kamel-Reid, S. & Stockley, T.L. (2016) Comparison of next-generation sequencing panels and platforms for detection and verification of somatic tumor variants for clinical diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, **18**, 842-850.

Murphy, K.M., Levis, M., Hafez, M.J., Geiger, T., Cooper, L.C., Smith, B.D., Small, D. & Berg, K.D. (2003) Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, **5**, 96-102.

Naz, S. & Fatima, A. (2013) Amplification of GC-rich DNA for high-throughput family-based genetic studies. *Molecular Biotechnology*, **53**, 345-350.

Ohgami, R.S., Ma, L., Merker, J.D., Gotlib, J.R., Schrijver, I., Zehnder, J.L. & Arber, D.A. (2015) Next-generation sequencing of acute myeloid leukemia identifies the significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 mutations. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **28**, 706-714.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Roberts, N.D., Potter, N.E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D.R., Teague, J.W., Butler, A.P., Greaves, M.F., Ganser, A., Dohner, K., Schlenk, R.F., Dohner, H. & Campbell, P.J. (2016) Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **374**, 2209-2221.

Paschka, P., Schlenk, R.F., Gaidzik, V.I., Habdank, M., Kronke, J., Bullinger, L., Spath, D., Kayser, S., Zucknick, M., Gotze, K., Horst, H.A., Germing, U., Dohner, H. & Dohner, K. (2010) IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 3636-3643.

Paschka, P., Schlenk, R.F., Gaidzik, V.I., Herzig, J.K., Aulitzky, T., Bullinger, L., Spath, D., Teleanu, V., Kundgen, A., Kohne, C.H., Brossart, P., Held, G., Horst, H.A., Ringhoffer, M., Gotze, K., Nachbaur, D., Kindler, T., Heuser, M., Thol, F., Ganser, A., Dohner, H. & Dohner, K. (2015) ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: A study by the german-austrian acute myeloid leukemia study group. *Haematologica*, **100**, 324-330.

Patel, J.P., Gonen, M., Figueroa, M.E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N.D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R.R., Ketterling, R.P., Gallagher, R.E., Litzow, M., van den Brink, M.R., Lazarus, H.M., Rowe, J.M., Luger, S., Ferrando, A., Paietta, E., Tallman, M.S., Melnick, A., Abdel-Wahab, O. & Levine, R.L. (2012) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **366**, 1079-1089.

Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M.K. & Christiansen, D.H. (2000) Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood*, **95**, 3273-3279.

Pfirschmann, M., Ehninger, G., Thiede, C., Bornhauser, M., Kramer, M., Rollig, C., Hasford, J., Schaich, M. & Study Alliance Leukaemia (SAL). (2012) Prediction of post-remission survival in acute myeloid leukaemia: A post-hoc analysis of the AML96 trial. *The Lancet. Oncology*, **13**, 207-214.

Pratcorona, M., Abbas, S., Sanders, M.A., Koenders, J.E., Kavelaars, F.G., Erpelinck-Verschueren, C.A., Zeilemakers, A., Lowenberg, B. & Valk, P.J. (2012) Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: Prevalence and prognostic value. *Haematologica*, **97**, 388-392.

Pratcorona, M., Brunet, S., Nomdedeu, J., Ribera, J.M., Tormo, M., Duarte, R., Escoda, L., Guardia, R., Queipo de Llano, M.P., Salamero, O., Bargay, J., Pedro, C., Marti, J.M., Torrebaddell, M., Diaz-Beya, M., Camos, M., Colomer, D., Hoyos, M., Sierra, J., Esteve, J. & Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblasticas. (2013) Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: Relevance to post-remission therapy. *Blood*, **121**, 2734-2738.

Rehm, H.L., Bale, S.J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J.S., Brown, K.K., Deignan, J.L., Friez, M.J., Funke, B.H., Hegde, M.R., Lyon, E. & Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, **15**, 733-747.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L. & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of

sequence variants: A joint consensus recommendation of the american college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, **17**, 405-424.

Samorodnitsky, E., Jewell, B.M., Hagopian, R., Miya, J., Wing, M.R., Lyon, E., Damodaran, S., Bhatt, D., Reeser, J.W., Datta, J. & Roychowdhury, S. (2015) Evaluation of hybridization capture versus amplicon-based methods for whole-exome sequencing. *Human Mutation*, **36**, 903-914.

Schlenk, R.F., Dohner, K., Krauter, J., Frohling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A., Dohner, H. & German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **358**, 1909-1918.

Schlenk, R.F., Kayser, S., Bullinger, L., Kobbe, G., Casper, J., Ringhoffer, M., Held, G., Brossart, P., Lubbert, M., Salih, H.R., Kindler, T., Horst, H.A., Wulf, G., Nachbaur, D., Gotze, K., Lamparter, A., Paschka, P., Gaidzik, V.I., Teleanu, V., Spath, D., Benner, A., Krauter, J., Ganser, A., Dohner, H., Dohner, K. & German-Austrian AML Study Group. (2014) Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*, **124**, 3441-3449.

Schnittger, S., Kern, W., Tschulik, C., Weiss, T., Dicker, F., Falini, B., Haferlach, C. & Haferlach, T. (2009) Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*, **114**, 2220-2231.

Schnittger, S., Eder, C., Jeromin, S., Alpermann, T., Fasan, A., Grossmann, V., Kohlmann, A., Illig, T., Klopp, N., Wichmann, H.E., Kreuzer, K.A., Schmid, C., Staib, P., Peceny, R., Schmitz, N., Kern, W., Haferlach, C. & Haferlach, T. (2013) ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*, **27**, 82-91.

Shin, S.Y., Lee, S.T., Kim, H.J., Cho, E.H., Kim, J.W., Park, S., Jung, C.W. & Kim, S.H. (2016) Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations. *Oncotarget*, .

Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., McLeod, J.L., Doedens, M., Medeiros, J.J., Marke, R., Kim, H.J., Lee, K., McPherson, J.D., Hudson, T.J., HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, Brown, A.M., Yousif, F., Trinh, Q.M., Stein, L.D., Minden, M.D., Wang, J.C. & Dick, J.E. (2014) Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, **506**, 328-333.

Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. (2017) Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **67**, 7-30.

Slovak, M.L., Kopecky, K.J., Cassileth, P.A., Harrington, D.H., Theil, K.S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C.L., Head, D.R., Rowe, J.M., Forman, S.J. & Appelbaum, F.R. (2000) Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: A southwest oncology group/eastern cooperative oncology group study. *Blood*, **96**, 4075-4083.

Spencer, D.H., Abel, H.J., Lockwood, C.M., Payton, J.E., Szankasi, P., Kelley, T.W., Kulkarni, S., Pfeifer, J.D. & Duncavage, E.J. (2013) Detection of FLT3 internal tandem duplication in targeted, short-read-length, next-generation sequencing data. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, **15**, 81-93.

Stein, E.M., DiNardo, C.D., Fathi, A.T., Pollyea, D.A., Stone, R.M., Altman, J.K., Roboz, G.J., Patel, M.R., Collins, R., Flinn, I.W., Sekeres, M.A., Stein, A.S., Kantarjian, H.M., Levine, R.L., Vyas, P., MacBeth, K.J., Tosolini, A., VanOostendorp, J., Xu, Q., Gupta, I., Lila, T., Risueno, A., Yen, K.E., Wu, B., Attar, E.C., Tallman, M.S. & de Botton, S. (2019) Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*, **133**, 676-687.

Stone, R.M., Mandrekar, S.J., Sanford, B.L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C.D., Thiede, C., Prior, T.W., Dohner, K., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R.B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M.A., Brandwein, J.M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F.R., Medeiros, B.C., Tallman, M.S., Krauter, J., Schlenk, R.F., Ganser, A., Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R.A. & Dohner, H. (2017) Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *The New England Journal of Medicine*, **377**, 454-464.

Strom, S.P. (2016) Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biology & Medicine*, **13**, 3-11.

Sukhai, M.A., Craddock, K.J., Thomas, M., Hansen, A.R., Zhang, T., Siu, L., Bedard, P., Stockley, T.L. & Kamel-Reid, S. (2016) A classification system for clinical relevance of somatic variants identified in molecular profiling of cancer. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, **18**, 128-136.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. & (Eds.). (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. & (Eds). (2017) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition).

Taylor, A.M. (2001) Chromosome instability syndromes. *Best Practice & Research.Clinical Haematology*, **14**, 631-644.

Terwijn, M., van Putten, W.L., Kelder, A., van der Velden, V.H., Brooimans, R.A., Pabst, T., Maertens, J., Boeckx, N., de Greef, G.E., Valk, P.J., Preijers, F.W., Huijgens, P.C., Drager, A.M., Schanz, U., Jongen-Lavrecic, M., Biemond, B.J., Passweg, J.R., van Gelder, M., Wijermans, P., Graux, C., Bargetzi, M., Legdeur, M.C., Kuball, J., de Weerdt, O., Chalandon, Y., Hess, U., Verdonck, L.F., Gratama, J.W., Oussoren, Y.J., Scholten, W.J., Slomp, J., Snel, A.N., Vekemans, M.C., Lowenberg, B., Ossenkoppele, G.J. & Schuurhuis, G.J. (2013) High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: Data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 3889-3897.

Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schakel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhauser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. & Illmer, T. (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia:

Association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, **99**, 4326-4335.

Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T. & Mesirov, J.P. (2013) Integrative genomics viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, **14**, 178-192.

Tsai, C.H., Hou, H.A., Tang, J.L., Liu, C.Y., Lin, C.C., Chou, W.C., Tseng, M.H., Chiang, Y.C., Kuo, Y.Y., Liu, M.C., Liu, C.W., Lin, L.I., Tsay, W., Yao, M., Li, C.C., Huang, S.Y., Ko, B.S., Hsu, S.C., Chen, C.Y., Lin, C.T., Wu, S.J. & Tien, H.F. (2016) Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **30**, 1485-1492.

Vellenga, E., van Putten, W., Ossenkoppele, G.J., Verdonck, L.F., Theobald, M., Cornelissen, J.J., Huijgens, P.C., Maertens, J., Gratwohl, A., Schaafsma, R., Schanz, U., Graux, C., Schouten, H.C., Ferrant, A., Bargetzi, M., Fey, M.F., Lowenberg, B., Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group (HOVON) & Swiss Group for Clinical Cancer Research Collaborative Group (SAKK). (2011) Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood*, **118**, 6037-6042.

Wakita, S., Yamaguchi, H., Ueki, T., Usuki, K., Kurosawa, S., Kobayashi, Y., Kawata, E., Tajika, K., Gomi, S., Koizumi, M., Fujiwara, Y., Yui, S., Fukunaga, K., Ryotokuji, T., Hirakawa, T., Arai, K., Kitano, T., Kosaka, F., Tamai, H., Nakayama, K., Fukuda, T. & Inokuchi, K. (2016) Complex molecular genetic abnormalities involving three or more genetic mutations are important prognostic factors for acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **30**, 545-554.

Wang, B., Liu, Y., Hou, G., Wang, L., Lv, N., Xu, Y., Xu, Y., Wang, X., Xuan, Z., Jing, Y., Li, H., Jin, X., Deng, S., Wang, L., Gao, X., Dou, L., Liang, J., Chen, C., Li, Y. & Yu, L. (2016) Mutational spectrum and risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia patients based on next-generation sequencing. *Oncotarget*, **7**, 32065-32078.

Wei, A.H., Strickland, S.A., Jr, Hou, J.Z., Fiedler, W., Lin, T.L., Walter, R.B., Enjeti, A., Tiong, I.S., Savona, M., Lee, S., Chyla, B., Popovic, R., Salem, A.H., Agarwal, S., Xu, T., Fakouhi, K.M., Humerickhouse, R., Hong, W.J., Hayslip, J. & Roboz, G.J. (2019) Venetoclax combined with low-dose cytarabine for previously untreated patients with acute myeloid leukemia: Results from a phase Ib/II study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **37**, 1277-1284.

Welch, J.S., Ley, T.J., Link, D.C., Miller, C.A., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Wartman, L.D., Lamprecht, T.L., Liu, F., Xia, J., Kandoth, C., Fulton, R.S., McLellan, M.D., Dooling, D.J., Wallis, J.W., Chen, K., Harris, C.C., Schmidt, H.K., Kalicki-Veizer, J.M., Lu, C., Zhang, Q., Lin, L., O'Laughlin, M.D., McMichael, J.F., Delehaunty, K.D., Fulton, L.A., Magrini, V.J., McGrath, S.D., Demeter, R.T., Vickery, T.L., Hundal, J., Cook, L.L., Swift, G.W., Reed, J.P., Alldredge, P.A., Wylie, T.N., Walker, J.R., Watson, M.A., Heath, S.E., Shannon, W.D., Varghese, N., Nagarajan, R., Payton, J.E., Baty, J.D., Kulkarni, S., Klotz, J.M., Tomasson, M.H., Westervelt, P., Walter, M.J., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Ding, L., Mardis, E.R. & Wilson, R.K. (2012) The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, **150**, 264-278.

Whitman, S.P., Archer, K.J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B.D., Carroll, A.J., Mrozek, K., Vardiman, J.W., George, S.L., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D. & Caligiuri, M.A. (2001) Absence of the wild-type allele predicts poor

prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: A cancer and leukemia group B study. *Cancer Research*, **61**, 7233-7239.

Whitman, S.P., Ruppert, A.S., Radmacher, M.D., Mrozek, K., Paschka, P., Langer, C., Baldus, C.D., Wen, J., Rucke, F., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G. & Bloomfield, C.D. (2008) FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*, **111**, 1552-1559.

Wouters, B.J., Lowenberg, B., Erpelinck-Verschueren, C.A., van Putten, W.L., Valk, P.J. & Delwel, R. (2009) Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*, **113**, 3088-3091.

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R. & Naoe, T. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, **97**, 2434-2439.

Yamazaki, J., Taby, R., Jelinek, J., Raynal, N.J., Cesaroni, M., Pierce, S.A., Kornblau, S.M., Bueso-Ramos, C.E., Ravandi, F., Kantarjian, H.M. & Issa, J.P. (2015) Hypomethylation of TET2 target genes identifies a curable subset of acute myeloid leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*, **108**, 10.1093/jnci/djv323.

Yan, B., Hu, Y., Ng, C., Ban, K.H.K., Tan, T.W., Huan, P.T., Lee, P.-., Chiu, L., Seah, E., Ng, C.H., Koay, E.S.-. & Chng, W.-. (2016) Coverage analysis in a targeted amplicon-based next-generation sequencing panel for myeloid neoplasms. *Journal of Clinical Pathology*, .

Yanada, M., Matsuo, K., Suzuki, T., Kiyoi, H. & Naoe, T. (2005) Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Leukemia*, **19**, 1345-1349.

Yohe, S., Hauge, A., Bunjer, K., Kemmer, T., Bower, M., Schomaker, M., Onsongo, G., Wilson, J., Erdmann, J., Zhou, Y., Deshpande, A., Spears, M.D., Beckman, K., Silverstein, K.A. & Thyagarajan, B. (2015) Clinical validation of targeted next-generation sequencing for inherited disorders. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **139**, 204-210.

Young, A.L., Challen, G.A., Birman, B.M. & Druley, T.E. (2016) Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nature Communications*, **7**, 12484.

9. ANEXOS

9.1. Tablas complementarias

Tabla complementaria I. Todas las mutaciones relevantes encontradas mediante el panel de NGS clasificadas según las guías internacionales. **S.C.:** Significación clínica. **Clase I:** Variantes clínicamente relevantes. **Clase II:** Variantes potencialmente relevantes. **Clase III:** Variantes con relevancia clínica desconocida.

Gen	Tránsito	Tipo	Función	Exón	Proteína	Nomenclatura gen	Locus	N	S.C
ASXL1	NM_015338.5	SNV	Cambio de sentido	12	p.Gly646Cys	c.1936G>T	chr20:31022451	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	12	p.Ser1212Phe	c.3635C>T	chr20:31024150	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	12	p.Gly1288Asp	c.3863G>A	chr20:31024378	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	12	p.Val1367Ile	c.4099G>A	chr20:31024614	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	12	p.Gln592Ter	c.1774C>T	chr20:31022289	1	Clase I
		SNV	Sin sentido	12	p.Cys605Ter	c.1815C>A	chr20:31022330	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	12	p.Gly966del	c.2894_2896delGAG	chr20:31023408	2	Clase I
		INDEL	Frameshift	12	p.Lys618fs	c.1848_1849insATTA	chr20:31022363	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	12	p.Ala619fs	c.1851_1852insA	chr20:31022366	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	12	p.Gly646fs	c.1926_1927insG	chr20:31022441	2	Clase I
BRAF	NM_004333.4	SNV	Cambio de sentido	15	p.Val600Glu	c.1799T>A	chr7:140453136	1	Clase II
CBL	NM_005188.3	SNV	Cambio de sentido	9	p.Gly415Ser	c.1243G>A	chr11:119149235	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	9	p.Cys416Ser	c.1246T>A	chr11:119149238	1	Clase III
CEBPA	NM_004364.4	SNV	Cambio de sentido	1	p.Arg297Leu	c.890G>T	chr19:33792431	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	1	p.Gln305Pro	c.914A>C	chr19:33792407	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	1	p.Gln311Pro	c.932A>C	chr19:33792389	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	1	p.Met354Val	c.1060A>G	chr19:33792261	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	1	p.Gln88Ter	c.262C>T	chr19:33793059	1	Clase I
		SNV	Sin sentido	1	p.Glu290Ter	c.868G>T	chr19:33792453	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Ala303_Lys304insPhe	c.909_910insTTC	chr19:33792411	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Gln305dup	c.916_917insAGC	chr19:33792404	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Arg306_Asn307ins5*	c.920_921ins15*	chr19:33792400	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Glu309_Thr310insLys	c.928_929insAGA	chr19:33792392	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Gln312dup	c.936_937insCAG	chr19:33792384	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Lys313_Val314ins11*	c.940_941ins33*	chr19:33792380	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Leu315_Glu316ins15*	c.947_948ins45*	chr19:33792373	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Leu317_Thr318insMet	c.952_953insTGA	chr19:33792368	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Asp320_Asn321ins12*	c.962_963ins36*	chr19:33792358	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Asn293del	c.878_880delACA	chr19:33792440	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	1	p.Gln312del	c.934_936delCAG	chr19:33792384	1	Clase I

Gen	Tránsito	Tipo	Función	Exón	Proteína	Nomenclatura gen	Locus	N	S.C
CEBPA	NM_004364.4	INDEL	Frameshift	1	p.Ser21fs	c.62_63insAG	chr19:33793258	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Ile68fs	c.200_201insTA	chr19:33793120	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Ala113fs	c.336_337insT	chr19:33792984	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.E59fs	c.175_207del22	chr19:33302380	2	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Leu81fs	c.241_241delC	chr19:33793079	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Gln83fs	c.247_247delC	chr19:33793073	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Lys90fs	c.267_267delG	chr19:33793053	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Ala111fs	c.332_339del8	chr19:33792981	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Gly114fs	c.340_341delGG	chr19:33792979	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	1	p.Asn321fs	c.962_962delA	chr19:33792358	1	Clase I
DNMT3A	NM_022552.4	SNV	Cambio de sentido	8	p.Pro307Ser	c.919C>T	chr2:25470555	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	8	p.Arg326Cys	c.976C>T	chr2:25470498	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	14	p.Gly543Cys	c.1627G>T	chr2:25467449	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	15	p.Trp581Arg	c.1741T>A	chr2:25467134	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	16	p.Ala644Thr	c.1930G>A	chr2:25466773	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	17	p.Ser663Leu	c.1988C>T	chr2:25464525	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	17	p.Ser669Phe	c.2006C>T	chr2:25464507	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	19	p.Trp753Cys	c.2259G>T	chr2:25463234	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	20	p.Ala782Thr	c.2344G>A	chr2:25462063	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	20	p.Trp795Arg	c.2383T>C	chr2:25462024	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	23	p.Arg882Cys	c.2644C>T	chr2:25457243	15	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	23	p.Arg882His	c.2645G>A	chr2:25457242	15	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	23	p.Arg882Ser	c.2644C>A	chr2:25457243	2	Clase II
		SNV	Sin sentido	8	p.Trp305Ter	c.915G>A	chr2:25470559	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	8	p.Arg320Ter	c.958C>T	chr2:25470516	2	Clase II
		SNV	Sin sentido	12	p.Tyr481Ter	c.1443C>A	chr2:25468920	1	Clase II
		INDEL	No Frameshift	9	p.Lys367_Ala368ins6*	c.1100_1101ins18*	chr2:25469941	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	8	p.Leu295fs	c.884_884delT	chr2:25470589	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	10	p.Pro385fs	c.1154_1154delC	chr2:25469613	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	11	p.Glu444fs	c.1326_1338del13*	chr2:25469119	1	Clase II
INDEL	Frameshift	20	p.Arg792fs	c.2374_2374delC	chr2:25462032	1	Clase II		
INDEL	Sin sentido	19	p.Glu733Ter	c.2196_2197insT	chr2:25463296	1	Clase II		

Gen	Tránsito	Tipo	Función	Exón	Proteína	Nomenclatura gen	Locus	N	S.C
FLT3	NM_004119.2	SNV	Cambio de sentido	16	p.Asn676Lys	c.2028C>A	chr13:28602340	2	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	16	p.Asn676His	c.2026A>C	chr13:28602342	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	16	p.Asn676Thr	c.2027A>C	chr13:28602341	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	16	p.Ala680Val	c.2039C>T	chr13:28602329	2	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	20	p.Asp835Glu	c.2505T>G	chr13:28592640	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	20	p.Asp835His	c.2503G>C	chr13:28592642	2	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	20	p.Asp835Tyr	c.2503G>T	chr13:28592642	4	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	20	p.Asn841Ile	c.2522A>T	chr13:28592623	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	21	p.Ala848Pro	c.2542G>C	chr13:28589838	1	Clase I
		INDEL	No Frameshift	20	p.Asp835_Ile836delinsVal	c.2505_2507delTAT	chr13:28592637	1	Clase I
GATA2	NM_032638.4	SNV	Cambio de sentido	3	p.Thr124Met	c.371C>T	chr3:128205070	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Gly149Arg	c.445G>A	chr3:128204996	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	4	p.Asn317Ser	c.950A>G	chr3:128202770	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	4	p.Ala318Val	c.953C>T	chr3:128202767	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	4	p.Leu321Phe	c.961C>T	chr3:128202759	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	4	p.Leu321His	c.962T>A	chr3:128202758	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	4	p.Arg330Leu	c.989G>T	chr3:128202731	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	5	p.Trp360Leu	c.1079G>T	chr3:128200726	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	5	p.Arg362Gln	c.1085G>A	chr3:128200720	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	6	p.Asn402Asp	c.1204A>G	chr3:128200101	1	Clase III
		MNV	Cambio de sentido	4	p.Ala318Ile	c.952_953delGCinsAT	chr3:128202767	1	Clase III
		INDEL	No Frameshift	6	p.Met388_Glu391delinsLys	c.1163_1171del9*	chr3:128200133	1	Clase III
		INDEL	Frameshift	2	p.Ala61fs	c.180_181insATAG	chr3:128205694	1	Clase III
		IDH1	NM_005896.3	SNV	Cambio de sentido	4	p.Arg132Cys	c.394C>T	chr2:209113113
SNV	Cambio de sentido			4	p.Arg132Gly	c.394C>G	chr2:209113113	1	Clase II
SNV	Cambio de sentido			4	p.Arg132Ser	c.394C>A	chr2:209113113	1	Clase II
SNV	Cambio de sentido			4	p.Arg132His	c.395G>A	chr2:209113112	4	Clase II
IDH2	NM_002168.2	SNV	Cambio de sentido	4	p.Arg140Gln	c.419G>A	chr15:90631934	13	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	4	p.Arg140Leu	c.419G>T	chr15:90631934	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	4	p.Arg172Lys	c.515G>A	chr15:90631838	5	Clase II

Gen	Tránsito	Tipo	Función	Exón	Proteína	Nomenclatura gen	Locus	N	S.C
KIT	NM_000222.2	SNV	Cambio de sentido	8	p.Thr417Pro	c.1249A>C	chr4:55589767	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	8	p.Asp419Ala	c.1256A>C	chr4:55589774	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	17	p.Asp816Val	c.2447A>T	chr4:55599321	2	Clase II
		MNV	Cambio de sentido	8	p.Tyr418Trp	c.1253_1254delACinsGG	chr4:55589771	1	Clase II
		MNV	Cambio de sentido	8	p.Asp419Gly	c.1256_1257delACinsGG	chr4:55589774	1	Clase II
		MNV	Cambio de sentido	17	p.Asp816Phe	c.2446_2447delGainsTT	chr4:55599320	1	Clase II
		MNV	Cambio de sentido	8	p.Asp419Pro	c.1255_1256delGainsCC	chr4:55589773	1	Clase II
		INDEL	No Frameshift	11	p.Trp582_Glu583insArg	c.1744_1745insGGA	chr4:55593678	1	Clase II
		INDEL	No Frameshift	8	p.Thr417_Tyr418del	c.1248_1253delGACTTA	chr4:55589765	1	Clase II
		INDEL	No Frameshift	8	p.Tyr418del	c.1252_1254delITAC	chr4:55589769	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	8	p.Arg420fs	c.1257_1258insCT	chr4:55589775	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	8	p.Thr417fs	c.1250_1254delCTTAC	chr4:55589767	1	Clase II
KRAS	NM_033360.3	SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Ala	c.35G>C	chr12:25398284	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Asp	c.35G>A	chr12:25398284	2	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Ser	c.34G>A	chr12:25398285	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly13Asp	c.38G>A	chr12:25398281	2	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Gln61Pro	c.182A>C	chr12:25380276	1	Clase II
NPM1	NM_002520.6	INDEL	Frameshift	11	p.Trp288fs	c.859_860insTCTG	chr5:170837543	52	Clase I
		INDEL	Frameshift	11	p.Trp288fs	c.860_861insCTGC	chr5:170837544	3	Clase I
		INDEL	Frameshift	11	p.Trp288fs	c.861_862insTGCA	chr5:170837545	3	Clase I
		INDEL	Frameshift	11	p.Trp288fs	c.861_862insTGCT	chr5:170837545	3	Clase I
		INDEL	Frameshift	11	p.Trp288fs	c.862_863insGCCG	chr5:170837546	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	11	p.Trp288fs	c.863_864insCAGA	chr5:170837547	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	11	p.Trp290fs	c.867_868insAAGT	chr5:170837551	1	Clase I
NRAS	NM_002524.4	SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Ala	c.35G>C	chr1:115258747	2	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Asp	c.35G>A	chr1:115258747	6	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Cys	c.34G>T	chr1:115258748	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Ser	c.34G>A	chr1:115258748	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly12Val	c.35G>T	chr1:115258747	2	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly13Arg	c.37G>C	chr1:115258745	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	2	p.Gly13Asp	c.38G>A	chr1:115258744	1	Clase II

Gen	Tránsito	Tipo	Función	Exón	Proteína	Nomenclatura gen	Locus	N	S.C		
NRAS	NM_002524.4	SNV	Cambio de sentido	3	p.Gln61Arg	c.182A>G	chr1:115256529	6	Clase II		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Gln61His	c.183A>C	chr1:115256528	1	Clase II		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Gln61Pro	c.182A>C	chr1:115256528	1	Clase II		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Gln61Lys	c.181C>A	chr1:115256530	3	Clase II		
PTPN11	NM_002834.3	SNV	Cambio de sentido	3	p.Gly60Val	c.179G>T	chr12:112888163	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Asp61Asn	c.181G>A	chr12:112888165	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Ala72Val	c.215C>T	chr12:112888199	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Ala72Thr	c.214G>A	chr12:112888198	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Thr73Ile	c.218C>T	chr12:112888202	2	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	3	p.Asp106Ala	c.317A>C	chr12:112888301	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	13	p.Pro491Thr	c.1471C>A	chr12:112926851	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	13	p.Ser502Leu	c.1505C>T	chr12:112926885	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	13	p.Gly503Arg	c.1507G>C	chr12:112926887	1	Clase III		
		SNV	Cambio de sentido	13	p.Met516Thr	c.1547T>C	chr12:112926927	1	Clase III		
		RUNX1	NM_001754.4	SNV	Cambio de sentido	4	p.Ala60Val	c.179C>T	chr21:36259312	2	Clase I
				SNV	Cambio de sentido	4	p.Pro103Arg	c.308C>G	chr21:36259183	1	Clase I
SNV	Cambio de sentido			4	p.Arg107His	c.320G>A	chr21:36259171	1	Clase I		
SNV	Cambio de sentido			5	p.Arg162Gly	c.484A>G	chr21:36252878	1	Clase I		
SNV	Cambio de sentido			6	p.Asp198Gly	c.593A>G	chr21:36231791	1	Clase I		
SNV	Cambio de sentido			6	p.Arg201Gln	c.602G>A	chr21:36231782	1	Clase I		
SNV	Sin sentido			6	p.Arg204Ter	c.610C>T	chr21:36231774	1	Clase I		
SNV	Sin sentido			8	p.Arg320Ter	c.958C>T	chr21:36171607	1	Clase I		
INDEL	No Frameshift			7	p.Ser226delinsThrArg	c.676_677insCCC	chr21:36206835	1	Clase I		
INDEL	Frameshift			5	p.Glu143fs	c.425_426insGC	chr21:36252936	1	Clase I		
INDEL	Frameshift			6	p.Ser172fs	c.514_515insA	chr21:36231869	1	Clase I		
INDEL	Frameshift			8	p.Ala299fs	c.894_895insA	chr21:36171670	1	Clase I		
INDEL	Frameshift			4	p.Leu112fs	c.334_334delC	chr21:36259156	1	Clase I		
INDEL	Frameshift			5	p.Asn139fs	c.416_416delA	chr21:36252945	1	Clase I		

Gen	Tránsito	Tipo	Función	Exón	Proteína	Nomenclatura gen	Locus	N	S.C
TET2	NM_001127208.2	SNV	Cambio de sentido	6	p.Arg1261His	c.3782G>A	chr4:106164914	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	7	p.Cys1273Ser	c.3818G>C	chr4:106180790	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	7	p.Gly1288Asp	c.3863G>A	chr4:106180835	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	8	p.Met1333Arg	c.3998T>G	chr4:106182959	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	9	p.Cys1358Arg	c.4072T>C	chr4:106190794	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	9	p.His1380Tyr	c.4138C>T	chr4:106190860	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	9	p.Thr1393Ile	c.4178C>T	chr4:106190900	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	10	p.Ala1512Val	c.4535C>T	chr4:106194073	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	11	p.Ala1837Gly	c.5510C>G	chr4:106197177	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	11	p.Ile1871Asn	c.5612T>A	chr4:106197279	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	11	p.Ile1873Thr	c.5618T>C	chr4:106197285	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	11	p.Thr1884Ala	c.5650A>G	chr4:106197317	1	Clase II
		SNV	Cambio de sentido	11	p.Pro1962Leu	c.5885C>T	chr4:106197552	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	3	p.Gln1068Ter	c.3202C>T	chr4:106158301	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	6	p.Tyr1255Ter	c.3765C>G	chr4:106164897	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	10	p.Gln1414Ter	c.4240C>T	chr4:106193778	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	10	p.Arg1465Ter	c.4393C>T	chr4:106193931	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	11	p.Gln1527Ter	c.4579C>T	chr4:106196246	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	11	p.Gln1825Ter	c.5473C>T	chr4:106197140	1	Clase II
		SNV	Sin sentido	11	p.Ser1848Ter	c.5543C>G	chr4:106197210	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	3	p.Glu537fs	c.1605_1606insA	chr4:106156704	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	3	p.Ser696fs	c.2085_2086insA	chr4:106157184	1	Clase II
		INDEL	Frameshift	11	p.Ser1650fs	c.4946_4947insC	chr4:106196613	1	Clase II
TP53	NM_000546.5	SNV	Cambio de sentido	5	p.Lys132Arg	c.395A>G	chr17:7578535	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	5	p.Arg175His	c.524G>A	chr17:7578406	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	5	p.His179Pro	c.536A>C	chr17:7578394	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	6	p.Ile195Thr	c.584T>C	chr17:7578265	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	6	p.Tyr220Cys	c.659A>G	chr17:7578190	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	7	p.Met237Ile	c.711G>A	chr17:7577570	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	7	p.Cys238Arg	c.712T>C	chr17:7577569	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	7	p.Gly245Ser	c.733G>A	chr17:7577548	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	7	p.Met246Ile	c.738G>A	chr17:7577543	1	Clase I

Gen	Tránsito	Tipo	Función	Exón	Proteína	Nomenclatura gen	Locus	N	S.C
TP53	NM_000546.5	SNV	Cambio de sentido	7	p.Arg248Gln	c.743G>A	chr17:7577538	2	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	8	p.Val272Met	c.814G>A	chr17:7577124	1	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	8	p.Arg273His	c.818G>A	chr17:7577120	2	Clase I
		SNV	Cambio de sentido	8	p.Cys275Tyr	c.824G>A	chr17:7577114	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	3	p.Asn30fs	c.89_90insA	chr17:7579706	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	6	p.Ser215fs	c.645_651del7*	chr17:7578197	1	Clase I
		INDEL	Frameshift	9	p.Asn311fs	c.933_933delC	chr17:7576912	1	Clase I
WT1	NM_024426.4	SNV	Cambio de sentido	7	p.Pro376Arg	c.1127C>G	chr11:32417925	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	7	p.Arg380Gly	c.1138C>G	chr11:32417914	1	Clase III
		SNV	Cambio de sentido	9	p.His465Tyr	c.1393C>T	chr11:32413557	1	Clase III
		SNV	Sin sentido	7	p.Arg369Ter	c.1105C>T	chr11:32417947	1	Clase III
		SNV	Sin sentido	7	p.Arg380Cys	c.1137_1138ins26*	chr11:32417914	1	Clase III
		INDEL	Frameshift	7	p.Arg380fs	c.1138_1139ins8*	chr11:32417913	1	Clase III
		INDEL	Frameshift	7	p.Ser381fs	c.1140_1141ins11*	chr11:32417911	1	Clase III
		INDEL	Frameshift	7	p.Ala382fs	c.1142_1143ins10*	chr11:32417909	1	Clase III
INDEL	Frameshift	7	p.Arg401fs	c.1202_1203delGA	chr11:32417848	1	Clase III		

9.2. Figuras complementarias

Figura I. Esquema de tratamiento según protocolo PETHEMA LMA99 (< 65 años).

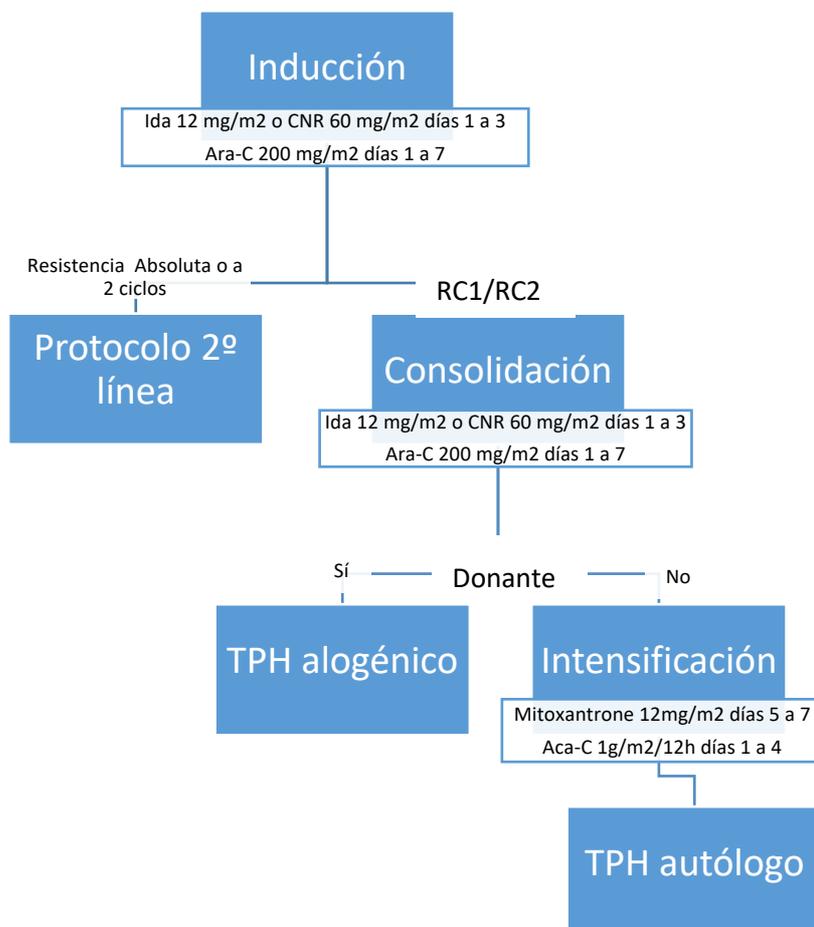


Figura II. A) Esquema de tratamiento y B) Grupos de riesgo, según el protocolo PETHEMA LMA2007.

A)

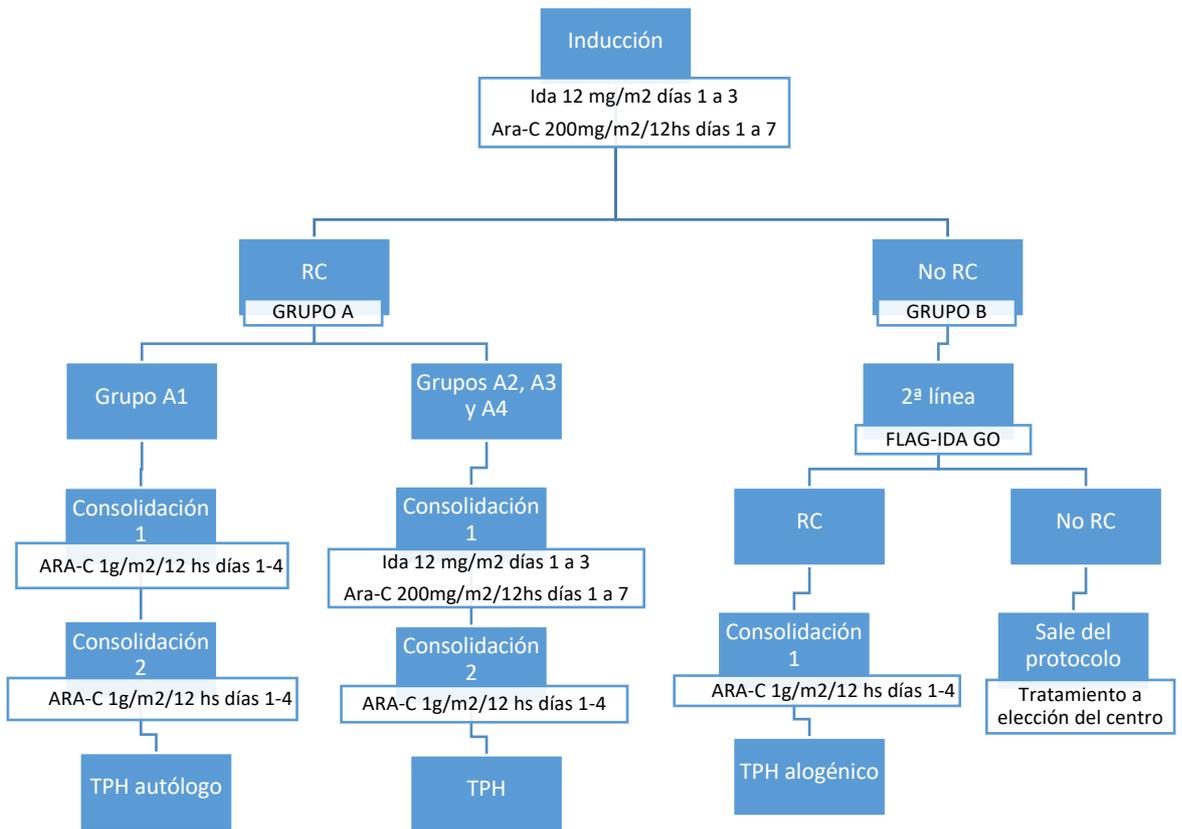


Figura II. A) Esquema de tratamiento y B) Grupos de riesgo, según el protocolo PETHEMA LMA2007 (continuación).

B)

Grupo A1 Riesgo estándar	<ul style="list-style-type: none">•EMR <0,1%•LMA CBF: (inv16) o t(8,21) sin mutaciones en <i>KIT</i>
Grupo A2 Riesgo intermedio 1	<ul style="list-style-type: none">•EMR <0,1%•Cariotipo riesgo intermedio•<i>NPM1</i> positivo y <i>FLT3-ITD</i> negativo
Grupo A3 Riesgo intermedio 2	<ul style="list-style-type: none">•EMR <0,1%•Cariotipo riesgo intermedio•<i>NPM1</i> negativo y <i>FLT3-ITD</i> negativo•<i>FLT3-ITD</i> positivo con ratio <0.8.
Grupo A4 Riesgo alto	<ul style="list-style-type: none">•EMR >0,1%•Cariotipo alto riesgo•Cariotipo riesgo intermedio <i>FLT3-ITD</i> positivo ratio >0,8•LMA CBF con mutaciones en <i>KIT</i>

Figura III. A) Esquema de tratamiento y B) Grupos de riesgo, según el protocolo PETHEMA LMA2010.

A)

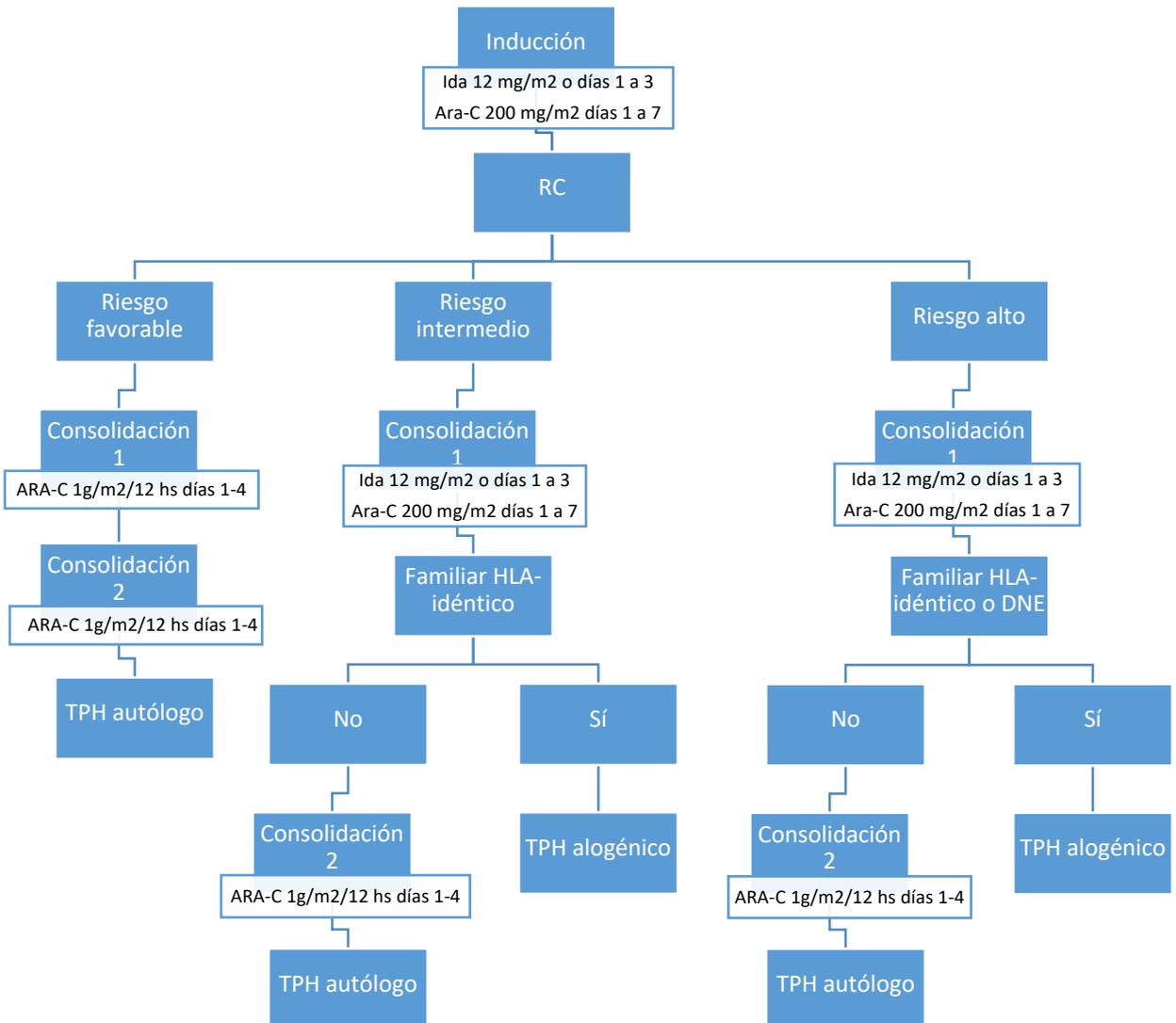


Figura III. A) Esquema de tratamiento y B) Grupos de riesgo, según el protocolo PETHEMA LMA2010 (continuación).

B)

Grupo Riesgo favorable	<ul style="list-style-type: none">• RC tras primer ciclo de inducción y EMR < 0,1% y• LMA CBF: (inv16) o t(8,21) o• Cariotipo normal, <i>NPM1+</i>, <i>FLT3-ITD-</i> o• Cariotipo normal, <i>CEBPA</i> bialélico
Grupo Riesgo intermedio	<ul style="list-style-type: none">• Pacientes sin criterios de riesgo favorable ni criterios de riesgo desfavorable
Grupo Riesgo alto	<ul style="list-style-type: none">• No RC tras primer ciclo de inducción o• EMR >0,1% o• Cariotipo alto riesgo o• Cariotipo riesgo intermedio <i>FLT3-ITD+</i> ratio >0,7 o• LMA secundaria a SMD

Figura IV. Grupos de genes mutuamente excluyentes en la serie de pacientes. El eje Y indica el número de pacientes. Los pacientes mutados se marcan en color rojo.

