



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Diagnóstico integrado de las leucemias
mieloides agudas**

Integrated diagnosis of acute
myeloid leukemias

Autora: César Antonio López López

Directores: Dr. José Javier Gómez Román
Dra. Ana Batlle López

Santander, junio 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis tutores, Javier y Ana por brindarme la oportunidad de hacer este trabajo, especialmente a Ana por sus consejos y enseñanzas esenciales para la realización de este trabajo.

A mis padres y mi hermana, así como mis abuelos, por el apoyo que me han dado durante años y ser gran parte del motivo de haber llegado hasta aquí.

Por último, a todos mis amigos por todo lo que han representado durante estos años, diversión, compañía y respaldo. Especialmente agradecido con Paula y Daniel, por todos los buenos momentos.

ÍNDICE

Lista de siglas	
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Historia.....	4
Técnicas diagnósticas	10
Fenotípicas.....	10
Morfología	10
Citometría de flujo.....	11
Citogenética.....	12
Cariotipo	12
FISH	14
Técnicas genéticas	17
Microarrays.....	17
Reacción en cadena de la polimerasa	18
Secuenciación de primera generación. Método de Sanger	24
NGS – Secuenciación masiva	24
Secuenciación de tercera generación	28
Optical Genome Mapping	28
Evolución clonal de la AML.....	31
Enfermedad mínima residual	32
Variantes genéticas	34
AML familiar	35
Aplicación de las técnicas para el diagnóstico de AML	38
Caso.	38
Morfología	39
Inmunofenotipado.....	42
Cariotipo y FISH	43
PCR.....	44
NGS	46
Discusión.....	47
Conclusiones.....	49
Referencias	51
Anexo I.....	60

Anexo II 61

Anexo III 62

Anexo IV..... 63

LISTA DE SIGLAS

Allo-HSCT: Trasplante alogénico de médula ósea

AML: Leucemia mieloide aguda

APL: Leucemia aguda promielocítica

BM: Médula ósea

CGH: Hibridación del genoma competitiva

CNVs: Variaciones en el número de copias

cdPCR: Reacción en cadena de la polimerasa digital en chip

ddNTPs: Dideoxiloligonucleótidos

ddPCR: Reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dPCR: Reacción en cadena de la polimerasa digital

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

ELN: *European LeukemiaNet*

FAB: grupo de cooperación internacional Franco-Americo-Británico

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente

OGM: Mapeo óptico del genoma

MDS: Síndrome mielodisplásico

MRD: Enfermedad mínima residual

NGS: Secuenciación de siguiente generación

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNA: Ácido ribonucleico

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido

VUS: Variantes de significado incierto

WHO: Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

Introducción e historia: La leucemia mieloide aguda y las neoplasias de precursores relacionadas (AML) es un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación maligna de algunos precursores mieloides. Su incidencia y mortalidad varían con diversos factores, siendo uno de los más importantes la edad. Otros factores de gran importancia en el pronóstico de la enfermedad son las alteraciones citogenéticas y moleculares que encontremos, ya que nos informan de alteraciones genéticas que se traducen en una determinada capacidad oncogénica y para las que pueden existir tratamientos dirigidos como puede ser *PML::RARA* o FLT3.

A lo largo de la historia, se ha tratado de clasificar las distintas variantes de la enfermedad para aumentar la homogeneidad de las características de los distintos subtipos, como pueden ser la mortalidad, respuesta a fármacos y su pronóstico. La primera clasificación que consiguió parcialmente esto, fue realizada por el grupo de cooperación internacional Franco-Américo-Británico (FAB), basándose principalmente en la morfología aunque más tarde incorporo datos de citogenética. Sin embargo, los grupos seguían teniendo respuestas heterogéneas, y con el aumento de conocimiento de las alteraciones moleculares subyacentes a la enfermedad surgió la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Esta integraba datos fenotípicos, citogenéticos y moleculares en la clasificación, dando especial relevancia a la integración de la información aportada por las distintas metodologías y estableciendo subtipos de AML identificados por el tipo de alteración genética, debido a que estas juegan un papel fundamental en la fisiopatología de la enfermedad.

Objetivos: Tratar acerca de la importancia de la aplicación de varias técnicas para una correcta caracterización de la AML.

Discusión: Cada técnica diagnóstica presenta unas ventajas e inconvenientes, la morfología permite una primera orientación diagnóstica de la enfermedad, que se completa con el inmunofenotipado. Las técnicas citogenómicas permiten la detección de anomalías esenciales para una correcta caracterización de la enfermedad. La NGS es una técnica que por la complejidad de procesamiento e interpretación es ideal para búsqueda de anomalías en los genes recurrentemente afectados. Como inconvenientes produce mucha información, que contribuye a ir desvelando la complejidad genética subyacente a la AML. El seguimiento de la EMR mediante citometría, qPCR y en un futuro, técnicas de gran sensibilidad como la dPCR, es esencial para la detección precoz de recaídas y la resistencia a tratamiento.

Conclusiones: En el diagnóstico de la AML, actualmente es necesaria la aplicación de las distintas técnicas de las que disponemos para una correcta caracterización diagnóstica y orientación pronóstica y terapéutica. Cada una de ellas proporciona diferentes datos y parámetros que permiten diagnosticar la enfermedad de manera correcta y costo eficiente. La correlación con la clínica es esencial para integrar el diagnóstico.

Palabras clave: Leucemia mieloide aguda, citogenética, FISH, PCR, Secuenciación de Nueva Generación

ABSTRACT

Introduction and history: Acute myeloid leukaemia and related precursor neoplasms (AML) is a heterogeneous group of diseases characterized by the malignant proliferation of some myeloid precursors. Its incidence and mortality vary with diverse factors, one of the most important being age. Other factors of great importance in the prognosis of the disease are the cytogenetic and molecular alterations that we find since they inform us of genetic alterations that translate into a specific oncogenic capacity and for which there may be targeted treatments such as *PML::RARA* or FLT3.

Throughout history, attempts have been made to classify the different variants of the disease to increase the homogeneity of the characteristics of the different subtypes, such as mortality, drug response, and prognosis. The first classification that somewhat achieved this was carried out by the French-American-British international cooperation group (FAB), based mainly on morphology, although it later incorporated cytogenetic data. However, the groups continued to have heterogeneous responses, and with the increase in knowledge of the molecular alterations underlying the disease, the World Health Organization (WHO) classification emerged. This integrated phenotypic, cytogenetic, and molecular details in the classification, giving greater relevance to the integration of the information provided by the different methodologies and, establishing subtypes of AML identified by the type of genetic alteration since these play a fundamental role in the pathophysiology of the disease.

Objectives: Assessing the value of the different diagnostic techniques in the correct characterization of AML.

Discussion: Each diagnostic technique has its advantages and disadvantages; morphology allows a first diagnostic orientation of the disease, which is completed with immunophenotyping. Cytogenomic techniques allow the detection of essential anomalies for a correct characterization of the disease. NGS is a technique that, due to the complexity of processing and interpretation, is ideal for the search for anomalies in recurrently affected genes. On the downside, it produces a lot of information, which contributes to unveiling the genetic complexity underlying AML. Monitoring of RMS by cytometry, qPCR and in the future, highly sensitive techniques such as dPCR, is essential for the early detection of relapses and resistance to treatment.

Conclusions: In the diagnosis of AML, it is currently necessary to apply the different techniques available for a correct diagnostic characterization and prognostic and therapeutic orientation. Each of them provides different data and parameters that allow a correct and cost-efficient diagnosis of the disease. Correlation with the clinic is essential to integrate the diagnosis.

Keywords: Acute myeloid leukemia (AML), cytogenetics, FISH, PCR, Next Generation Sequencing (NGS)

INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide aguda y las neoplasias de precursores relacionadas (en adelante, AML) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una proliferación maligna y heterogénea de alguno de los precursores mieloides. La clasificación de los diferentes subtipos ha cambiado a lo largo de la historia. Actualmente se basa en una combinación de criterios morfológicos, fenotípicos, genéticos, etc. [1,2].

Tiene una incidencia global de 3.7 casos/100 000, aunque esta varía dependiendo de diversos factores y del subtipo específico, y aumenta con la edad, siendo la mayor parte de los casos en pacientes con ≥ 65 años (en este grupo 13.7 casos/100 000). [2] Es una enfermedad grave y que progresa rápidamente, con una mortalidad anual de entre 3 y 4 casos/100 000 y una supervivencia al año del diagnóstico del 35% y a los cinco años del 15%, aunque depende de varios factores como el subtipo de leucemia y otras características del paciente [3,4].

Cada subtipo de leucemia está asociado a un pronóstico distinto que está basado fundamentalmente en la existencia o no de terapia eficaz, aunque también en las comorbilidades y en la tolerancia a los tratamientos.

Muchos de los pacientes con AML son tratados con terapias agresivas que conllevan una alta morbi-mortalidad, como puede ser la quimioterapia o el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (allo-HSCT). Sin embargo, ciertos subtipos de leucemia son candidatos a terapias dirigidas que disminuyen la morbi-mortalidad y mejoran drásticamente el pronóstico como puede ser la leucemia aguda promielocítica (APL) en las que tratamientos que combinan ATRA y quimioterapia se consiguen tasas de supervivencia global de en torno al 85-95% de los pacientes candidatos al tratamiento. [5]. Conforme avanza el conocimiento acerca de las anomalías moleculares, y de la implicación fisiopatológica, se han ido diseñando y evaluado más recientemente el uso de otras terapias dirigidas como pueden ser los inhibidores de la tirosina quinasa FLT3, presente en distintos tipos de leucemia. Esto potencialmente puede suponer cambios radicales en la evolución clínica de los pacientes con estas mutaciones, lo que significa que el pronóstico no es algo estático, sino que es cambiante y dependiente de la introducción de fármacos dirigidos [6,7]. Las leucemias también pueden ser la evolución de una patología previa o estar en relación con ciertos tratamientos. Estas leucemias, se asocian a un peor pronóstico, con menores tasas de respuesta a los tratamientos disponibles, lo que posiblemente este en relación con una mayor complejidad genómica [8].

Por otro lado, existen tres características de gran importancia en el pronóstico, la edad, el estado funcional basal del paciente directamente relacionados con la tolerabilidad a los tratamientos [9]. A pesar de que no exista una definición clara de “paciente joven” y “paciente mayor”, aquellos pacientes que superen los 55, 60 o 65 años presentan tasas de remisión completa menores y supervivencia libre de enfermedad menores comparadas con las de los pacientes más jóvenes. Además, existen estudios retrospectivos con estratificación de los pacientes en grupos de edad que describen una supervivencia media mayor en los grupos de pacientes más jóvenes y que disminuye con el aumento de edades que comprende el grupo [10,11]. El otro factor pronóstico de gran

importancia es el estado funcional basal del paciente, medido principalmente con escalas de Karnofsky y la *Eastern Cooperative Oncology Group* o ECOG. Estas informan de manera indirecta de las distintas comorbilidades que afectan al paciente, y se pueden combinar con la edad para estimar el porcentaje de pacientes que morirán en los primeros 28 días de tratamiento.[12] Así, los pacientes con menos de 50 años y un ECOG <3 tendrán una mortalidad <5% mientras que los pacientes con más de 69 años y un ECOG ≥3 tendrán una mortalidad del 57% [12,13]. La búsqueda de dianas moleculares con tratamientos menos tóxicos resulta esencial para mejorar estos resultados.

Por último, las nuevas técnicas de estudio genético están permitiendo descubrir alteraciones de naturaleza germinal, esenciales para determinar la predisposición, tener precaución en selección de tratamientos, así como en la búsqueda de donantes [14].

HISTORIA

Las primeras descripciones de la enfermedad fueron en 1845, cuando simultáneamente fueron descritos dos casos que presentaban características anatomopatológicas similares por dos patólogos distintos, principalmente. Fue entonces cuando uno de ellos, Virchow, acuñó el término leucemia, que hacía alusión a las características de la sangre de estos pacientes [15].

El examen microscópico de la AML permitía desde un principio obtener un diagnóstico de presunción al ofrecernos una visión general de la enfermedad mediante el uso de tinciones específicas (principalmente tinción de Romanowsky) sobre una muestra de sangre periférica. La información que nos da el diagnóstico de sospecha permite dirigir los siguientes estudios para concretarlo con técnicas más avanzadas. Además, la microscopía óptica permite conocer el estado de la médula ósea (BM), es decir, el grado de infiltración por blastos y la presencia o no de necrosis o fibrosis, dos sucesos asociados a la AML. De hecho, la existencia de fibrosis puede condicionar un aspirado seco que nos impide obtener muestras de BM, esto hace necesaria la obtención de biopsia de BM para el análisis de improntas del cilindro óseo en portaobjetos [16,17].

La AML se trataba hasta mediados de la segunda mitad del siglo XX de una enfermedad sin criterios concretos y objetivos para su clasificación. Aunque hasta ese momento se habían propuesto múltiples clasificaciones basadas en la relación de la morfología con las características clínicas, los análisis de laboratorio y la respuesta al tratamiento, fueron desechándose por su complejidad, baja reproducibilidad y a su baja aplicabilidad. Con el objetivo de elaborar una clasificación que solventase estos problemas se formó el grupo de cooperación internacional Franco-Américo-Británico (FAB) en 1976. La FAB elaboró una clasificación morfológica de las leucemias basada en la identificación de la línea celular que la forma y de su grado de diferenciación, haciendo una división fundamental entre las leucemias de origen linfóide y mieloide. La AML se subdividía según las características morfológicas celulares que nos indicaban el grado de diferenciación celular, en un principio en seis subtipos (M1-M6), basados parcialmente en la clasificación de Galton de 1975 [5,18,19].

Esta primera clasificación recomendaba el análisis de las células de sangre periférica, aunque su valor no tenía la importancia del estudio de BM, en el que se basaba el

diagnóstico. Para este, era necesario analizar no menos de 500 células, lo que permitía determinar el grado de diferenciación blástica de la BM, esencial a la hora de diferenciar entre anemia refractaria con exceso de blastos (que incluía afecciones como preleucemia, leucemia pauciblastica, leucemia subaguda y leucemia atípica) y la leucemia propiamente dicha según esta clasificación [18].

Este grupo de colaboración consiguió dar lugar a una clasificación capaz de armonizar de cierta forma el diagnóstico y hacerlo algo más objetivo, sin embargo, seguía existiendo una discordancia importante en la identificación de los distintos subtipos (de hasta el 17,5% entre hematólogos japoneses y de la FAB), a excepción de la M3 o leucemia aguda promielocítica (APL), que presentaba características muy distintivas de los otros subtipos. Esto es porque el análisis de la morfología celular aun siendo una técnica rápida y sencilla, presenta claros inconvenientes, solo permite hacer una distinción de seis subtipos de AML (*Tabla 1*) y es muy operador dependiente [20].

Tabla 1. Clasificación original de la FAB (1976) [18].

SUBTIPO AML	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS
M1	Leucemia mieloblástica sin maduración	Las células de la BM muestran alguna evidencia de diferenciación granulocítica
M2	Leucemia mieloblástica con maduración	Existe diferenciación en o más allá del estadio promielocítico. Más del 50% de las células de la BM son mieloblastos y promielocitos
M3	Leucemia promielocítica hipergranular	La gran mayoría de las células son promielocitos, con gran hipergranulación, las células presentan fajos de bastones de Auer y los núcleos son de tamaños diversos, a veces reniformes o bilobados
M4	Leucemia mielomonocítica	Existe en diferentes proporciones células monocíticas y granulocíticas. Similar a M2, solo que la proporción de promonocitos y monocitos supera el 20% de las células nucleadas de la BM.
M5	Leucemia monocítica	Reemplazo total de la BM por células leucémicas, aunque puede existir un componente granulocítico menor, raramente superior al 10%
M6	Eritroleucemia	El componente eritropoyético generalmente excede el 50% de las células nucleadas de la BM. Los eritroblastos presentan en rangos variables alteraciones morfológicas, especialmente múltiples lóbulos nucleares. Pueden estar presentes megacariocitos anormales

La FAB fue muy importante en la historia de la AML ya que fue el primer paso en la sistematización del diagnóstico de la enfermedad. Además, se comprobó que tenía algo de significación biológica, ya que ciertos subtipos de leucemia se asociaban con determinadas anomalías cromosómicas. Sin embargo, la FAB no estaba libre de críticas, la reproducibilidad de la clasificación original no era óptima, existían dificultades en el diagnóstico diferencial entre síndrome mielodisplásico (MDS) y leucemia. Además, establecía límites o requerimientos arbitrarios para el diagnóstico de la leucemia que no representaban el estado clínico del paciente o la progresión de la enfermedad. Por último, esta clasificación solo era aplicable a pacientes no tratados previamente, ya que el tratamiento altera tanto las células malignas como las que no lo son [21].

Tratando de buscar una mayor concordancia en el diagnóstico y un análisis cuantitativo y más objetivo, se incorpora la citometría de flujo en la clasificación de la FAB. El inmunofenotipado presentaba ciertas ventajas, permitiendo: (1) la identificación de células de diferentes linajes y establecer el grado de diferenciación celular; (2) la detección de células anómalas a través de la identificación de la expresión diferencial de antígenos respecto a las células normales; (3) documentar detalladamente el fenotipo (expresión de antígenos) de las células tumorales, así como compararlas con las normales para conocer si existe aumento o descenso de la expresión de antígenos y (4) ofrecer un posible diagnóstico de una entidad reconocida y, sino, de posibles diagnósticos que necesiten de estudios adicionales (inmunohistoquímica, citogenética convencional, etc.). Gracias a esto, podían caracterizarse mejor los distintos subtipos de la enfermedad, incluso distinguir dos nuevos subtipos dentro de la clasificación de la FAB, la leucemia aguda megacarioblástica (M7) y la AML con mínima diferenciación (M0) (*Tabla 2*) [20].

Además, ciertos fenotipos se asociaban con la presencia de anomalías genéticas recurrentes (por ejemplo, la AML con t(8;21)(q22;q22) se asociaba a la expresión aberrante de antígenos como CD19, CD56 o TdT), de ahí que esta técnica tenga impacto en el pronóstico y diagnóstico de la enfermedad, al darnos una visión indirecta de las anomalías subyacentes. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad en la detección de estas anomalías citogenéticas no son especialmente altas.

A pesar de la integración de las técnicas de inmunofenotipado y una aparente mejoría en la subclasificación de los pacientes (con la adición de dos tipos distintos de AML), la evolución de la enfermedad y su respuesta al tratamiento continuaba sin seguir un patrón homogéneo entre los distintos subtipos de AML. Esto sugería la existencia de características subyacentes que alteraban el pronóstico de los pacientes, pero que pasaban desapercibidas por las técnicas utilizadas entonces [21,22].

Con el fin de mejorar la estratificación pronóstica de los pacientes, comienzan a incorporarse técnicas citogenéticas para la detección de anomalías cromosómicas bajo microscopio. En un principio, el cariotipo convencional era una técnica muy básica que sólo permitía demostrar alteraciones groseras de los cromosomas, como el cromosoma filadelfia en la leucemia mieloide crónica. La introducción de la tinción de bandas de los cromosomas, desarrollada por la doctora Rowley en 1980, permitió demostrar la existencia de nuevas alteraciones en las neoplasias hematológicas, aunque el análisis se realizaba sobre cromosomas muy condensados lo que restaba calidad a los resultados.

AML	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	INMUNOFENOTIPO	ANÁLISIS CITOGENÉTICO
M0	AML con mínima diferenciación	Generalmente BM hiper celular (>90% blastos), la mayoría con ausencia de gránulos, nucleolos o bastones de Auer.	CD13, CD14, CD33 o CD34. Deoxinucleotidil transferasa terminal (+/-)	Asociado con alta incidencia de anomalías citogenéticas, frecuentemente complejas que suelen implicar a los cromosomas 5 y 7, trisomía del 8 o reordenamientos de KMT2A
M1	AML sin maduración	BM hiper celular llena de mieloblastos (>90% blastos). Diferenciación mieloide mínima, pueden existir o no algunos gránulos azurófilos y/o bastones de Auer. Nucleolos prominentes, generalmente detectables.	HLA-DR, CD13, CD33 y CD34.	Asociado frecuentemente con monosomía del cromosoma 5 o 7 o trisomía del 8
M2	AML con maduración	BM con diferenciación más allá de los mieloblastos y con evidencia de diferenciación superior al estadio promielocítico en más del 10% de las células no eritroides. Los mieloblastos representan más del 30% de las células de la BM, pero menos del 90% de las células no eritroides. Frecuentes bastones de Auer o nucleolos prominentes.	HLA-DR, CD13, CD33, CD11 y CD15	Puede existir monosomía del 5 o del 7, trisomía del 8, t(8;21), t(6;9) o anomalías del cromosoma 3
M3	APL	Hipergranular, en el que >30% de los blastos son promielocitos y mieloblastos, la mayor parte de los promielocitos presentan gran hipergranulación. Los fajos de bastones de Auer son frecuentes. Microgranular, donde existe una granulación fina en el citoplasma, que no se aprecia con microscopio óptico. Existen anomalías morfológicas nucleares.	CD13, CD33, CD11 y CD15, HLA-DR(-) y CD14(-)	En este subtipo es característica la translocación t(15;17) con la gran mayoría de estas translocaciones formando <i>PML::RARA</i>
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	Presencia de blastos con características de granulocito y monocito. La BM tiene presencia de >30% de blastos, usualmente con afectación extramedular y monocitosis. Los blastos son pleomórficos, pudiendo estar presentes los bastones de Auer. Existe un subtipo de esta leucemia con eosinofilia moderada en la BM (M4Eo).	CD13, CD15, CD33, CD4, CD11c, CD14, CD64 y HLA-DR	La M4 se asocia con translocaciones de KMT2A, particularmente t(9;11), también se asocian a anomalías del cromosoma 3 y t(6;19) En la M4Eo solemos encontrar inv(16) o t(16;16)
M5	Leucemia monocítica aguda	Presencia de células monocíticas en BM que representa >80% de las células no eritroides. Dos subtipos. M5 indiferenciado (M5a): >80% de las células son monoblastos, los pacientes son generalmente más jóvenes, mal pronóstico. y M5 diferenciado (M5b). La M5b <80% de las células son monoblastos, reconocibles como monocitos o promonocitos. En la M5b encontramos monocitosis periférica.	CD13, CD15, CD33, CD4, CD11c, CD14, CD64 y HLA-DR	En la M5 suelen existir translocaciones de KMT2A: En la M5a t(9;11) o t(11;17) En la M5b t(10;11)
M6	Leucemia eritrocítica aguda	Es una forma poco común de AML. Existe más de un 50% de infiltración de eritroblastos en la BM.	CD7, CD13, CD56, CD33, CD34 y CD65	Puede existir monosomía del 5 o del 7 o trisomía del 8.
M7	Leucemia megacarioblástica aguda	Infiltración de la BM por megacarioblastos pleomórficos, que a veces se presentan con gemación del citoplasma. Suele asociarse a fibrosis de la BM.	Antígenos megacariocíticos, glicoproteína Ib, glicoproteína IIb/IIIa o factor VIII	En los niños sin síndrome de Down suele existir t(1;22). Los pacientes con síndrome de Down tienen mayor incidencia y mejor pronóstico.

Tabla 2. Revisión de la FAB implementa inmunofenotipo y citogenética para la clasificación (cariotipo y FISH) [23]

En 1977 Rowley describe con esta técnica la translocación t(15;17)(q22;q21) que era característica de la APL [24], además, con el análisis *in vitro* de cultivos celulares portadores de esta translocación se demostró la posibilidad de inducir la diferenciación celular al añadir ácido retinoico, contradiciendo el dogma establecido sobre la irreversibilidad de las células leucémicas.

Actualmente, el estudio de los cromosomas se realiza en prometafase, donde tienen un mayor tamaño y se distinguen un mayor número de bandas [25–27].

Gracias a la citogenética podemos clasificar el pronóstico de los pacientes en tres grupos: favorable, desfavorable e intermedio. Dentro de este último de incluyen aquellos pacientes con cariotipos normales, que representa hasta un 50% de los casos de AML. Cabe destacar, que estos pacientes con cariotipo normal presentan evoluciones clínicas y desenlaces muy variables respecto a los pacientes clasificados en los grupos de riesgo favorable o desfavorable. Este hecho, sugería la presencia de anomalías genéticas subyacentes con relevancia clínica que estas técnicas no son capaces de valorar. Sin embargo, todavía esta clasificación carecía de la capacidad de discriminar subtipos de pacientes que se beneficiarían de tratamientos específicos, habiendo gran heterogeneidad de respuesta dentro de un mismo grupo [28].

En el año 2001 se publica la clasificación de las neoplasias hematopoyéticas y linfoides de la Organización Mundial de la Salud (WHO) (*Tabla 3 y Anexo I*). Entre muchos cambios con poca importancia como la reducción del número de blastos necesarios para el diagnóstico, esta clasificación da lugar a un punto de inflexión en la historia de la AML, ya que cambia de unos criterios fundamentados en el fenotipo celular para la caracterización de los subtipos de leucemia a unos basados en las alteraciones genéticas de las células tumorales, pero manteniendo la relevancia de los aspectos fenotípicos, por lo que la integración de todas las técnicas era una necesidad. Gracias a esto, se consiguió una mejor estratificación de los pacientes, formándose grupos con mayor homogeneidad en el pronóstico, respuesta al tratamiento y evolución clínica [17].

Además, la introducción de técnicas que permiten el estudio genómico como los arrays o la secuenciación de nueva generación (*Next-Generation Sequencing*, NGS) permitió el estudio en profundidad de estas neoplasias, encontrándose nuevas mutaciones genéticas más o menos comúnmente presentes en la AML que tenían importancia pronóstica y que podían tener gran importancia en su fisiopatología, llegando a ser una característica que nos permitía diferenciar subtipos independientes. Esto era de gran interés desde el punto de vista de la investigación, porque si estas mutaciones genéticas son la etiología de la enfermedad, el desarrollo de fármacos dirigidos contra ellas podría significar cambios sustanciales en el pronóstico de los pacientes, como ocurrió en previamente con la APL.

A pesar de conocer un mayor número de mutaciones que aparecen en el AML, no es posible actualmente clasificar todos los subtipos de AML, existiendo un número elevado, pero progresivamente decreciente, de leucemias que no pueden clasificarse según anomalías genéticas que explique su fisiopatología o que teniéndolos no se definen por un único evento, reconociéndose en la clasificación de la WHO, además de aquellos tipos

Tabla 3. Comparación de las clasificaciones de la WHO (2001, 2008 y 2016) [29–31]

Clasificación AML de la WHO (2001)	AML y neoplasias relacionadas (2008)	AML y neoplasias de precursores relacionadas (2016)
AML con alteraciones genéticas recurrentes	AML con alteraciones genéticas recurrentes	AML con alteraciones genéticas recurrentes
AML con t(8;21)(q22;q22), (<i>AML1::ETO</i>)	AML con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	AML con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
AML con eosinófilos anómalos en BM e inv(16)(p13;q22) o t(16;16)p13;q22), (<i>CBFβ::MYH11</i>)	AML con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ::MYH11</i>	AML con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ::MYH11</i>
APL con t(15;17)(q22;q12), (<i>PML::RARA</i>) y sus variantes	AML con t(15;17)(q22;q12); <i>PML::RARA</i>	AML con <i>PML::RARA</i>
AML con anomalías del 11q23 (<i>KMT2A</i> , antes <i>MLL</i>)	AML con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3::KMT2A</i>	AML con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3::KMT2A</i>
AML con displasia multilineal	AML con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK::NUP214</i>	AML con t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK::NUP214</i>
Después de un MDS o MDS/enfermedad mieloproliferativa (MPD)	AML con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1::EVI1</i>	AML con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
Sin antecedentes de MDS o MDS/MPD, pero con displasia en al menos un 50% de las células o en 2 o más linajes mieloides	AML (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>	AML (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15::MKL1</i>
AML y MDS relacionados con la terapia	<i>Entidad provisional: AML con NPM1 mutado</i>	<i>Entidad provisional: AML con BCR::ABL1</i>
Tipo relacionado con agentes alquilantes o radiación	<i>Entidad provisional: AML con CEBPA mutado</i>	AML con <i>NPM1</i> mutado
Tipo relacionado con inhibidores de la topoisomerasa II (algunos pueden ser linfoides)	AML con cambios relacionados con mielodisplasia	AML con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i>
Otros	Neoplasias mieloides relacionadas con terapia	<i>Entidad provisional: AML con RUNX1 mutado</i>
AML no especificada de otra manera	AML no especificada de otra manera	AML con cambios relacionados con mielodisplasia
AML mínimamente diferenciada	AML con maduración mínima	Neoplasias mieloides relacionadas con terapia
AML sin maduración	AML sin maduración	AML no especificada de otra manera
AML con maduración	AML con maduración	AML con maduración mínima
Leucemia mielomonocítica aguda	Leucemia mielomonocítica aguda	AML sin maduración
Leucemia monoblástica/monocítica aguda	Leucemia monocítica/monoblástica aguda	AML con maduración
Leucemia eritroide aguda (eritroide/mieloide o eritroleucemia pura)	Leucemia eritroide aguda	Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia megacarioblástica aguda	-Leucemia eritroide pura	-Leucemia monocítica/monoblástica aguda
Leucemia basofílica aguda	-Eritroleucemia, eritroide/mieloide	-Leucemia megacarioblástica aguda
Sarcoma mieloide	Leucemia megacarioblástica aguda	Leucemia basófila aguda
	Leucemia basofílica aguda	Panmielosis aguda con fibrosis
	Panmielosis aguda con mielofibrosis	Sarcoma mieloide
	Sarcoma mieloide	Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down
	Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down	Mielopoiesis anormal transitoria
	Mielopoiesis anormal transitoria	Leucemia mieloide asociada al síndrome de Down
	Leucemia mieloide asociada al síndrome de Down	
	Neoplasia de células dendríticas blásticas plasmocitoides	

definidos por anomalías específicas tales como las AML con anomalías citogenéticas recurrentes, tres grupos distintos definidos circunstancias clínicas o morfológicas: AML relacionada con tratamiento médico, AML con displasia de múltiples linajes y AML no clasificable [17].

Hasta ahora, se han publicado dos revisiones (*Anexo II y III*) de la clasificación de la WHO que conforme se va profundizando en el conocimiento fisiopatológico de la leucemia, se han incluido nuevos subtipos independientes además de modificaciones de gran importancia, como es el reconocimiento de la AML con anomalías germinales en 2016. Gracias a las técnicas genómicas, se sabe que no todas las mutaciones que aparecen en la AML son de *novo*, sino que forman parte de la línea germinal y, por lo tanto, han sido heredadas. Esto supone cambios importantes en el manejo de estos pacientes y de sus familiares [17,31].

La genómica ha contribuido enormemente a ampliar el conocimiento de la enfermedad, identificando nuevos subgrupos con una fisiopatología y una respuesta al tratamiento característica, además de aportar información sobre posibles dianas para el diseño de moléculas dirigidas. A pesar de disponer cada vez de técnicas más sofisticadas como la NGS, todavía ninguna de ellas ha sustituido a las técnicas morfológicas y fenotípicas, esenciales para una orientación previa, ya que las mismas anomalías genéticas pueden tener un impacto pronóstico diferente en los distintos subtipos fenotípicos, aludiendo a una implicación fisiopatológica diferente, dependiendo del momento de diferenciación y del microambiente de la célula tumoral. Por otro lado, estas técnicas de mayor complejidad tampoco sustituyen a las técnicas citogenéticas previas, que continúan teniendo un papel importante en el diagnóstico de la AML. Cada técnica diagnóstica tiene unas ventajas e inconvenientes y nos aporta un punto de vista distinto de la enfermedad, esto es algo que no se debemos ignorar ya que un diagnóstico preciso es un prerrequisito para la aplicación del correcto tratamiento de nuestros pacientes [31,32].

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

FENOTÍPICAS

Morfología

El análisis microscópico de las células tumorales es una de las técnicas más básicas empleadas en el diagnóstico de la AML, siendo parte de la rutina diagnóstica de los pacientes con sospecha de AML. Se recomienda el análisis de 500 células nucleadas en las muestras de BM [8].

Se realiza con un microscopio óptico y con la aplicación sobre el tejido de tinciones que tienen afinidades distintas por los diferentes componentes celulares, las más utilizadas son la May-Grünwald-Giemsa y la Wright-Giemsa. Además, se utilizan técnicas citoquímicas para la mejor caracterización de los tejidos, como pueden ser tinción de mieloperoxidasa, tinción de PAS, tinción de hierro, Sudán negro B, naftol-ASD-cloroacetato esterasa o el α -naftil acetato y butirato esterasa. Estas nos permiten detectar la existencia de ciertos componentes celulares (enzimas, fosfolípidos,

glucógeno, etc.), que se encuentran presentes en mayor o menor medida en distintos subtipos celulares, lo que permite una mejor caracterización de los tejidos o muestras [1,8].

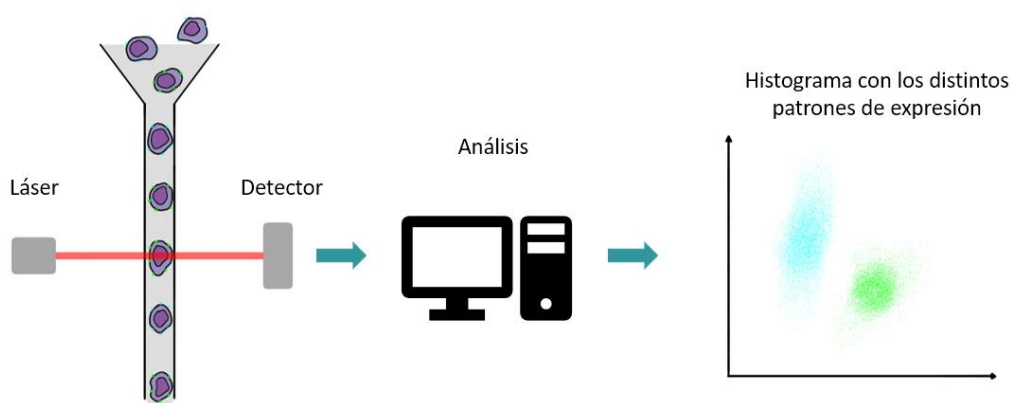
El estudio morfológico presenta algunas ventajas como la (1) rapidez de obtención de resultados, (2) capacidad de identificar ciertos subtipos usando combinaciones de técnicas citoquímicas y (3) ser una técnica sencilla (necesitando básicamente, microscopio óptico y tinciones específicas). Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes, (1) es una técnica subjetiva operador-dependiente, (2) no es precisa a la hora de establecer el grado de diferenciación y (3) no permite clasificar la AML en subtipos homogéneos en pronóstico ni evolución clínica [8]. Por todo ello, no permite definir la estrategia terapéutica, aunque sí permite orientar los estudios secuenciales posteriores.

Citometría de flujo

Es técnica que permite, a través de la detección de los diferentes antígenos expresados en las membranas y citoplasmas celulares, identificar las distintas poblaciones y subpoblaciones celulares que se encuentran en la muestra, gracias a que los patrones de expresión antigénica varían tanto con el linaje celular, como con el grado de diferenciación de las células, clasificándose en clústeres de diferenciación [33].

Los componentes básicos de esta técnica son: una fuente de iluminación, un banco óptico, un sistema de líquido, un sistema electrónico y un ordenador. Básicamente, las células discurren teñidas en una sola fila por el sistema líquido, y atraviesan una o más fuentes de luz que emiten ciertas señales luminosas que son detectadas por el sistema óptico y se convierte en señales electrónicas para su análisis. Toda la información generada por este sistema se traduce en histogramas que representan la intensidad de luz recogida respecto al número de células analizadas [34].

Imagen 1. Esquema del funcionamiento de la citometría de flujo.



Esta técnica que presenta diversas ventajas, (1) rapidez de obtención de resultados, (2) gran sensibilidad, (3) permite la cuantificación de la expresión de antígenos citoplasmáticos y de membrana célula a célula, permitiendo la diferenciación de las poblaciones celulares que comparten un mismos marcadores, favoreciendo la clasificación de las poblaciones celulares según los patrones de expresión. La existencia de citómetros que permiten el análisis simultáneo de varios marcadores permite la

mejor caracterización de las poblaciones, (4) permite la detección de inmunofenotipos aberrantes, muchas veces característicos de subtipos concretos, proporcionando la posibilidad de monitorizar la enfermedad mínima residual (MRD) y con frecuencia constituyendo marcadores pronósticos y (5) permite el diagnóstico de ciertos subtipos de AML [35].

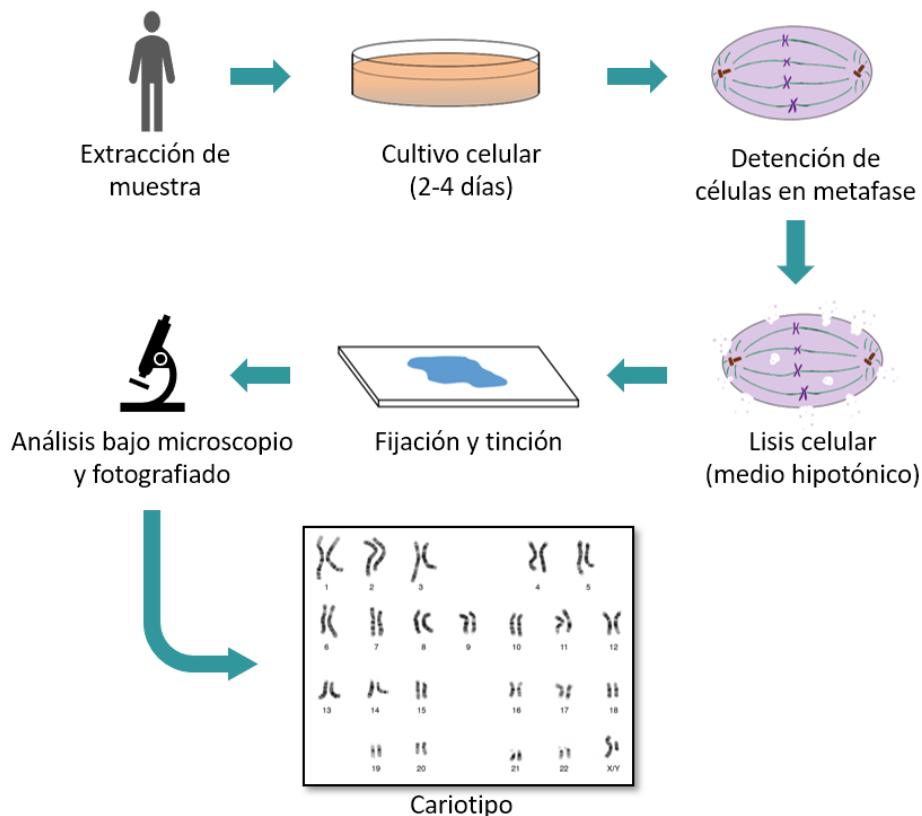
Sin embargo, esta técnica (1) no siempre es capaz de estimar de forma fidedigna el porcentaje de blastos, por no poder diferenciar correctamente la población patológica de la normal en aquellos casos en los que los marcadores no difieren significativamente, (2) la interpretación de los resultados es subjetiva, y puede variar entre los distintos centros por las características del citómetro disponible, ya que existen citómetros con mayor o menor número de fluorocromos para la detección con un mínimo de ocho, aunque existen citómetros que permiten el análisis simultáneo de más de 20 fluorocromos y (3) aunque ciertos patrones o inmunofenotipos aberrantes puedan sugerir una alteración citogenética, sigue siendo esencial la confirmación citogenética o molecular [35,36].

CITOGÉNÉTICA

Cariotipo

El cariotipo es una técnica que permite la observación bajo un microscopio de campo claro de los cromosomas en ciertas etapas de la mitosis, de forma que podemos conocer si existen alteraciones en el número y anomalías estructurales cromosómicas [37].

Imagen 2. Esquema de obtención del cariotipo. Foto de cariotipo obtenida de [38].



Para llevar a cabo el cariotipo, se necesita una muestra de tejido tumoral fresco con células vivas que puedan ser incluidas en un cultivo, en los que se utilizan medios de crecimiento específicos que favorezcan la división del tipo celular que interesa visualizar. Después se aplican fármacos como colcemid capaces de detener la división celular en ciertas fases específicas, como la metafase o prometafase. Tras esto, se administran soluciones hipotónicas que rompen las membranas celulares y se fijan los cromosomas con ácido acético. Posteriormente se aplican sustancias desnaturalizantes de proteínas como la tripsina, y tinciones específicas que permiten catalogar los cromosomas. Una de las tinciones más utilizadas es la tinción de bandas G, que diferencia patrones de regiones de cromatina más compensadas de aquellas que menos lo están, siendo el patrón resultante característico de cada especie y permitiendo la detección de anomalías mayores de 5 Mbp. Tras todo este procedimiento, los cromosomas son analizados bajo microscopio de campo claro, recomendándose el análisis de por lo menos 20 metafases [35,39].

El cariotipo es una técnica básica del estudio de cualquier neoplasia hematológica porque contribuye tanto en la orientación diagnóstica como en la estratificación pronóstica. Entre sus ventajas (*Tabla 5*) encontramos:

- (1) Visión de genoma completo, permitiendo identificar nuevas anomalías previamente no descritas, de hecho, muchas de las anomalías recurrentes que hoy conocemos han sido descritas gracias a esta técnica [35].
- (2) Técnica no dirigida, proporcionando una visión global del genoma [35].
- (3) Permite el diagnóstico de algunos subtipos de AML como la APL. El cariotipo permite diagnosticar con un alto grado de especificidad la APL al detectarse la translocación $t(15;17)(q22;q12)$, que sugiere que existe un reordenamiento de *PML::RARA*. Sin embargo, el cariotipo convencional no es capaz de detectar hasta un 2% de las APL que tienen alteraciones cripticas del gen *RARA* [35,40].
- (4) Permite clasificar el pronóstico de los pacientes con AML, así como encontrar anomalías adicionales que pueden implicar un peor pronóstico, como el cariotipo complejo y el cariotipo monosómico por su impacto en el pronóstico de la enfermedad. Un cariotipo complejo se define como aquel que presenta al menos tres aberraciones cromosómicas, independientemente del tipo de alteración y cromosoma que afectan [35,41].

En general, el cariotipo complejo está asociado a un pronóstico nefasto, con tasas de resistencia a múltiples drogas de hasta el 57%. En los pacientes mayores de 60 años con cariotipo complejo (grupo que representa el mayor proporción de pacientes con cariotipo complejo) sólo un 10-44% alcanza la remisión completa. Esta proporción es ligeramente mayor en los pacientes más jóvenes. El cariotipo complejo también se asocia a AML relacionada a tratamiento y la los MDS, ya que en este grupo el cariotipo complejo se detecta en un 92% de los pacientes [41]. El cariotipo complejo está presente en un 10-12% de los pacientes con AML, y su incidencia aumenta con la edad. Aproximadamente, un 80% de todos los cariotipos complejos presentan delección del 5q, y hasta un 50%,

deleciones en 17p y 7q. A diferencia de lo que ocurre en el MDS, la deleción de 5q en la AML representa un grupo de alto riesgo, y sugiere que se trata de una AML secundaria a un MDS, que con frecuencia ha adquirido anomalías adicionales [41,42].

Por otro lado, el cariotipo monosómico se define como la perdida completa de por lo menos dos cromosomas enteros o una monosomía asociada a otra anomalía. Como los cariotipos complejos, se asocian con pronósticos pobres, sobre todo en las AML con monosomía de los cromosomas 7 o 5. A pesar de pueden superponerse cariotipos complejos con los monosómicos, la presencia de estos últimos parece que altera el pronóstico más allá del establecido por el cariotipo complejo y se asocian con frecuencia a alteraciones en TP53 [43].

- (5) Permite diferenciar y clasificar subclones de una forma visual, característica de gran importancia ya que la AML generalmente se compone de distintas subpoblaciones clonales que evolucionan a lo largo de la enfermedad [35].
- (6) Contribuye a interpretar anomalías objetivadas con otras técnicas [35].
- (7) Permite detectar aneuploidías, deleciones, duplicaciones e inversiones de >5 Mbp [35].

Sin embargo, presenta inconvenientes (*Tabla 5*) como:

- (1) Baja resolución que no permite detectar anomalías cripticas en los cromosomas (aquellas menores a 5 Mbp) [35].
- (2) Baja sensibilidad, debido a que se estudian sólo 20 células lo que hace que generalmente no sea una técnica útil en el seguimiento de la MRD [35].
- (3) Es una técnica muy operador-dependiente, por lo que se necesita de personal especializado [35].
- (4) Necesita de tejido fresco en división [35].
- (5) Resolución 400-560 bandas [35].
- (6) Viabilidad dependiente de calidad de la muestra [35].

FISH

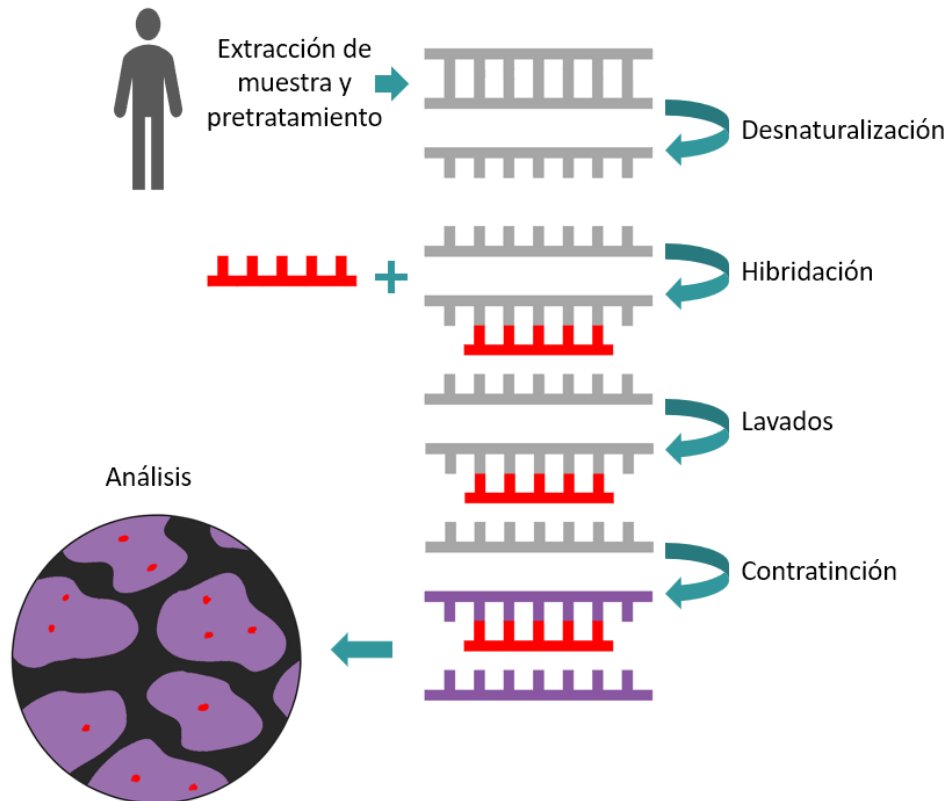
La hibridación fluorescente in-situ (Fluorescent in-situ Hybridation – FISH), es una técnica que mediante un marcaje fluorescente de una sonda complementaria puede detectar diferentes tipos de anomalías mediante un microscopio de fluorescencia.

- El número de copias de dicha región que existen en una célula usando sondas específicas de locus. mediante un microscopio de fluorescencia.
- Diferenciar si las regiones se encuentran en un locus específico o si se han reorganizado [37]. Las sondas *break apart* son un tipo de sonda que se unen a

las regiones próximas a las zonas de ruptura de la traslocación, sin necesidad de conocer el gen *partner* del reordenamiento. Esto es especialmente interesante en aquellos genes que se asocian a múltiples *partner* como el gen KMT2A, o en aquellos casos en los que existen múltiples puntos de ruptura [41,44].

- Reorganizaciones entre dos locus concretos entre sí: sondas *dual color dual fusion*. Es la sonda más sensible en muestras en suspensión dado que el patrón anómalo es difícilmente generado artefactualmente.

Imagen 3. Esquema del funcionamiento de la FISH. Imagen adaptada de [35].



En todos los casos dependiendo del tipo de sonda y patrón, el significado de los colores puede cambiar [37]. En ocasiones pueden detectarse patrones aberrantes que sugieran anomalías diferentes a las buscadas. Por ejemplo, varias señales de una sonda en clúster pueden indicar amplificación del locus.

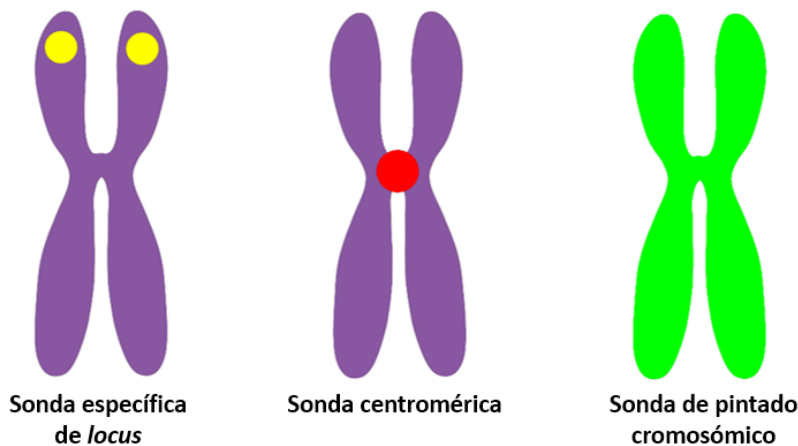
En la AML, la FISH se puede aplicar sobre células obtenidas de todo tipo de tejidos, incluyendo BM, sangre periférica, cualquier líquido biológico, biopsias en casos de cloromas, improntas de cilindro óseo, de gran utilidad en médulas empaquetadas, células de tejidos parafinados o congelados, pudiendo hacerse en interfase o metafase [35].

La FISH es capaz de identificar anomalías genéticas en un 55-65% de los casos de AML si se aplica un panel de sondas adecuado. Sin embargo, dependiendo del tipo de muestra que utilicemos obtendremos distinta sensibilidad y especificidad a la hora de detectar alteraciones. Podemos utilizar tanto muestras con células “íntegras” (células en suspensión o extensiones celulares) o muestras de cortes tisulares. Estas últimas plantean ciertos problemas ya que puede existir superposición celular que provoque

falsos positivos o que el corte produzca falsos negativos al dejar las secuencias de interés fuera de la muestra [44].

Imagen 4. Distintos tipos de sondas de la FISH. Imagen adaptada de [35].

Tipos de sonda FISH utilizadas en hematología



La primera aplicación de esta técnica en la AML fue la detección de translocaciones cromosómicas responsables de la formación del gen de fusión *BCR::ABL1*, utilizando la técnica de dos colores en células en interfase y metafase. En este caso, se determina que existe reordenamiento cuando las dos sondas (roja y verde) se juntan y dan color amarillo [41].

Entre las ventajas de esta técnica (*Tabla 5*) podemos encontrar:

- (1) Posibilidad de aplicar tanto sobre metafases como sobre núcleos en interfase. Su aplicación en células en interfase permite: hacer un cribado de un gran número de células (respecto al cariotipo); la detección de anomalías relacionadas con subtipos específicos en un tiempo corto (aproximadamente 4 horas) y la combinación con el inmunofenotipado para determinar concretamente que línea celular tiene una alteración cromosómica específica. La aplicación en metafase ayuda a la interpretación de anomalías objetivadas en el cariotipo de origen no esclarecido [35,41].
- (2) Posibilidad de aplicar muestras de todo tipo, sin necesidad de disponer de un número elevado de células, lo que permite realizar la FISH en muestras de escasa celularidad como el líquido cefalorraquídeo [35].
- (3) Permite la realización de estudios retrospectivos sobre tejido fijado, congelado, parafinado y reutilizar muestras ya analizadas [41].
- (4) Permite el análisis relativamente rápido de un mayor número de células respecto al cariotipo, pasando del estudio de 20 cariotipos al análisis de por lo menos 200-500 núcleos [35].

- (5) Mayor sensibilidad que citogenética (hasta 10^{-3}), aunque no se trata de una técnica útil para la monitorización de la MRD [35,41], salvo que no exista ningún otro marcador medible por técnicas más sensibles.
- (6) Una de sus ventajas más importantes es la utilidad de la FISH en el estudio de genes que presentan translocaciones con múltiples *partners*, como es el caso de KMT2A. Actualmente sabemos que KMT2A puede recombinarse con más de 100 genes *partner*, en este tipo de casos, la FISH nos permite comprobar si existen o no reordenamientos del gen de una forma rápida, sencilla y con alta sensibilidad (hasta 90%). Sin embargo, para conocer cuál es el *partner* con el que se ha reordenado necesitaremos aplicar otras técnicas como pueden ser, sondas complementarias *dual color dual fusion*, la PCR o la NGS [45].
- (7) Mayor resolución: 100 Kbp-1 Mbp [35].
- (8) Permite detectar aneuploidías, deleciones, duplicaciones y traslocaciones [35].
- (9) Menor tiempo de respuesta respecto a cariotipo [35].

Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes (*Tabla 5*):

- (1) Coste moderado. Necesita sondas específicas por cada aberración a estudio [35].
- (2) Análisis dirigido que solo aporta la información limitada a la región cromosómica de la sonda utilizada, no permitiendo el estudio global del genoma [35].
- (3) Baja sensibilidad. La FISH carece de la especificidad necesaria para la detección de la enfermedad mínima residual, ya que las células pueden disponerse de tal forma que sus señales normales con diferentes colores aparezcan como falsos positivos, con una frecuencia del 1 al 10%, dependiente del patrón anómalo, más sensible, así con sondas tricolor la sensibilidad aumenta y siempre es preferible muestra en suspensión, para evitar superposición celular, con lo cual en la AML es bastante fácilmente obtenible [35].

TÉCNICAS GENÉTICAS

Microarrays

Los microarrays o chips genéticos son una técnica que consiste en un soporte sólido en el que se depositan y fijan secuencias de oligonucleótidos conocidas como sondas. Gracias al principio de complementariedad son capaces de unirse a fragmentos de material genético (bien sea DNA, RNA o microRNA) de forma que podemos detectarlos. También existen microarrays de proteínas y tisulares. La muestra a estudio generalmente se marca con un componente fluorescente y se hibrida con el chip, si existen en la muestra secuencias complementarias a las sondas del chip, se hibridarán y se obtendrá la señal fluorescente. El análisis de la fluorescencia se realiza mediante programas informáticos que procesan los datos. Existen hibridaciones de carácter competitivo cuando se utilizan dos muestras en un mismo chip y no competitivo cuando se usa una sola muestra en cada chip [35,46].

Existen tres tipos de arrays, microarrays genómicos, microarrays de expresión y microarrays de micro RNA. Dentro de los microarrays genómicos encontramos los arrays de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) y los arrays de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs [35].

Entre sus ventajas encontramos:

- (1) Alta resolución (CGH: 180-200 Kb/SNPs: 5 Kb) [35].
- (2) No requieren de células en división [35].
- (3) Técnicas de gran utilidad a la hora de evaluar la ganancia o pérdida de material genético (resolución de 50 kb) [35].
- (4) Permiten obtener perfiles de expresión génica. Estos aportan información sobre la biología de la enfermedad, ya que nos permiten conocer si un gen o varios están silenciados o sobreactivados. Esto potencialmente puede dar lugar a nuevas clasificaciones, información pronóstica y con posibles nuevas dianas terapéuticas. Sin embargo, recientemente se han podido obtener perfiles de expresión génica a través de NGS, con la utilización masiva de secuencias de cDNA obtenidas a partir de muestras de RNA [47].
- (5) Los SNPs arrays permiten además proporcionar información de la pérdida de heterocigosidad y de las disomías uniparentales [35].
- (6) Coste intermedio [35].
- (7) Visión global del genoma con gran resolución [35].
- (8) No necesita metafases [35].

Sin embargo, presentan ciertos inconvenientes como:

- (1) No son capaces de identificar reordenamientos ni inversiones [35].
- (2) Necesidad de gran cantidad de tejido para el estudio [35].
- (3) Baja sensibilidad (2-30%) [35].
- (4) Metodología compleja [35].
- (5) En los perfiles de expresión no existen patrones definidos consensuados para la clasificación [35].
- (6) No disponible en la mayoría de los centros [35].

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) es una técnica desarrollada a finales del siglo XX que permite la réplica y síntesis de material genético

delimitado de forma exponencial y prácticamente ilimitada. Se considera un gran hito de la biotecnología que marcó el principio del diagnóstico molecular. Actualmente, a partir de la PCR básica se han desarrollado subtipos más complejos que permiten el estudio de expresión de una determinada variante a partir de la conversión de RNA a cDNA (*reverse transcriptase PCR*, RT-PCR), la amplificación de varias secuencias en un mismo análisis (PCR multiplex), la amplificación y cuantificación simultánea (*quantitative PCR*, qPCR), entre otras, algunas de las cuales se desarrollan más adelante [48].

Los componentes básicos de esta técnica son: una hebra molde, unos oligonucleótidos o *primers* específicos de la secuencia que queramos amplificar, una polimerasa termoestable, nucleósidos trifosfato (dNTPs), cloruro de magnesio y una solución tampón o “buffer”. Además, es necesario un aparato conocido como termociclador, que realiza de forma cíclica cambios en la temperatura de la reacción. Una vez que añadimos todos estos componentes al termociclador, se realiza la técnica, que consta generalmente de las siguientes etapas [35,48]

1. Desnaturalización: separación de la doble hebra de DNA mediante calentamiento (94-96 °C) [35].
2. Hibridación, alineamiento de los oligonucleótidos: se baja la temperatura hasta 45-68 °C, momento en el que se unen los oligonucleótidos a su secuencia complementaria [35].
3. Extensión: síntesis de DNA gracias a un nuevo aumento de temperatura hasta 68-72 °C [35].

La repetición de este proceso durante varios ciclos da lugar a una producción exponencial de nuestra secuencia de interés. Según como sea la detección y la técnica podemos distinguir dos tipos de PCR, PCR a tiempo final (o semicuantitativa) y PCR en tiempo real (cuantitativa) [35].

PCR semicuantitativa o a tiempo final

La PCR a tiempo final nos permite identificar diferencias en la cantidad de DNA molde de dos muestras distintas de forma cualitativa. Para llevar a cabo un análisis correcto es importante señalar que podemos dividir la reacción de PCR en tres fases: una fase lineal, una fase exponencial y la fase meseta. La importancia radica en que solo existen diferencias detectables entre las muestras en la fase exponencial [48].

La PCR semicuantitativa por sí misma no aporta información y necesita la aplicación de otras técnicas para la obtención de resultados, generalmente electroforesis (en gel de agarosa/poliacrilamida o electroforesis capilar) [48].

Entre sus ventajas encontramos (*Tabla 5*):

- (1) Elevada sensibilidad (hasta 10^{-5}) y reproducibilidad, que permite la detección de pequeños reordenamientos crípticos que pasan desapercibidos por las técnicas citogenéticas y la monitorización de la MRD [35].

- (2) Permite visualizar los tamaños de los fragmentos amplificados y confirmar la existencia de las alteraciones citogenéticas detectadas con FISH [35].
- (3) Bajo coste [35].
- (4) Detección de genes de fusión asociados a la AML como son *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *MLLT3::MLL* o *DEK::NUP214* con RT-PCR. Esto nos permite concretar el transcrito concreto, por ejemplo, conocer cuál es el gen *partner* de una traslocación de KMT2A tiene implicaciones importantes en el pronóstico [8].
- (5) Rápida obtención de resultados, factor que puede ser decisivo a la hora de decidir realizar esta técnica o la NGS, ya que para que la NGS sea costo-eficiente se necesitan acumular muestras y en general requiere de un procesamiento previo que implica mayor tiempo de respuesta. Además, esto es de gran utilidad a la hora de monitorizar rápidamente la respuesta al tratamiento de ciertos subtipos de leucemia como la APL [35,49].

Entre sus desventajas (*Tabla 5*) encontramos:

- (1) Mide la acumulación de DNA al final de la reacción [35].
- (2) Riesgo de contaminación [35], pudiendo dar falsos positivos. Esto se minimiza con separación de áreas de extracción, carga y amplificación.
- (3) Se necesita de electroforesis para detectar los productos [35].
- (4) No apta para el seguimiento de la MRD ya que no nos permite cuantificar los transcritos y por lo tanto no podemos cuantificar la MRD [35].

PCR cuantitativa o en tiempo real

La PCR cuantitativa o en tiempo real (*quantitative PCR*, qPCR) es una técnica que permite identificar el incremento de señal por ciclo de PCR en tiempo real. Se basa en la detección de la señal fluorescente producida por la muestra durante esta etapa, ya que la cantidad de fluorescencia producida durante la amplificación es proporcional a la cantidad de producto generado por ciclo. Esta se diferencia de la PCR semicuantitativa en que mientras que esta nos indica la cantidad de material producido tras la amplificación completa de la muestras (a tiempo final), la qPCR es capaz de informar sobre la cantidad de material producido cada amplificación, lo que nos permite conocer la evolución de la cantidad de DNA replicado tras cada ciclo de la PCR [50].

Como se ha comentado, a la PCR se le puede aplicar un paso extra en el que se convierte el RNA en cDNA mediante la enzima retrotranscriptasa. En el caso de la qPCR, esto se conoce como RT-qPCR (*quantitative reverse transcription PCR*), subtipo que permite el análisis cuantitativo del mRNA expresado por las células de la AML. Esta es la técnica molecular más comúnmente usada para la detección de la MRD en la AML [51,52].

Entre sus ventajas (*Tabla 5*) encontramos:

- (1) Alta sensibilidad de hasta 10^{-5} . Actualmente, la RT-qPCR es la técnica de elección para el seguimiento de la MRD. Esta monitorización se basa en la búsqueda de determinadas traslocaciones (p.ej. *BCR::ABL1*), genes mutados (p.ej. *NPM1*), genes expresados aberrantemente (p.ej. *WT1*) o cualquier otra alteración candidata no presente en las células normales del paciente [53].
- (2) Cuantificar la cantidad de DNA o RNA presente en la muestra original, que permite valorar si existen cambios en la cantidad de DNA o en la expresión de este (aumentos y disminuciones) [35].
- (3) Bajo coste, aunque mayor que el de la PCR a tiempo final por la necesidad de sondas fluorescentes [35].
- (4) Menor riesgo de contaminación al no ser necesario la manipulación post-PCR [35].

Sus desventajas (*Tabla 5*) son:

- (1) Necesidad de muestras de calidad y correctamente cuantificadas, ya que para realizar el análisis se emplean como control muestras con concentración conocida [50].
- (2) Mayor coste de las sondas fluorescentes [35] y calibradores (generalmente se usan 5 calibradores del gen diana y 4 del gen control).
- (3) La cuantificación es dependiente de la eficiencia de la PCR. En circunstancias ideales se supone que cada ciclo de PCR dobla la cantidad de DNA o RNA, sin embargo, en la práctica habitual existen muchas circunstancias que alteran la eficiencia de la PCR, de forma que esa regla no siempre se cumple. La eficiencia de la PCR se puede alterar por diversas razones como: la composición de la región diana, los primers o sondas que se usan, las concentraciones de los reactivos o el tipo de polimerasa utilizada, entre otras. En contraste, la PCR digital (*digital PCR*, dPCR) la reacción se rige por unas condiciones más ideales gracias a que las hebras de DNA se encuentran de forma individual en pocillos distintos [54,55].
- (4) Requiere curvas de calibración. Para evitar resultados alterados por defectos en la reacción secundarios a, por ejemplo, alteraciones en la eficiencia de la PCR, se utilizan curvas de calibración formadas por soluciones con cantidades material genético conocidas, de forma que podemos hacer una comparación entre las curvas y establecer un umbral de replicación conocido como *Ct* en el que no se observa replicación [54].
- (5) La monitorización de la MRD se limita solo a un 40-60% de las leucemias con al menos una alteración genética diana conocida, entra as que se incluyen: *NPM1*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*, *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL* y *WT1* [56].

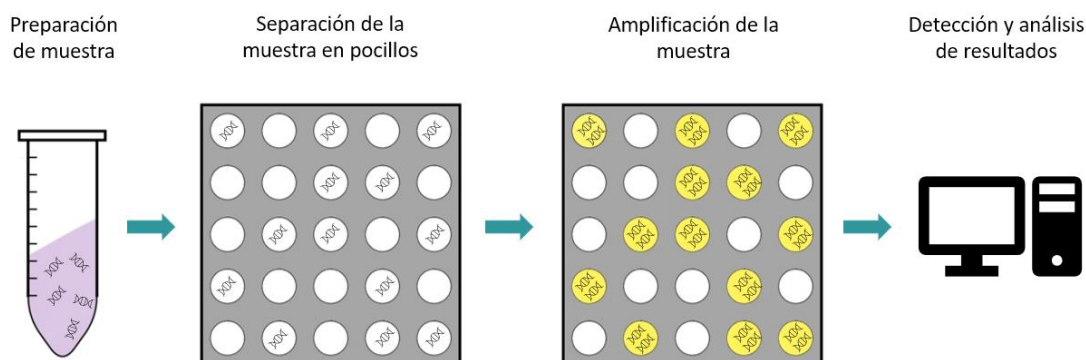
En conclusión, a pesar de la introducción de la secuenciación masiva la PCR sigue manteniendo utilidad en la práctica clínica, puesto que se trata de una técnica rápida, de mediano-bajo coste y que permite la cuantificación del DNA o RNA presente en la muestra original, siendo en múltiples ocasiones de elección respecto a técnicas más complejas como la NGS. Además, es esencial en la monitorización de la enfermedad mínima residual (MRD), siendo actualmente la técnica de elección. La MRD se refiere a los pacientes con remisión clínica completa que pueden tener hasta 10^{10} células tumorales residuales que son indetectables mediante técnicas citomorfológicas convencionales y pueden llevar a la recaída en ciertos casos [57].

PCR digital

La dPCR es una técnica especial de PCR que fue descrita por primera vez en 1999, pero cuya introducción al campo de la hematología ha sido de reciente [58]. Sus principales aplicaciones son la evaluación de la expresión génica, la detección de alelos raros y la estimación de variaciones del número de copia en líneas germinales o somáticas [52,59].

Esta técnica se basa en la dilución de la muestra y en su distribución en miles de distintas reacciones, con el objetivo de que en cada una de estas exista una o ninguna de las moléculas de DNA, junto con los *primers* y reactantes necesarios. Tras la amplificación, se mide la fluorescencia en cada gota, lo que permite determinar si es una señal de un alelo normal o mutado. Debido a que es prácticamente imposible que solo exista una molécula en cada pocillo, existiendo pocillos con dos, tres o más moléculas, se utilizan estadísticas de Poisson para ajustar los resultados. Gracias a esto, es posible encontrar variaciones poco frecuentes entre la gran cantidad de alelos naturales [52,60].

Imagen 5. Esquema del funcionamiento de la dPCR.



Existen dos formas de dPCR dependiendo de cómo se lleva a cabo la separación de la muestra y los reactantes, la cdPCR (*chip digital PCR*, cdPCR) y la ddPCR (*droplet digital PCR*, ddPCR) [61].

La cdPCR consiste en la partición de la muestra entre miles de pocillos de nanolitros. En estos se lleva a cabo la amplificación y tras esta se detecta la fluorescencia generada, que es proporcional al número de copias generado, con un sistema de imagen [61].

Por otro lado, en la ddPCR (*droplet digital PCR*, ddPCR) los compartimentos son miles de gotas formadas a partir de una reacción de agua en aceite y tecnología de microfluidos. En cada una de estas gotas se divide de forma aleatoria los ácidos nucleicos junto con

toda la maquinaria necesaria para su amplificación. Tras la amplificación, la detección de la muestra se da a través de la fluorescencia que emiten o no, cada gota al pasar por un capilar [61].

Entre sus ventajas encontramos:

- (1) Mayor sensibilidad y especificidad que la qPCR. La dPCR genera datos más reproducibles y precisos que la qPCR, especialmente cuando existen contaminantes en la muestra que pueden inhibir parcialmente la polimerasa, la unión de los *primers* o cuando la concentración de ácidos nucleicos es baja [55,58].
- (2) Cuantificación absoluta, no precisa de curva de calibración y tampoco depende tanto de la eficiencia de la PCR, siendo una técnica más lineal, reproducible y eficiente [55]. La dPCR tiene una mayor tolerancia a diferentes tipos de inhibidores que pueden dañar el DNA o hacerlo menos accesible [58].
- (3) Gran utilidad a la hora de detectar pequeñas cantidades de material genético debido a su alta sensibilidad, característica de gran interés en la detección de la MRD [59]. Actualmente la *European Leukemia Net* (ELN) considera que aquellas técnicas moleculares que permitan superar el límite de detección de la MRD, entre las que se encuentra la dPCR, establecido como 10^{-3} pueden ser utilizadas para su monitorización (recomendación B1). Sin embargo, no existe todavía una normalización y un consenso si los puntos de corte deben ser idénticos a los establecidos para la qPCR [58].
- (4) Útil en la cuantificación de ciertas alteraciones específicas de las leucemias, así como en el análisis de expresión génica, la detección de alelos raros y la estimación de variaciones en el número de copias germinales o somáticas [58].
- (5) Permite detectar el quimerismo tras un allo-HSCT, siendo superior en sensibilidad a la electroforesis capilar y sin la variación en la eficiencia respecto a la qPCR, las dos principales técnicas a la hora de determinar el quimerismo [58].
- (6) Más rápida que la NGS y no siendo necesario un extenso análisis bioinformático de los resultados [59].

Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes como:

- (1) Se trata de una técnica de mayor coste, aunque una vez amortizado el precio del aparato potencialmente es mucho más eficiente, al no precisar de curvas de calibración y ser más sensible, permitiendo potencialmente diseñar más ágilmente sondas para monitorizar anomalías específicas de nueva detección, y detectando más precozmente casos de riesgo de recaída, anticipándonos a esta [62].
- (2) No existe estandarización en su uso en la MRD, aunque se están llevando estudios acabo y la ELN sí que permite su utilización [56].

(3) Alto riesgo de contaminación de la muestra [61].

Secuenciación de primera generación. Método de Sanger

Por sus implicaciones históricas y como uno de los antecedentes más importantes de las técnicas de secuenciación actuales, vamos a tratar acerca de la secuenciación por el método de Sanger. Este fue desarrollado en 1977 por Sanger tratándose de una de las formas de secuenciación del DNA clásicas y que todavía hoy está en uso [63].

Esta técnica consiste básicamente en la realización de una PCR utilizando la muestra a estudio, añadiendo una pequeña cantidad de dideoxiligonucleótidos (ddNTPs), uno por cada tipo de nucleótido que compone el DNA (ATP, CTP, GTP y TTP. Los ddNTPs se marcan cuatro colores fluorescentes distintos, lo que más tarde permite la detección. Estos impiden la amplificación del DNA cuando se incorporan a la cadena [64].

Si realizamos la amplificación un número suficiente de veces, estadísticamente vamos a encontrar fragmentos de distintos tamaños y que terminan en un ddNTP distinto. Si esto lo combinamos con electroforesis podemos ver el tamaño de cada fragmento de DNA secuenciado y con fluorescencia el nucleótido en el que termina, lo que nos permite ordenarlos y determinar la secuencia del DNA [63,64].

La secuenciación de Sanger se trata de una técnica de secuenciación precisa (tasa de error del 0.001%), habiendo sido durante años la técnica de referencia para la secuenciación del DNA. Además, es una técnica sencilla a la hora de interpretar los resultados [63].

Sin embargo, la secuenciación de Sanger conlleva un gran trabajo por base secuenciada y es poco adecuada para la secuenciación de grandes fragmentos de DNA (actualmente hasta 1 Kb), no solo por cómo funciona la técnica en sí, sino también por su precio. Además, presenta una baja sensibilidad (10-20%) [63,65].

NGS – Secuenciación masiva

La NGS es un término que abarca una serie de técnicas muy flexibles y que pueden adaptarse para realizar múltiples funciones, como: secuenciar el genoma completo, exoma o cualquier subconjunto del DNA; dar información del número de copias del DNA; secuenciar el transcriptoma completo o cualquier subconjunto de este; identificar translocaciones y demostrar los niveles de expresión génica, entre otras aplicaciones. Sin embargo, se trata de una tecnología de gran complejidad que requiere gran capacidad de almacenamiento de datos y análisis bioinformático de los datos generados [37,66].

Dentro de las técnicas de secuenciación, la NGS de segunda generación se considera dentro de las técnicas de segunda generación, basadas en la monitorización in vivo de la PCR sobre miles o millones de fragmentos de DNA de manera simultánea que previamente han sido amplificados formando agrupaciones o clústeres [35].

Los pasos que sigue la NGS son básicamente: primero, la preparación de una librería de datos; segundo, secuenciación y tercero, el análisis informático de los datos generados.

En la primera etapa, se preparan los fragmentos de DNA o RNA para su secuenciación, fragmentándolos y añadiendo secuencias conocidas en sus extremos. En la segunda etapa, se amplifican todos estos fragmentos en un proceso conocido como generación de clústeres, generando millones de copias de DNA o RNA. En esta misma etapa, se secuencian los fragmentos utilizando nucleótidos modificados y marcados con fluorescencia. En el último paso, se produce el análisis de los datos, cuya información varía dependiendo de que técnica se use o que información se busque [35,51].

Tabla 4. Comparativa entre Sanger y NGS [67].

	SANGER	NGS
RESOLUCIÓN	Media entre muchas copias de DNA	Media entre muchas copias de DNA
PRECISIÓN DE LECTURA	Alta	Alta
RENDIMIENTO	Bajo	Alto
COSTE	Alto coste por base Bajo coste por ensayo	Bajo coste por base si buen diseño del estudio Alto coste por ensayo
TIEMPO DE RESPUESTA	Horas	Días o semanas
MUESTRA	Moderadamente compleja, sin necesidad de amplificación previa por PCR	Compleja, se necesita de amplificación previa con PCR o captura con sondas
ANÁLISIS DE LOS DATOS	Relativamente sencillo	Complejo (mucha información generada)

Cabe destacar las ventajas que suponen estas técnicas respecto al método de Sanger (Tabla 4):

- (1) Gran abaratamiento del coste y del esfuerzo en grandes proyectos de secuenciación. La primera secuenciación del genoma humano tardó en llevarse a cabo más de una década y costó 2 700 millones de dólares, con el trabajo conjunto de cientos de trabajadores repartidos en 20 centros alrededor del mundo, mientras que hoy, usando la NGS se puede secuenciar el genoma completo en unos días, por menos de 1 000 dólares y todo ello llevado a cabo esencialmente por una sola persona [35,37].
- (2) Permite realizar estudios de secuenciación no dirigidos a regiones concretas. Esto permite la demostración de mutaciones que, en principio, no esperamos encontrar en la muestra. Esto ha permitido la descripción de múltiples mutaciones, ayudando a la determinación de la fisiopatología del desarrollo de múltiples cánceres. Todo esto, ha contribuido a generar una clasificación molecular de los distintos cánceres en la clínica general y por supuesto en la AML [35,68]. Sin embargo, estas aproximaciones actualmente no se utilizan en asistencia sino dentro de ensayos clínicos o estudios de investigación, por su alto

coste, además de que se obtiene información de utilidad de significado incierto que complica el análisis y el asesoramiento terapéutico, enlenteciendo los tiempos de respuesta.

En el caso de la AML, la NGS ha servido para dilucidar la complejidad genética de los subtipos que la conforman, detectando nuevas mutaciones, su función y describiendo patrones de exclusión y de coexistencia. A pesar de que se describen múltiples genes en la patogénesis de la AML, actualmente solo algunos de estos son de utilidad clínica. Esta utilidad se define por su mejora la determinación del pronóstico ya establecido de la enfermedad, reconociéndose actualmente por varias guías que la mejor forma de estratificación de la AML es con la combinación de las grandes alteraciones cromosómicas y las mutaciones a pequeña escala (FLT3, ASXL1, TP53, DNMT3A, KMT2A...). Además, un mayor conocimiento de estas alteraciones permite la propuesta de nuevas clasificaciones en las que los genes no son considerados como entidades independientes, sino que están organizados en grupos de acuerdo con las funciones o rutas en las que están involucrados. Esta nueva forma de enfrentarse a la enfermedad es especialmente importante en los casos con cariotipo normal, porque para este grupo, la estratificación de riesgo basado en la citogenética no es suficiente [68,69].

Algunas de estas fueron reconocidas en 2016 por la clasificación de la WHO, estableciendo como entidades separadas los subtipos con NPM1, CEBPA bialélica y RUNX1, como ya se comentó previamente [69]. Sin embargo, el número de genes con aplicación va en aumento.

Una de estas mutaciones que intervienen en la fisiopatología de la enfermedad es FLT3, teniendo gran importancia en el pronóstico de la AML. FLT3 está presente en hasta un 40% de los pacientes con AML, de los cuales, la mayoría presenta un cariotipo normal, es decir, formarían parte del grupo de pronóstico intermedio en las clasificaciones basadas en la citogenética. Sin embargo, actualmente FLT3 es un gen confiere mal pronóstico por lo que estos pacientes estarían mal clasificados en el grupo de pronóstico intermedio, asociándose a una peor respuesta terapéutica, mayor riesgo de recidiva y menor supervivencia global [70,71]. El conocimiento sobre su importancia en la AML llevó al desarrollo de fármacos dirigidos contra la acción de la proteína para la que codifica, los inhibidores de FLT3, siendo la midostaurina el primero en aprobarse por la *Food and Drugs Administration* (FDA). Más tarde, salieron al mercado nuevos inhibidores de FLT3, categorizados como inhibidores de FLT3 tipo 2 (por ejemplo, quizartinib, sorafenib, gilteritinib). Esto demuestra la importancia de la detección de mutaciones implicadas en la fisiopatología de la AML, ya que potencialmente pueden modificar el pronóstico con el desarrollo de moléculas dirigidas [72].

- (3) Permite el análisis simultáneo de varias anomalías de forma conste-eficiente, lo cual es útil para:
 - a. La detección de subclones con implicación pronóstica (*Ver apartado: "evolución clonal de la AML"*).

- b. Permite sospechar presencia de anomalías germinales [14,73].
 - c. Permite categorizar pacientes que con técnicas clásicas no presentan anomalías. Así muchos de los pacientes con cariotipo normal presentan anomalías en FLT3 o DNMT3A asociados a mal pronóstico [74].
- (4) Gran versatilidad de las técnicas que permiten la secuenciación completa del genoma, la identificación de todas las mutaciones genéticas presentes en un organismo frente a un genoma de referencia, la detección de cambios en la expresión, la identificación de nuevos genes y transcriptos, la identificación de todos los sitios de unión al genoma de una proteína de interés y la realización de análisis epigenéticos [35,75].
 - (5) Gran sensibilidad para la detección de mutaciones presentes en un número reducido de moléculas de DNA en muestras complejas. Es debido a esta alta sensibilidad que la técnica es de gran utilidad en la detección de subpoblaciones clonales dentro de la AML. Gracias a esto, existe gran interés en la aplicación de esta técnica en el futuro de la monitorización de la MRD [35,76].

Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la determinación de un gran número de genes es una necesidad en la AML. Esto puede ser muy laborioso, llevar grandes cantidades de tiempo y resultar costoso utilizando técnicas moleculares convencionales. Estos problemas podrían solucionarse gracias al uso de NGS, que permite con gran sensibilidad llevar a cabo el estudio de numerosos genes y pacientes en un mismo procedimiento, con sensibilidad y especificidad que varían en un rango entre el 85 y el 99% [69].

Sin embargo, presentan ciertas desventajas, algunas de las cuales son la causa inmediata de alguna de sus ventajas (*Tabla 5*):

- (1) Necesidad de infraestructura técnica e informática de gran complejidad y coste, tanto para la realización de secuenciación como para el almacenamiento de la gran cantidad de datos generados ([35,37].
- (2) Alto nivel de especialización de los profesionales a cargo del desarrollo de la tecnología y del análisis de los datos generados [35].
- (3) Tiempo de respuesta largo, que va desde días a semanas, por la necesidad de acumulación de muestras para un análisis coste-efectivo, que contrasta con otras técnicas que nos permiten conocer los transcritos como la PCR [77,78].
- (4) Precio elevado [35], no pudiendo aplicarse de rutina siendo poco eficiente para la secuenciación de pocos genes diana.
- (5) Generación de gran cantidad de datos cuya relevancia clínica puede ser dudosa, al encontrar múltiples variantes de significado incierto [79].
- (6) No disponible en la mayoría de los centros [35].

- (7) Actualmente no es posible introducir esta técnica en la clínica habitual para la monitorización de la MRD. Aunque por su alta sensibilidad es una técnica ideal para esta, los costes no son asumibles hoy en día para la monitorización de la MRD [80].

Secuenciación de tercera generación

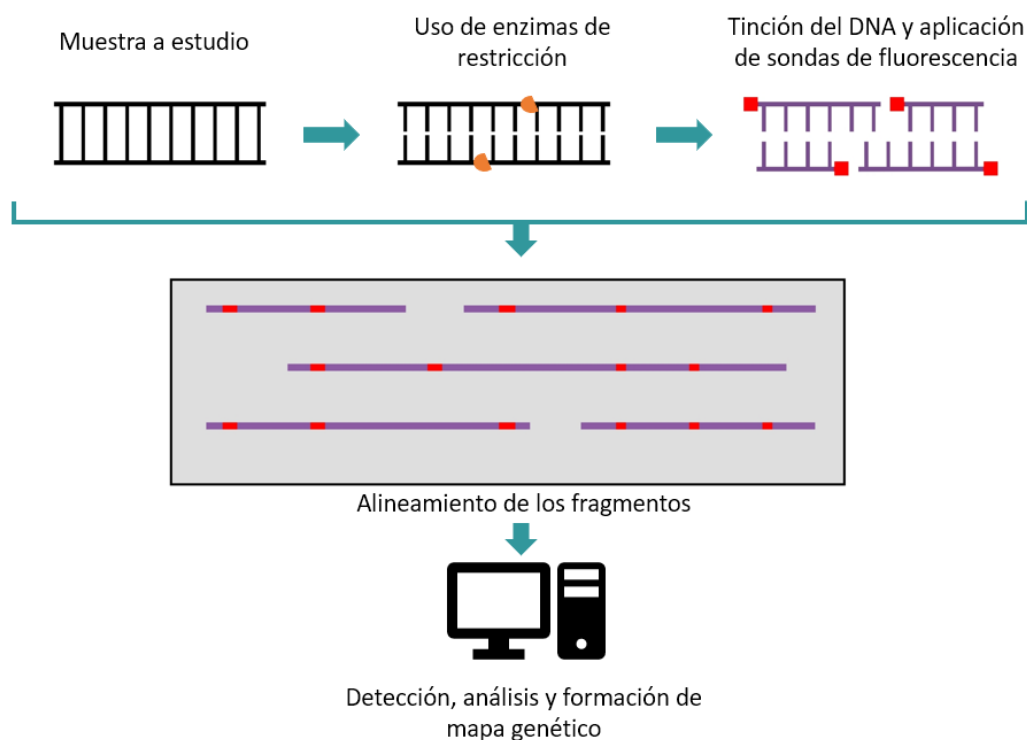
Son técnicas más modernas aun en desarrollo capaces de monitorizar in vivo la PCR sobre miles o millones de fragmentos de DNA de manera simultánea que, a diferencia de las técnicas de segunda generación, se sigue la reacción sobre una única molécula de DNA no modificado ni amplificado que en teoría permitiría detectar la presencia de nucleótidos modificados. Son tecnologías que aún no se encuentran ampliamente distribuidas y de reciente aparición [35].

En teoría, estas técnicas permitirían el análisis con una única hebra de los distintos nucleótidos, sin introducir errores aleatorios como podría suceder con la PCR y con un tiempo de respuesta más corto. Sin embargo, todavía son técnicas que presentan altas tasas de errores lo que no permite su introducción en el diagnóstico de neoplasias hematológicas [35,81].

Optical Genome Mapping

El Mapeo Óptico Genómico (*Optical Genome Mapping*, OGM) es una técnica que se presenta como una posible técnica complementaria a las técnicas citogenéticas utilizadas en la actualidad (cariotipo y FISH) [82].

Imagen 6. Esquema del funcionamiento de la OGM.



	CARIOTIPO	FISH	PCR A TIEMPO FINAL	QPCR	NGS
Tejido	Fresco	Todos	Todos	Todos	Todos
Cantidad de muestras	Mucha	Poca	Poca	Poca	Poca
Sensibilidad	10^{-2}	10^{-3}	$10^{-2}/10^{-5}$	$10^{-2}/10^{-5}$	Teóricamente hasta 10^{-9}
Laboriosidad	Alta	Media	Baja	Baja	Baja
Falsos +	No	No	Si (elevada sensibilidad)	Si (elevada sensibilidad)	Si
Falsos -	Si	No	Si (puntos de rotura variables)	Si (puntos de rotura variables)	No
Precio	+	++	+	++	+++
Ventajas	Análisis global del material genético Detección de alteraciones primarias y adicionales	Análisis en metafase e interfase Análisis de un elevado número de células Elevada especificidad	Permite visualizar los tamaños de los fragmentos amplificados Elevada sensibilidad y reproducibilidad	Permite cuantificar la cantidad de DNA o RNA presente en la muestra original Bajo riesgo de contaminación. No hay manipulación post-PCR	Es una técnica muy flexible Habilita a hacer estudios de secuenciación no dirigidos a regiones concretas Gran sensibilidad para detectar mutaciones presentes en un número reducido de moléculas de DNA en muestras complejas
Desventajas	Requiere células en división (metafase) Muy poca resolución Poco sensible	No análisis global del genoma	Mide la acumulación del DNA al final de la reacción Necesidad de estandarización Alto riesgo de contaminación Se necesita electroforesis para detectar los productos	Necesidad de muestras de alta calidad y correctamente cuantificadas Necesidad de estandarización Coste de las sondas fluorescentes	Necesidad de infraestructura técnica e informática de gran complejidad y coste, tanto para la realización de la secuenciación como para el almacenamiento de los datos Alto nivel de especialización requerido para el desarrollo de la tecnología y para el análisis de los datos generados Necesidad de análisis de varias muestras en el mismo ensayo para aumentar eficiencia

Tabla 5. Comparativa de algunas técnicas descritas [35].

Entre las ventajas del OGM encontramos:

- (1) Permite el estudio de la estructura del DNA y los cambios que se producen en este. Entre estos, permite la identificar sucesos de cromotripsis, implicados como causa de ciertas anomalías cromosómicas [83].
- (2) Mayor resolución que las técnicas citogenéticas como el cariotipo (resolución de 4-5 Mbp) o la FISH (resolución de 100 kbp), alcanzando resoluciones de hasta 500 bp [83].
- (3) Al no precisar de cultivo previo, evita la detección de alteraciones artefactuales inducidos por la expansión in vitro como ocurre en otras técnicas como el cariotipo [83].
- (4) Técnica objetiva, menos operador dependiente que el cariotipo o la FISH [83].
- (5) Permite la recreación de todo el genoma de *novo* [84].
- (6) Se pueden utilizar muestras directamente obtenidas del paciente, no siendo necesarias células vivas y en división o la realización de cultivos celulares como ocurre en el cariotipo o la FISH ni la amplificación [83]. Esto permite obtener una tasa de detección de anomalías citogenéticas mayor que con el cariotipo, ya que en este existe un porcentaje de estudios (5-10%) no valorables por ausencia de metafases, sobre todo en casos de empaquetamiento o de mielofibrosis asociada.
- (7) Gracias a su resolución esta técnica tiene potencial en la monitorización de la MRD, lo que tendría gran utilidad en aquellos casos en los que no se encuentren marcadores conocidos para la detección de la MRD por PCR [83].
- (8) Permite el estudio de subclones sin el riesgo de sesgo inducido por proliferación selectiva o por la falsa cuantificación de metafases en relación con la baja proporción de células estudiada, como sucede en el cariotipo [83].
- (9) Permite obtener resultados similares al cariotipo, FISH y arrays, pero en una sola técnica, potencialmente reduciendo el coste.

Entre sus desventajas encontramos:

- (1) Técnica de reciente incorporación por lo que no existen estudios de validación [83].
- (2) Coste elevado similar al de otras técnicas basadas en NGS, aunque en pacientes en los que haya que aplicar cariotipo, FISH y arrays, puede potencialmente constituir una alternativa más coste-efectiva. [83,84].
- (3) Baja sensibilidad en regiones repetitivas como centrómeros o telómeros [83].

- (4) Baja sensibilidad en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22), debido a que el OGM utiliza marcadores dirigidos contra motivos de secuencia CTAA no presentes en estos [83].
- (5) Mayor tiempo de respuesta respecto a las técnicas citogenéticas actuales, con una demora de 1-2 semanas [84].

EVOLUCIÓN CLONAL DE LA AML

Las leucemias agudas son trastornos clonales originados a partir de un mismo precursor común. Esto se demuestra con el estudio de mujeres heterocigotas para el isoenzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), una mutación ligada al cromosoma X. En estas mujeres, las células sanguíneas normales expresan una de las dos isoenzimas por supresión aleatoria de uno de los dos cromosomas X, lo que se traduce en un 50% de expresión de cada isoenzima. En el caso de las leucemias que se desarrollan sobre estas mujeres, las células solo expresan una de las dos isoenzimas, lo que demuestra que el origen es a partir de una misma célula [85].

La aparición de subpoblaciones clonales es consecuencia del carácter evolutivo de la enfermedad, esto puede ocurrir porque al llevar a cabo el diagnóstico de la enfermedad cometemos un sesgo al clasificarla por el clon más común, muchas veces por no disponer de la sensibilidad suficiente para detectar clones de baja expresividad o porque el tumor vaya ganando alteraciones adicionales. Cuando apliquemos el tratamiento dirigido contra este clon, es posible que hagamos una “selección natural” de un subclon del tumor que presente otras mutaciones que le confieran resistencia al tratamiento, por lo que ciertas células son capaces de sobrevivir y más tarde volver a desencadenar la enfermedad, aunque con otras características debido a la presencia de otras mutaciones no presentes en el primer diagnóstico [51,70].

Es decir, aunque se haya mejorado en el diagnóstico, clasificación y tasas de remisión, sigue existiendo un importante número de pacientes (en ciertos estudios de hasta el 50%) que recaen debido a la selección por medio del tratamiento instaurado de clones resistentes [70,71].

Para esto se buscan dentro de los distintos subclones de la AML distintas mutaciones que puedan conferir resistencia a los posibles tratamientos. Este es el caso de ciertas mutaciones de FLT3 que conllevan resistencia a ciertos inhibidores de esta [70].

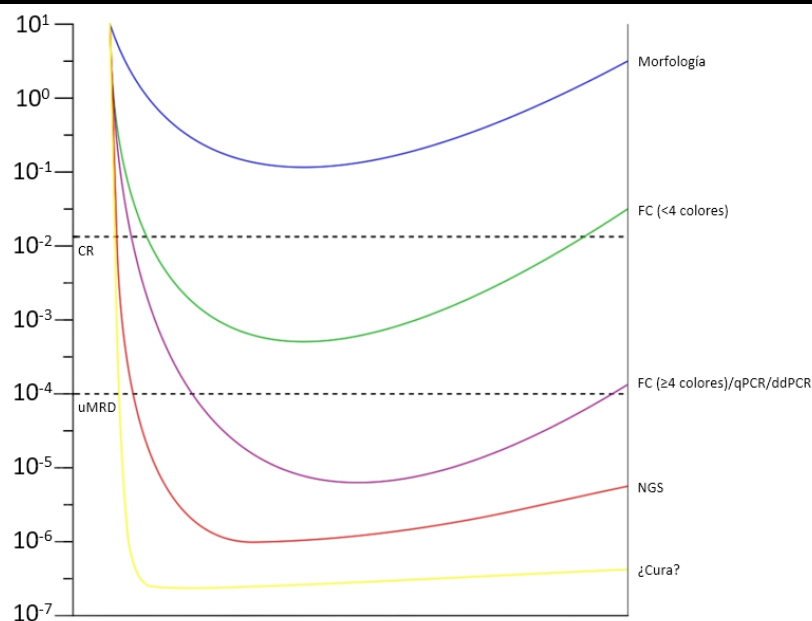
Actualmente esta técnica produce una gran cantidad de información que necesita de equipos de bioinformática para su análisis y servidores para el almacenamiento de los datos. Además, parte de la información que genera esta técnica escapa de nuestro conocimiento, ya que no disponemos de información necesaria o de calidad sobre las alteraciones detectadas [51,86]. Esto quiere decir que no sabemos con precisión si se tratan de mutaciones que no tienen ningún impacto, tienen un impacto positivo o tienen un impacto negativo [35,69] (*Ver apartado: “variantes genéticas”*).

ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

La MRD es uno de los factores independientes del pronóstico más importantes en la AML. Uno de los grandes problemas que presenta la AML es su capacidad de recaída tras un tratamiento. Esto sucede debido a la persistencia de ciertas células tumorales tras el tratamiento en el paciente, que con la tecnología actual somos incapaces de detectar entre un número determinado de células normales y que tras un periodo de tiempo vuelven a replicarse y a causar la enfermedad. Sin embargo, es posible tener una vigilancia activa del paciente a través de la aplicación de las técnicas diagnósticas anteriormente descritas. Para ello, se pueden aplicar cualquier estas técnicas, sin embargo, existen algunas que presentan ciertas ventajas sobre otras, siendo la principal la sensibilidad de la técnica, por lo que se suele preferir aquellas que presenten una mayor sensibilidad [87].

La sensibilidad es la cualidad más importante en la medida del MRD porque aumenta la confianza en que no existan células tumorales. Por este mismo motivo, se utilizan técnicas que permitan encontrar estas células o indicios de su existencia entre el mayor número posible de células normales. Actualmente se combinan la citometría de flujo y los análisis basados en PCR para la determinación de la MRD (frecuentemente qPCR) [85].

Imagen 7. Sensibilidad de las técnicas en la detección de la MRD. Adaptada de [88].



Se aprecia en el eje x los distintos niveles de sensibilidad de a los que alcanza cada técnica respecto a la evolución de la enfermedad tras tratamiento. CR: remisión completa, uMRD: enfermedad mínima residual indetectable.

La citometría de flujo multidimensional es una de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de MRD. Se basa en que alrededor del 90% de las células de los casos de AML expresan en su superficie combinaciones de antígenos o anomalías físicas que raramente están presentes en las células normales. Esta técnica puede detectar hasta un 0,01% de células leucémicas en una BM en remisión. Una de sus principales ventajas es su amplia aplicabilidad, mientras que la PCR puede usarse en una gran proporción de pacientes menores de 60 años, pero no en el grupo mayor de dicha edad, esta puede

aplicarse a cualquier edad. Otras ventajas son: un tiempo corto para obtener los resultados, la especificidad y la capacidad de proporcionar datos cuantitativos [85].

Los análisis basados en PCR son útiles en pacientes con determinadas mutaciones o genes de fusión. Estas características se dan en alrededor de un 60% de los pacientes menores de 60 años [85].

Por su gran sensibilidad, estas técnicas se consideran el patrón oro. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes como que solo pueden aplicarse a ciertos subgrupos de pacientes que en el momento del diagnóstico presentan alteraciones genéticas candidatas a seguimiento con PCR (actualmente alrededor del 40% de todos los pacientes con AML) [85,87].

Actualmente, la ELN recomienda el uso de qPCR para el estudio de la MRD por su alta sensibilidad (hasta 10^{-6}). Actualmente la ELN considera posible el uso de la dPCR para su monitorización [58] y plantea la dPCR y la NGS como futuras posibles técnicas con este propósito, tras una validación de ambas [87].

Existen distintos marcadores moleculares para la medición de la MRD, las mutaciones de NPM1 y los genes de fusión *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* y *PML::RARA* son buenos predictores de recaída, existiendo puntos de corte estandarizados, mientras que existen otras mutaciones que pueden o no ser útiles dependiendo de la situación y características de la AML. Por ejemplo, ciertas mutaciones presentes en los clones fundadores preleucémicos pueden persistir a niveles significativos, incluso una vez alcanzada la remisión completa morfológica, pero no tienen un impacto demostrado en el pronóstico o en los que no hay puntos de corte bien establecidos. Tampoco son de utilidad aquellas mutaciones asociadas a AML germinal que están presentes en el genoma del paciente, de forma que serán detectables siempre a pesar del tratamiento, como pueden ser RUNX1, GATA2, CEBPA, DDX41 y ANKRD26. Se recomienda, que en casos en los que se detecten mutaciones que estén relacionadas con las AML germinales, se excluya o confirme con el análisis de estos genes con una muestra de tejido germinal (biopsia cutánea, folículo piloso o con torunda de epitelio bucal) [87].

La detección de la MRD con técnicas basadas en NGS es un fenómeno emergente, que puede combinarse con las técnicas actuales o incluso llegar a reemplazarlas, gracias a su alta sensibilidad, aunque todavía hoy en día no es posible llevar a cabo, fundamentalmente por los tiempos de respuesta y coste [87,89].

La NGS tiene como ventaja sobre otras técnicas que puede utilizar múltiples variantes del DNA, además, tiene una alta sensibilidad (permite detectar mutaciones de un solo par de bases en frecuencias de entre 10^{-4} y 10^{-7} o incluso mayores, consiguiendo teóricamente, con secuenciación dúplex detección en frecuencias de 10^{-9}) si se aplican métodos de corrección de errores y que además, podría aplicarse a una alta proporción de casos (en contraposición a los métodos de seguimiento con qPCR que solo puede aplicarse a una proporción limitada de casos con alteraciones específicas) [89].

Sin embargo, actualmente no es factible usar la NGS como técnica de detección de la MRD en la práctica habitual, ya que el coste económico es muy superior a las técnicas actuales y para conseguir mayores sensibilidades solo podemos analizar pocos genes

por ensayo, lo que dispararía el coste. También podríamos estudiar a varios pacientes por ensayo, lo que retrasaría la obtención de resultados por la necesidad de acumulación de muestras y no alcanzaría sensibilidades tan altas, aunque es más eficiente que el propuesto anterior. Además, no existen métodos estandarizados para su inclusión en la práctica clínica [76,89].

La dPCR por su mayor sensibilidad, linealidad y ausencia de necesidad de calibradores se presenta como una herramienta más coste-eficiente para la monitorización de la MRD [58].

VARIANTES GENÉTICAS

Las técnicas como la NGS presentan una alta sensibilidad a la hora de detectar mutaciones. Esto que a priori es una ventaja, genera grandes cantidades de información, la cual es difícil de analizar, categorizar y almacenar. Actualmente cantidad de variantes genéticas que se descubren es tan grande que se ha sobrepasado nuestra capacidad de determinar su efecto biológico [14]. Estas se conocen como variantes genéticas de significado incierto (*variant of uncertain significance*, VUS) ya que nuestro conocimiento en el momento de su detección no nos permite determinar si su naturaleza es benigna, si es una variante normal o si puede afectar a la función del gen.

Para su clasificación, se han propuesto una serie de criterios que van a favor o en contra de la benignidad/malignidad de las variantes, y es el computo de todos ellos siguiendo unas escalas lo que determina el significado de la variante (*Tabla 6*) [90].

Tabla 6. Criterios de clasificación de las variantes. Extraída de [90].

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very Strong
Population Data	MAF is too high for disorder <i>BA1/BS1</i> OR observation in controls inconsistent with disease penetrance <i>BS2</i>			Absent in population databases <i>PM2</i>	Prevalence in affecteds statistically increased over controls <i>PS4</i>	
Computational And Predictive Data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product <i>BP4</i> Missense in gene where only truncating cause disease <i>BP1</i> Silent variant with non predicted splice impact <i>BP7</i>	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product <i>PP3</i>	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before <i>PM5</i> Protein length changing variant <i>PM4</i>	Same amino acid change as an established pathogenic variant <i>PS1</i>	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease <i>PVS1</i>
Functional Data	Well-established functional studies show no deleterious effect <i>BS3</i>		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common <i>PP2</i>	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation <i>PM1</i>	Well-established functional studies show a deleterious effect <i>PS3</i>	
Segregation Data	Non-segregation with disease <i>BS4</i>		Co-segregation with disease in multiple affected family members <i>PP1</i>	Increased segregation data →		
De novo Data				<i>De novo</i> (without paternity & maternity confirmed) <i>PM6</i>	<i>De novo</i> (paternity & maternity confirmed) <i>PS2</i>	
Allelic Data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant <i>BP2</i> Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant <i>BP2</i>		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant <i>PM3</i>		
Other Database		Reputable source w/out shared data = benign <i>BP6</i>	Reputable source = pathogenic <i>PP5</i>			
Other Data		Found in case with an alternate cause <i>BP5</i>	Patient's phenotype or FH highly specific for gene <i>PP4</i>			

Además, pueden utilizarse modelos informáticos que predicen como la variante afectara a la función de la proteína, aunque nunca puede utilizarse esta información por sí misma para clasificar la variante ni para la toma de decisiones clínicas [14].

Existen bases de datos sobre estas variantes en las que distintos laboratorios pueden buscar información sobre estas. Aunque estas bases de datos sean útiles, deben de utilizarse con cautela, ya que pueden contener errores de clasificación por reclamaciones incorrectas, el método utilizado para obtener la información acerca de la variante o la frecuencia con la que se actualiza cada base de datos determinada, entre otras. Aun así, estas bases de datos presentan un gran potencial a la hora de aumentar el conocimiento de la enfermedad y en la práctica clínica, por lo que sería de interés la estandarización y validación de estas con el fin de facilitar el acceso a información actualizada y veraz [90].

AML FAMILIAR

La incorporación de la NGS tanto en el campo de la investigación como en el de la asistencia ha puesto de manifiesto la existencia de mutaciones germinales que predisponen al desarrollo de la AML. En este sentido, la AML germinal es una entidad reconocida en la clasificación de la WHO de 2016 y las guías NCCN, que establecen la importancia de detectarlas precozmente para un adecuado enfoque terapéutico, incluyendo la correcta selección de un donante y un adecuado asesoramiento genético. Básicamente es un subtipo de AML distinto caracterizado por la presencia de ciertas mutaciones que predisponen al desarrollo de la AML. Lo característico de estas mutaciones es que se heredan de los progenitores, y se pueden transmitir entre generaciones, en contraposición a las mutaciones que ya hemos visto que son esporádicas o *de novo* sobre pacientes sanos. Aunque actualmente se desconoce su incidencia real, se estima que hasta un 10% de las neoplasias hematológicas podrían estar relacionadas con variaciones de riesgo heredadas. Las guías nórdicas estiman que en adultos esta tasa se encuentra entre el 5 y el 15%, mientras que en niños es del 4 al 13% para AML y MDS [14,91–93].

En este apartado, debemos hacer una distinción en los diferentes tipos de predisposición genética a la AML (*Tabla 7*), que podemos clasificar en dos grupos, la AML de origen sindrómico y la AML familiar no sindrómica. La AML de origen sindrómico incluye aberraciones que condicionan diversas anomalías incluyendo un mayor riesgo al desarrollo de AML, como pueden ser el síndrome de Down, la neurofibromatosis tipo 1, el síndrome de Noonan y el síndrome cardiofaciocutáneo (RASopatías), así como otros síndromes de fallo medular (por ejemplo, anemia de Diamond-Blackfan). Por otro lado, la AML familiar no sindrómica se asocia a mutaciones en determinados *loci*, estos pueden estar restringidos a ciertos núcleos familiares (ATG2B, GSK1P, ETV6, SRP72), mientras que otros son más frecuentes o exclusivos de las formas hereditarias (DDX41). Además, todas estas alteraciones genéticas ya sean sindrómicas o no, se relacionan no sólo con neoplasias mieloides, sino que también con otras alteraciones como pueden ser aquellas que afectan a las plaquetas (trombocitopenia o alteración de su función), inmunodeficiencias u otras neoplasias como los linfomas [92].

Estos genes que se han relacionado con la leucemia germinal presentan fenotipos que se solapan. Además, cada uno contribuye a una pequeña fracción de la leucemia germinal, siendo necesaria la presencia de varios de ellos para que se desarrolle la enfermedad.

Tabla 7. Clasificación de las neoplasias mieloides con predisposición germinal [94].

Neoplasias mieloides con predisposición germinal sin alteración o disfunción orgánica preexistente.
AML con mutaciones germinales de CEBPA
Neoplasias mieloides con mutaciones germinales de DDX41
Neoplasias mieloides con predisposición germinal y alteraciones plaquetarias preexistentes.
Neoplasias mieloides con mutaciones germinales RUNX1
Neoplasias mieloides con mutaciones germinales ANKRD26
Neoplasias mieloides con mutaciones germinales ETV6
Neoplasias mieloides con predisposición germinal y disfunción orgánica.
Neoplasias mieloides con mutaciones germinales GATA2
Neoplasias mieloides asociadas con síndromes de fallo medular
Neoplasias mieloides asociadas con alteraciones en la biología de los telómeros
Leucemia mielomonocítica juvenil asociada con neurofibromatosis, síndrome de Noonan o síndromes Noonan-like
Neoplasias mieloides asociadas con síndrome de Down

Debido a que la información acerca de la leucemia familiar sea todavía muy limitada existen diversas incógnitas en cuanto al manejo de esta enfermedad. Sin embargo, detectar la leucemia familiar es de gran importancia en la práctica clínica. Aunque las mutaciones germinales sean un fenómeno poco común dentro de una enfermedad poco frecuente como es la AML, su detección tiene gran potencial desde el punto de vista de consejo genético, así como de tratamiento, ya que existen casos de allo-HSCT donde el donante era un familiar asintomático donde el receptor ha vuelto a desarrollar la enfermedad. La presencia de este tipo de mutaciones también aumenta el riesgo de desarrollo de leucemias secundarias a tratamiento quimioterápico, en estos casos podría ser interesante plantear un seguimiento de los pacientes que tengan estas mutaciones y vayan a someterse a este tipo de tratamientos [91,92].

Para su diagnóstico es preciso una buena historia clínica, preguntar por antecedentes de enfermedades hematológicas en familiares de primer, segundo y tercer grado es de gran interés, debido a que estas mutaciones no se relacionan exclusivamente con la AML, sino que también con citopenias, MDS y leucemias linfoides, entre otras [91].

Las recomendaciones principales para el despistaje de etiología germinal son tres. (1) Pacientes con MDS o AML y con antecedentes familiares o personales sugerentes de este origen, (2) pacientes con MDS o AML y potencialmente con variantes germinales en células clonales incluso aunque sea en genes no asociados hasta la fecha con las neoplasias germinales, si la VAF detectada es del 50% y (3) pacientes con neoplasias mieloides diagnosticadas antes de los 50 años con aberraciones del cromosoma 7 y sin historia familiar [91].

El tercero de estos supuestos, la aparición de leucemia en las primeras etapas de la vida es un dato sugestivo de etiología germinal. Sin embargo, existen ciertas mutaciones

como DDX41 que se caracterizan por el desarrollo de AML (entre otras patologías) en etapas más tardías de la vida, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que se trate de una leucemia germinal incluso en aquellas que se diagnostiquen en pacientes adultos [14].

Por todos estos motivos, en muchas situaciones el análisis basado en NGS se considera el más eficiente. Por un lado, las guías nórdicas recomiendan la aplicación de paneles de genes relacionados con estas anomalías germinales, mientras que las guías NCCN recomiendan estudios del exoma o genoma completos [91,93]. Es importante señalar que se recomienda no tomar decisiones medicas basadas en la detección de VUS (Tabla 8), así como tampoco buscarlas en familiares del paciente [14], aunque si registrarlas porque el conocimiento de nuevas variantes con efecto conocido prácticamente aumenta de forma diaria [90].

Tabla 8. Clasificación del manejo de las variantes en la AML germinal [14].

CLASIFICACIÓN	IMPLICACIONES EN EL MANEJO	IMPLICACIONES EN LOS FAMILIARES
PATOGÉNICA	Seguir guías de manejo para el síndrome	Ofrecer pruebas de detección para los familiares en riesgo y los donantes de BM
PROBABLEMENTE PATOGÉNICA	Seguir guías de manejo para el síndrome	Ofrecer pruebas de detección para los familiares en riesgo y los donantes de BM
INCIERTA	No considerar en el manejo	No hacer pruebas de detección a familiares ni a donantes de BM
PROBABLEMENTE BENIGNA	No considerar en el manejo	No hacer pruebas de detección a familiares ni a donantes de BM
BENIGNA	No considerar en el manejo	No hacer pruebas de detección a familiares ni a donantes de BM

En estos pacientes el análisis genético es más complicado al no poder realizarse con muestras de sangre o de BM ya que no es posible distinguir entre las mutaciones germinales y las somáticas, aunque existen excepciones como los pacientes en remisión sobre los que se considera aceptable el uso de muestras sanguíneas. Para aquellos sobre los que no se puedan utilizar muestras de sangre o BM, se pueden emplear muestras de otros tejidos como de pelo o piel. Idealmente se obtendrá un cultivo de fibroblastos de la piel del paciente, ya que no presentan los inconvenientes que presentan el resto de las muestras, principalmente la presencia de linfocitos y blastos, aunque para esto se requieren centros que dispongan de la posibilidad de hacer dicho tipo de cultivos que, además, presentan tiempos de respuesta mayores [14].

El consejo genético debe ofrecerse a todos los pacientes con neoplasia mieloide germinal, así como a los pacientes con historia familiar en los que no se ha demostrado mutación patogénica. Este nos permite detectar posibles familiares portadores de la mutación y de esta forma, recomendar un control estrecho. El seguimiento se recomienda a todos los pacientes con mutación germinal que predisponga al desarrollo de MDS o AML. Aunque los tipos de estudio a realizar todavía no están estandarizados y posiblemente varían en función del tipo de gen y variante, aún se precisan guías de consenso y registros validados de estas variantes con asesoramiento específico. En este,

se llevan a cabo exámenes del paciente en intervalos regulares e intervenciones educativas, donde se enseña a los pacientes los posibles síntomas o signos de alarma del MDS o la AML [91].

Otra circunstancia importante que se debe tener en cuentas es que algunos pacientes con AML pueden necesitar en el curso de su enfermedad de un allo-HSCT. Encontrar mutaciones germinales puede alterar el planteamiento de este tratamiento. Los tratamientos de acondicionamiento en ocasiones precisan ser ajustados

La presencia de una variante germinal no implica necesariamente la necesidad de llevar a cabo un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Este es el caso de pacientes con mutaciones germinales de CEBPA donde no se recomienda el trasplante en la primera remisión, porque pueden experimentar largos tiempos de remisión a pesar de que el riesgo de recaída es alto, por lo que el trasplante puede plantearse más tarde en estos pacientes. En cambio, en pacientes con síndromes con alto riesgo de desarrollo de neoplasias mieloides como aquellos asociados a variantes en RUNX1 podría considerarse un trasplante alogénico precoz para evitar la transformación y disminuir la mortalidad por otras manifestaciones, sobre todo en familias con varios miembros afectados de neoplasias. Además, es importante abstenerse de utilizar como donantes a familiares afectados o portadores asintomáticos para evitar fracasos del injerto y/o el desarrollo de leucemia derivada del donante. Por esto, se recomienda encarecidamente el consejo genético previo a los estudios de viabilidad y la determinación de este tipo de mutaciones en todos los donantes, sean o no familiares. En familias con historia sugestiva de enfermedad germinal, pero sin alteración demostrable también se prefiere el uso de donantes no relacionados que familiares asintomáticos. En estos pacientes se recomienda un seguimiento más cercano postrasplante ya que presentan un riesgo aun mayor de disfunción orgánica y de desarrollo de tumores secundarios [91].

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE AML: A PROPÓSITO DE UN CASO PRÁCTICO

Actualmente, las distintas técnicas diagnósticas proporcionan diferentes puntos de vista, siendo la combinación de todas ellas es la única forma de tener una visión global de la enfermedad, elemento que tiene gran importancia desde el punto de vista clínico por su impacto en el diagnóstico, pronóstico e implicaciones terapéuticas. Para ver la aportación de cada una de las técnicas en el laboratorio actual, se presentará a continuación un caso clínico.

CASO.

Mujer de 27 años, con antecedente de síndrome de ovario poliquístico en tratamiento con ACO sin otros antecedentes personales o familiares de interés. A raíz de astenia intensa acude al hospital donde se le realiza un hemograma, objetivándose hiperleucocitosis. En la revisión del frotis sanguíneo se detecta presencia de numerosos blastos en sangre periférica. Por este motivo, se indica un estudio de BM. En el aspirado de BM se detectó un aumento células blásticas de características monoblásticas, con

abundantes mitosis, cromatina laxa, sin granulación y sin bastones de Auer. con disminución de precursores hematopoyéticos (*Tabla 7.1*).

Se trató a la paciente con quimioterapia de inducción con esquema 3+7 (esquema de inducción básico con citarabina durante 7 días y daunorrubicina/idarrubicina durante los 3 primeros días) junto con midostaurina (inhibidor de FLT3). En primera remisión completa, pero con presencia de MRD en BM (0.7%) se realiza en marzo/2019 allo-HSCT de familiar haploidéntico (padre). Cinco meses más tarde se detecta recaída precoz con persistencia del reordenamiento de KMT2A, pero sin detección de FLT3-ITD, que es tratada con decitabina y venetoclax (inhibidor de Bcl-2) sin respuesta (*Tabla 7.2*).

En octubre/2019 se realiza un segundo allo-HSCT de donante no emparentado, obteniéndose remisión completa, pero con persistencia de MRD en los controles de biopsia de BM realizados postrasplante. Por alto riesgo de recaída de enfermedad se decide realizar infusión de linfocitos del donante con el propósito de controlar la enfermedad mediante efecto injerto contra huésped. Un año más tarde, en octubre/2020 en un control se detecta recaída incipiente de la enfermedad, por lo que se realiza tratamiento con gentuzumab (anticuerpo monoclonal dirigido contra CD33). En diciembre/2020 se observa remisión completa morfológica, pero con MRD persistente (0.12%).

Como parte de la introducción del caso también cabe señalar que los síntomas y signos de presentación de una AML son muy inespecíficos, siendo los hallazgos clínicos más frecuentes: fatiga, debilidad, palidez cutánea, equimosis o petequias y gingivorragias, entre otros. Los hallazgos analíticos son también inespecíficos, encontrándose: pancitopenia (anemia, plaquetopenia y leucopenia), acidosis láctica, hiponatremia, etc. Pero comunes en cualquier tipo de neoplasia, siendo útiles a la hora de sospechar malignidad, pero sin utilidad en el manejo diagnóstico o pronóstico, siendo por ello necesaria la aplicación de las diversas técnicas previamente descritas, dado que cada una nos aporta distinta información de suma relevancia.

Morfología

El estudio morfológico de BM reveló la presencia de una marcada hiper celularidad a expensas de población blástica que representaba un 94% de la celularidad de la BM. Siendo la mayor parte blastos con características monoblásticas. La citoquímica (α -naftil estera y peroxidasa) confirmó la diferenciación y fenotipo monocítico.

También permitió al diagnóstico hacer una primera orientación del caso, ya que nos permite diferenciar entre las dos estirpes principales, linfoide o mieloide, y descartar la presencia de displasia acompañante, lo que dirige el posterior estudio genético, aproximación que resulta altamente coste-eficiente.

En algunos otros subtipos como la APL de patrón morfológico y citoquímico característico, aun se puede acotar más el estudio genético, estableciendo los paneles de FISH y NGS a utilizar. Sin embargo, la clasificación morfológica en este caso concreto no permite en si misma dentro de las neoplasias mieloides establecer la estratificación pronóstica ni establecer el esquema terapéutico a medio, largo e incluso corto plazo,

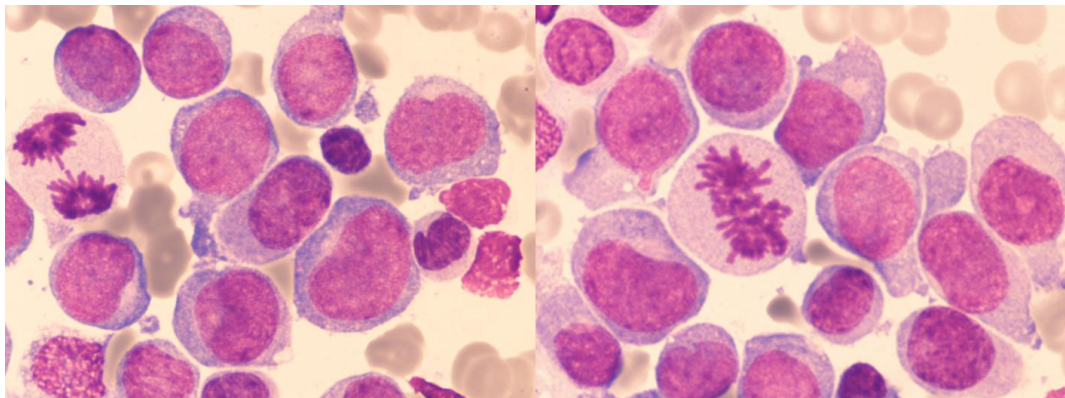
TÉCNICA	SUBTÉCNICA	DIAGNOSTICO	POST	TRAS PRIMERA	TRAS SEGUNDA	1 MES POST	3 MES		PENDIENTE	4º MES	10º MES	LMA CONTROL
			INDUCCIÓN 3+7	CONSOLIDACIÓN	CONSOLIDACIÓN	ALLO-HSCT	POST ALO		SEGUNDO ALO	2 ALO	TRAS 2 DOSIS GEMTUZUMAB	
MORFOLOGIA	MAY GRUNWALD GIEMSA	10/2018 Marcada hipercelularidad a expensas de población blástica que representa un 94% de la celularidad. Blastos de hábito monoblastico en su mayoría, un 12.6% promonocitos: tamaño medio o grande, cromatina laxa con nucleolos en ocasiones múltiples, pero poco prominentes, citoplasma amplio con basofilia variable, frecuentes microvacuolas, la mayoría sin granulación; no bastones de Auer; reborde celular a veces irregular con fenómeno de clasmatosis. Abundantes mitosis. Precursores hemopoyéticos muy escasos: se observan aislados megacariocitos, eritroblastos y serie neutrófila/eosinófila; aunque son escasos para una correcta valoración morfológica solo los eritroblastos presentan en ocasiones rasgos diseritropoyéticos (núcleos multilobulados). Hemograma: leucocitos 223.600/ul, Hb 8.5 g/dl, plaquetas 20.000/ul. Blastos 95%, os 1,5%). Segmentados 0.5%, Linfocitos 4%, Eosinófilos 0.5%. Hiperleucocitosis a expensas de blastos de hábito monocítico (mayor porcentaje de promonocitos que en médula ósea). Anisocitosis, poiquilocitos con dacriocitos, punteado basófilo y ocasionales eritroblastos circulantes. Trombopenia severa. Algunas de las micropartículas parecen fragmentos citoplasmáticos de los blastos.	11/2018 Médula normocelular ar. Hipoplasia marcada de la serie eritroide. Remisión completa morfológica (blastos + promonocit os 1,5%).	12/2018	01/2019	02/2019 Remisión completa morfológica (2% blastos) con recuperación hematológica incompleta.	04/2019 Médula normocelular en remisión completa (blastos + promonocit os 1.5%). Monocitosis . Aumento de hematogonias.	06/2019	08/2019 Médula normocelular infiltrada por población blástica que representa el 69% de la celularidad global, la mayoría de hábito monoblastico (escasos promonocitos): talla grande, núcleo redondeado con cromatina laxa, algunos con nucleolos, citoplasma amplio, basofilia moderada, en general sin granulación y ausencia de bastones de Auer, frecuentes mamelones citoplasmáticos y ocasionales pseudópodos; una minoría de tamaño pequeño y citoplasma escaso. Megacariocitos disminuidos. Frecuentes osteoclastos. Serie eritroide escasa (10%) con diseritropoyesis discreta. Serie granulocítica también desplazada (11% aproximadamente) en todos los estadios madurativos. Linfocitos y plasmáticas escasos, morfología normal. Leve aumento de macrófagos	09/2019 Médula ósea hipocelular r. Marcada infiltración por células blásticas (>45%).	10/2019	12/2020 Aspirado medular en recaída morfológica (blastos 11,2%).
		Positividad difusa en aproximadamente el 50% de los blastos		NA		Peroxidasa: negativa (positividad muy débil en menos del 1% de blastos) (Foto).						
	MORFOLOGIA	ANAE	Negativa en blastos. NA									
MORFOLOGIA	PEROXIDASA	ANAE: negativa en blastos (aisladas células positivas, la mayoría histiocitos/macrófagos).										
INMUNOFENOTIPO		- 95,4% población CD34 atípica con diferenciación monocítica, que incluye: * 19,9% subpoblación más inmadura, con CD45/SSC de blasto (y mayor) y con el siguiente inmunofenotipo: - Expresión alta de CD33, media de CD38 y CD64, débil-media de CD4 y HLA-DR, y débil de CD71 y CD117. - Expresión parcial débil de CD11b (53%), CD13 (63%), CD15 (32%), CD25 (41%), CD65 (49%) y CD105 (68%). - Ausencia de expresión de cMPO, nTdT, cCD3, cCD79A, cIgM, CD2, CD7, CD10, CD14, CD16, CD35, CD36, CD41, CD56, CD61, CD123, CD203c, 7.1 e IREM2. * 75,5% subpoblación más madura, hacia región de monocitos y en cuyo inmunofenotipo, en relación con la subpoblación inmadura, destaca: - Expresión más baja de CD34, CD117 y HLA-DR. - Expresión más alta de CD4, CD11b y CD15. - Expresión alta de CD36. - Patrón de maduración atípico con CD14/IREM2:31,5% CD14-/IREM2-, 1,2% CD14+/IREM2-, 12,6% CD14+/IREM2+ y 29,7% CD14-/IREM2+.	EMR 0,08%. EMR Disminución0,035% de la eritropoyesis.	0,29% compatible con EMR.	EMR 0,55%.	EMR <0,01%. Aumento de precursores B.	EMR <0,01%	Recaída de Leucemia Mieloblástica Aguda (73% blastos), con inmunofenotipo similar al diagnóstico.		49,2% de células CD34 leucémicas en aspirado medular hipocelular r.	-Recaída leucemia aguda mieloide (9.63% blastos).	EMR 0,12% (estudio muy similar al previo).

Tabla 7.1. Información obtenida en el caso a través de cada tipo de técnica. Cedita por el laboratorio de hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

		DIAGNOSTICO	POST INDUCCIÓN 3+7	TRAS PRIMERA CONSOLIDACIÓN	TRAS SEGUNDA CONSOLIDACIÓN	1 MES POST ALLO-HSCT	3 MES POST ALO				PENDIENTE SEGUNDO ALO	4º MES 2 ALO	10º MES	AML CONTROL TRAS 2 DOSIS GEMTUZUMAB
		10/2018	11/2018	12/2018	01/2019	02/2019	04/2019	06/2019	08/2019	09/2019	10/2019			12/2020
CARIOTIPO		46,XX,del(11)(q23)[20]	46,XX[4]	NO VALORABLE	NO VALORABLE	46,XX[20]			46,XX,t(6;11)(q27;q23)[9]/46,X11)(q27;q23)[11]/46,XY[3]				46,XX[16]	
FISH	MLL (11q23) BREAK APART PROBE	nuc ish(KMT2Ax2) (5'KMT2A sep 3' KMT2Ax1)[99/100]-->REORDENADO	NO REORDENADO	nuc ish(KMT2Ax2) (5'KMT2A sep 3' KMT2Ax1)[1/200]-->REORDENADO	NO VALORABLE	nuc ish(KMT2Ax2) (5'KMT2A sep 3' KMT2Ax1)[2/250]-->REORDENADO	NO REORDENADO	NO REORDENADO					nuc ish(KMT2Ax2) (5'KMT2A sep 3' KMT2Ax1)[11/200]-->REORDENADO	
RT- PCR SEMICUANTITATIVA	FLT3 ITD	POSITIVA			NEGATIVO (**TECNICA DE BAJA SENSIBILIDAD)	NEGATIVO (**TECNICA DE BAJA SENSIBILIDAD)	NEGATIVO (**TECNICA DE BAJA SENSIBILIDAD)	NEGATIVO (**TECNICA DE BAJA SENSIBILIDAD)	NEGATIVO (**TECNICA DE BAJA SENSIBILIDAD)	NEGATIVA	NEGATIVA			
QRT-PCR	NPM1a (RATIO NORMALIZADO)	0.16645 (<1; SUBCLONAL)	NEG	NEG										
NGS panel a partir del ADN extraído de la muestra de médula ósea se ha realizado el análisis de secuenciación masiva (NGS) empleado tecnología Ion Torrent OncoPrint con una cobertura media de 1000x y una uniformidad >95% utilizado el panel de genes OncoPrint Myeloid Assay. Se han analizado los hotspots de los genes: ABL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, FLT3, GATA2, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NPM1, SETBP1, SF3B1, RSF2, U2AF1, WT1, NRAS, PTPN11, los genes AL completo ASXL1, BCOR, CALR, CEBPA, ETV6, EZH2, IKZF1, NF1, PHF6, PRPF8, RB1, RUNX1, SH2B3, STAG2, TET2, TP53, ZRSR y reordenamientos de los genes: ABL1, ALK, BCL2, BRAF, CCND1, CREBBP, EGFR, ETV6, FGFR1, FGFR2, FUS, HMGA2, JAK2, KMT2A (MLL), MECOM, MET, MLLT10, MLLT3, MYBL1, MYH11, NTRK3, NUP214, PDGFRA, PDGFRB, RARA, RBM15, RUNX1, TCF3, TFE3, sobreexpresión de los genes BAALC, MECOM, MYC, SMC1A, WT1. Para el análisis de variantes se ha utilizado el software Ion Reporter. Se han aplicado filtros para eliminar variantes intrónicas, (aunque si se han evaluado regiones de splicing flanqueantes al exón), variantes sinónimas, y variantes con elevada frecuencia en la población (maf>1%) ya que se consideran variantes polimórficas sin significado clínico	RNA	KMT2A::AFDN							KMT2A::AFDN					
	DNA	FLT3 ITD; c.1804_1805insGCTCCTCAGATA-ATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATA-TGAATATGATC-TCA;p.Leu601_Lys602insSer-SerSerAspAsnGluTyrPhETyrValAspPheArgGlu-TyrGluTyrAspLeu; (VAF 65%)							NO MUTACIÓN				NO MUTACIÓN	

Tabla 7.2. Información obtenida en el caso a través de cada tipo de técnica. Cedida por el laboratorio de hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

debido a que, en los distintos tratamientos, incluyéndose el de inducción, además de la quimioterapia pueden añadirse fármacos contra dianas moleculares conocidas como sucede en el caso.



En las dos imágenes anteriores podemos ver dos imágenes del mielograma del caso. En ambas imágenes vemos blastos con cromatina dispersa, presencia de algunos nucleolos y con citoplasma amplio con basofilia variable, también se observa una mitosis en cada imagen. Cedido por el laboratorio de hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

En este caso, las alteraciones morfológicas pueden ayudarnos a distinguir entre la estirpe celular afectada (mieloide o linfoide), pero las alteraciones morfológicas no nos permiten sospechar la alteración genética subyacente, t(6;11)(q27;q23) .

En el seguimiento de la paciente, los hemogramas y controles medulares conjuntamente con la citomorfología, permiten sospechar y detectar recaídas ante la detección de células en el frotis. Sin embargo, en ningún caso permiten hacer una monitorización de la MRD lo suficientemente precisa, para lo cual es necesario que los estudios morfológicos se acompañen de estudios fenotípicos y citogenético-moleculares.

Inmunofenotipado

La citometría de flujo aplicando fluorocromos, haciendo combinaciones de 10 fluorocromos permitió confirmar la presencia de células blásticas inmaduras de patrón monocitoide, pero de maduración atípica.

MONOCLONALES UTILIZADOS:

	FICT	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AF700	AF750	P. BLUE	KROME	DESCRIP
Tubo 1	-----	-----	CD19	CD33	-----	-----	CD34	CD71	-----	CD45	(MÁGICO)
Tubo 2	_nTDT	CMPO	CD19	cCD79a	cCD3	CD7	CD34	CD71	cIGM	CD45	(INTRAS)
Tubo 3	_CD11b	CD13	CD56	-----	CD10	CD117	CD34	CD16	CD15	CD45	(LAM TUBO 1)
Tubo 4	_CD35	IREM2	CD64	CD33	-----	CD117	CD34	CD14	HLADR	CD45	(LAM UBO 2)
Tubo 5	_CD38	CD105	CD41	-----	CD61	CD117	CD34	CD71	CD36	CD45	(LAM TUBO 3)
Tubo 6	_CD2	7.1(N2)	-----	CD4	-----	CD117	CD34	CD25	HLADR	CD45	(LAM TUBO 4)
Tubo 7	_CD65	CD203c	CD7	-----	CD123	CD117	CD34	-----	HLADR	CD45	(LAM TUBO 5)

En imagen anterior podemos ver los distintos fluorocromos examinados en cada tipo de tubo en el citómetro de flujo. Imagen cedida por el laboratorio de hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Por tanto, adición de la citometría de flujo nos permite caracterizar y cuantificar las distintas subpoblaciones según su expresión antigénica, conocer el grado de diferenciación celular y la detección de fenotipos aberrantes. Además, de forma similar al estudio morfológico, nos permite diferenciar las distintas poblaciones y cuantificarlas, orientando el estudio hacia estirpe mieloide.

Esta caracterización es de especial utilidad cuando el fenotipo es aberrante en comparación con las células normales, como sucede en el caso, ya que permite la monitorización de la MRD con un alto nivel de sensibilidad, permitiendo detectar las recaídas en estadios precoces. Para ello se aplican estudios de monitorización

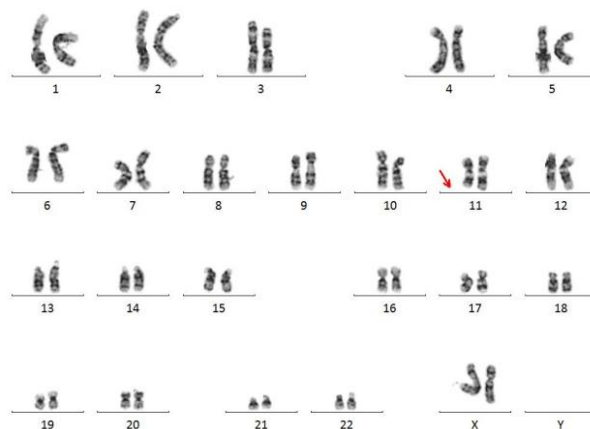
periódicos. En nuestra paciente, la citometría permitió revelar altas tasas de MRD post-tratamiento y basado en estos estos hallazgos la paciente fue sometida a distintas acciones terapéuticas.

En ocasiones, la expresión de ciertos marcadores puede orientar a la presencia de determinadas anomalías moleculares o incluso orientar a la respuesta a ciertos tratamientos. Por ejemplo, esta paciente presentaba baja expresión de CD34 que se relaciona con un aumento significativo de la expresión de genes relacionados con la proliferación y apoptosis celular, lo que se asocia a una mayor sensibilidad a inhibidores de BCL2 como venetoclax [95]. También presentaba, una alta expresión de CD33 en una determinada subpoblación por lo que se aplicó como tratamiento gentuzumab.

Además, actualmente es una de las técnicas más utilizadas en el seguimiento de la MRD. En este caso en octubre/2019 se detectan blastos en BM cuando la paciente parecía estar en remisión completa, cuando la paciente parece estar en remisión completa, pero se detectan blastos en BM postrasplante. Gracias a esto se decidió aplicar tratamientos con intención de disminuir el riesgo de recaída, en el caso, la infusión de linfocitos de donante.

Cariotipo y FISH

La citogenética en esta paciente permitió detectar la presencia de una alteración en el cromosoma 11.

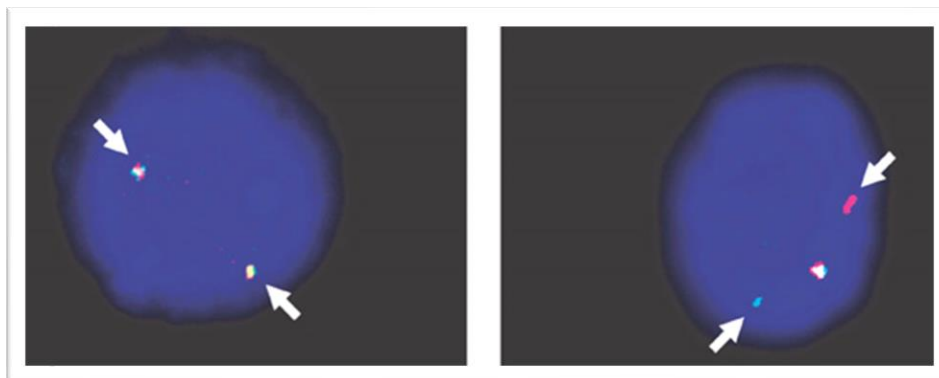


En imagen anterior podemos ver el cariotipo que se obtuvo en este caso. El cariotipo revelo una anomalía del cromosoma 11. Cedita por el laboratorio de hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

La mala morfología cromosómica de la muestra de diagnóstico no permitió en primera estancia detectar el *partner* involucrado. Sin embargo, la mejor morfología obtenida en estudios posteriores, así como el estudio de las reorganizaciones de KMT2A con un amplio panel de reorganizaciones mediante NGS permitió caracterizar el *partner*.

El hallazgo de esta anomalía permite hacer una primera clasificación del pronóstico de la enfermedad, incluyendo a la paciente en el grupo de mal pronóstico. Esto es debido a que estudios de pacientes con AML y esta traslocación, independientemente del fenotipo o morfología, asociaban este reordenamiento a un mal pronóstico con los tratamientos quimioterápicos convencionales, siendo imperativa la búsqueda de nuevos tratamientos.

En la AML con reordenamientos de KMT2A, es importante conocer el *partner* porque dependiendo de con que gen se haya traslocado KMT2A el pronóstico cambia, aunque generalmente el pronóstico es malo o intermedio [96]. En este caso, se encuentra t(6;11)(q27;q23), que da lugar a la fusión entre KMT2A y AFDN (previamente conocido como MLLT4 y AF6) [97]. *KMT2A::AFDN* es una anomalía recogida en las distintas clasificaciones puesto que se relaciona con mal pronóstico relacionado con una baja tasa de respuesta a tratamiento citotóxico, por lo que el allo-HSCT es una terapia que considerar en estos pacientes [98,99].



En imagen anterior podemos ver dos fotos de técnica FISH con sondas de ruptura. Las sondas roja y verde se colocan en ambos extremos de KMT2A. En la primera imagen (izquierda), podemos ver como las sondas contactan entre sí en ambos alelos, mientras que en la segunda imagen (derecha) podemos ver un alelo en el que las sondas están unidas y otro en el que se separan, implicando la existencia de una traslocación de KMT2A. Cedita por el laboratorio de hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

La FISH se considera técnica *gold standard* para la detección de reordenamientos de KMT2A. Comúnmente se usan sondas de ruptura *break apart*, permitiendo detectar los reordenamientos de KMT2A con una alta sensibilidad (hasta el 90%) [45].

KMT2A es un gen localizado en el cromosoma 11q23, siendo sus reordenamientos una de las aberraciones cromosómicas más frecuentes en la AML, pudiendo encontrarse en hasta un 10% de todas las leucemias. KMT2A puede translocarse y fusionarse con más de 100 genes *partner* (Anexo IV), aunque la mayor parte de las leucemias con KMT2A son el resultado de la fusión con los seis *partners* más frecuentes. Las translocaciones de KMT2A pueden encontrarse en aproximadamente un 10% de todas las leucemias. También se relacionan con tratamientos previos, sobre todo con los inhibidores de la topoisomerasa II (por ejemplo, daunorubicina) [45,100].

A pesar de todo esto, la FISH no es una técnica costo-eficiente para determinar el *partner* de la traslocación ya que necesitaríamos utilizar paneles con un número de sondas complementarias muy elevado, debido a que KMT2A presenta múltiples genes *partner*. Para solucionar esto, se pueden aplicar técnicas como la NGS o el OGM.

PCR

En esta paciente, se aplicó un panel dirigido de PCR a la búsqueda de las anomalías moleculares más frecuente y con mayor impacto en la estratificación pronóstica de una forma rápida y sencilla.

La RT-qPCR reveló la presencia de una mutación NPM1, pero en un porcentaje subclonal. Este tipo de hallazgos son frecuentes, y no parecen tener un valor pronóstico significativo.

Así mismo, la PCR detectó en este caso, una mutación en FLT3-ITD. FLT3 es un gen que codifica para una tirosina quinasa transmembrana normalmente expresada por los precursores hematopoyéticos cuya activación estimula la proliferación celular. Existen dos tipos principales de mutaciones en este gen, la duplicación interna en tándem (FLT3-ITD), y las mutaciones puntuales del dominio quinasa (FLT3-TKD). La consecuencia de ambas es la misma, la activación constitutiva del receptor en ausencia de ligando, induciendo la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis por activación de una cascada de señalización. Estas mutaciones son relativamente frecuentes, encontrándose en 10% de la población pediátrica y en un 30% de adultos con AML. En especial, la mutación ITD se asocia a un pronóstico muy desfavorable por su alta tasa de recaídas con los tratamientos estándar, y es en sí misma criterio para asociar inhibidores específicos contra dicha molécula tanto al tratamiento estándar como posteriormente durante a consolidación de respuesta con allo-HSCT. Las mutaciones ITD se relacionan característicamente con hiperleucocitosis y en la mayoría de los casos están asociadas a un cariotipo normal. La asociación descrita en este caso no es frecuente, pero probablemente explique el carácter hiperproliferativo y agresivo de la paciente.

En la *Tabla 7.2* podemos ver la evolución enfermedad con la desaparición de la mutación en FLT3 postratamiento específico, pasando de una frecuencia de variante alélica de 65% a ser indetectable, presumiblemente en respuesta al inhibidor de anti-FLT3, midostaurin.

Además, debido a su papel clave en la fisiopatología de la AML, presenta gran impacto pronóstico (generalmente mal pronóstico). La detección de estas mutaciones nos permite el uso de moléculas dirigidas contra estas, lo que teóricamente mejoraría la supervivencia. Se esperaba que la introducción de estas moléculas supusiera grandes cambios en la evolución de la enfermedad con menores tasas de toxicidad, sin embargo, debido a que la AML se trata de una enfermedad compuesta por múltiples subclones en constante evolución con distintos patrones de mutaciones genéticas, la aplicación de las moléculas dirigidas da lugar a una selección de los clones sin estas mutaciones. Es por tanto que a la hora de usar moléculas dirigidas deberíamos usar aquellas que tengan como diana las mutaciones driver de la enfermedad, lo que teóricamente permitiría acabar con todos (o la mayor parte) de los clones leucémicos, sin la posterior selección de otros subclones como sucede generalmente en la APL, donde la mutación driver es el objetivo del tratamiento (*PML::RARA*), consiguiéndose altas tasas de curación. En cambio, en nuestro caso vemos como se aplican a lo largo de la evolución de la enfermedad distintas moléculas dirigidas que, si son efectivas contra la subpoblación que presenta esa anomalía, pero que sin embargo no son útiles contra otros subclones por lo que existe una selección natural y estos proliferan, no teniendo las moléculas dirigidas un impacto muy significativo en la enfermedad.

También nos permite observar la respuesta a los distintos tratamientos utilizados, haciendo una cuantificación de los transcritos de interés. Por ejemplo, tras el allo-HSCT

podemos ver que existe respuesta parcial de algunos subclones con la desaparición de algunas mutaciones.

La PCR puede ser utilizada para monitorizar la respuesta. Aunque la monitorización del FLT3-ITD no se recomienda de forma aislada, por:

- Menor sensibilidad de la PCR utilizada para la detección de esta anomalía: PCR seguida de electroforesis capilar no siendo posible una monitorización por qPCR y no siendo viable por NGS por el elevadísimo coste que supondría.
- Por su carácter subclonal que puede despistar a la hora de detectar recaídas incipientes. Es este caso, por ejemplo, si nos hubiésemos guiado solo por FLT3, no conoceríamos la evolución verdadera de la enfermedad, ya que con la aplicación de moléculas dirigidas este clon desaparece, pero la enfermedad persiste.

La qPCR si constituye en este caso una técnica validada para monitorizar la MRD del reordenamiento de *KMT2A::AFDN*. No obstante, a diferencia de lo que ocurre con otras aberraciones como NPM1 o *PML::RARA* no existe en este caso unos puntos de corte bien establecidos para la monitorización de la MRD. El diseño de *primers* o sondas aleloespecíficas frente a las variantes patogénicas, que permitan monitorizar las anomalías driver o esenciales para el tumor mediante dPCR o qPCR se plantean como una alternativa interesante para la monitorización de estos pacientes. Sin embargo, esta estrategia requiere conocer las variantes driver y disponer de la posibilidad de monitorizarlas por las técnicas mencionadas. En nuestro caso, la monitorización más eficiente habría sido la medición de los niveles del transcrito *KMT2A::AFDN*. No obstante, no están claros los puntos de corte para el mismo. Además, esta estrategia tiene la desventaja de no ofrecer una visión global que permita detectar otras variantes de nueva aparición, que pueden ser importantes para el fenotipo y accionables.

NGS

La aproximación basada en multipaneles está siendo de gran ayuda para detectar múltiples aberraciones y reorganizaciones en un único estudio. La mayor sensibilidad con respecto al Sanger permite además detectar subclones de anomalías que pueden ser seleccionados con ciertos tratamientos. Esta aproximación multipanel no es sólo útil en el diagnóstico, sino que también resulta de utilidad en el seguimiento de las recaídas, permitiendo ver y entender la biología de la enfermedad. Los datos en esta paciente sugieren un primer evento temprano que es la adquisición del *KMT2A::AFDN* y la adquisición posterior de FLT3-ITD. Es interesante ver como los tratamientos aplicados en esta paciente muestran una eficacia elevada a la hora de erradicar los subclones portadores de ambas anomalías, pero resultan completamente ineficientes para de forma permanente erradicar el clon *KMT2A* principal, lo que sugiere que son necesarias nuevas estrategias dirigidas contra esa aberración para este tipo de pacientes, lo que va acorde a la literatura [101]. En nuestro caso, interpretando la NGS con respecto al resto de técnicas y evaluando la evolución global la evolución global es posible intuir que la alteración principal es el *KMT2A::AFDN* y la alteración FLT3-ITD pero no el clon iniciador FLT3 negativo que reaparece en las recaídas (*Tabla 7.2*). La NGS es por ello también útil en el estudio de recaídas para conocer la selección clonal y la eficacia a los tratamientos.

Sin embargo, la monitorización de la MRD por NGS no es viable actualmente al no ser coste eficiente. Aun así, es posible que con una mejora de las técnicas y con una reducción progresiva de los costes se convierta en un estándar, sobre todo para ciertas aberraciones [80].

En esencia, la MRD no deja de ser un umbral límite que se establece en relación con la sensibilidad de las pruebas que disponemos pero que no refleja la realidad biológica de la AML, ya que la no detección no implica la inexistencia [76].

Basándonos en la edad de la paciente y la frecuencia de las variables alélicas de algunas anomalías, podríamos sospechar un origen germinal. Dentro del estudio NGS que se ha llevado a cabo se incluyen algunos de los genes asociados a riesgo germinal, como es *RUNX1*. La ausencia de estos no excluye el que presente una variante en otro gen de los que actualmente se asocian a germinalidad. En casos como este, en los que la probabilidad de un origen germinal, debido a la edad y la ausencia de antecedentes justificativos para el desarrollo de la leucemia, estaría indicado y sería importante descartar la presencia de mutaciones germinales ya que si resultan positivas se condiciona nuestra actitud terapéutica y diagnóstica. Para esto, necesitaríamos hacer un panel de mutaciones germinales sobre una muestra de tejido somático de la paciente (pelo, piel, población en remisión o linfocitos T purificados), y si esto se confirma el estudio de familiares buscando las mutaciones detectadas.

Ante un allo-HSCT sería necesario realizar un estudio de las posibles mutaciones que presente el donante, estando especialmente indicado si el donante es familiar y en algunas guías se recomienda incluso en donantes no emparentados. La presencia de mutaciones germinales en familiares es adicionalmente de gran interés de cara al consejo genético.

DISCUSIÓN

En la historia de la AML hemos pasado de un diagnóstico basado únicamente en características morfológicas de la enfermedad a un diagnóstico que integra múltiples disciplinas, basándose en la morfología, citoquímica, inmunofenotipado, citogenética y, por último, en la genética molecular. Solo con la integración de los diferentes “puntos de vista” que ofrece cada técnica podemos hacer la correcta caracterización de cada caso, lo que actualmente tiene un gran impacto en la clínica, alterando el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad [102].

La morfología es el primer escalón diagnóstico, permite un análisis rápido de la enfermedad que ofrece la primera descripción de la enfermedad, permitiendo establecer cuáles son las pruebas diagnósticas necesarias y el objetivo de estas, favoreciendo así una aproximación costoefectiva de la enfermedad. Además, el análisis histológico permite diferenciar entre MDS y AML, y junto con el inmunofenotipado, la clasificación en el subgrupo de AML no especificada de otra manera [31,102].

Por otra parte, el inmunofenotipado permite una caracterización más detallada mediante la detección, caracterización y cuantificación de marcadores específicos y en ocasiones aberrantes de poblaciones permitiendo diferenciar a la población tumoral de

las células normales. De esta forma, podemos conocer el linaje celular al que pertenecen, el momento de diferenciación y cuantificar la expresión de antígenos de superficie. Esta técnica será además esencial en la monitorización de la MRD, de gran valor para la detección de recaídas precoces y para el enfoque terapéutico [102].

La citogenética comprende al cariotipo y la FISH. Estas técnicas permiten la detección de alteraciones en el número y estructura de los cromosomas, tanto en metafase (cariotipo y FISH) como en interfase (FISH). Aun así, entre estas dos técnicas existen diferencias fundamentales. Mientras que el cariotipo permite un análisis de todo el genoma, al observar los cromosomas completos, la FISH es una técnica dirigida y rápida. La gran utilidad de estas técnicas son la visión rápida y global que presenta el cariotipo en la estratificación en riesgos de la enfermedad y en la detección de clones, la evaluación de la respuesta y de la evolución clonal, y la capacidad de la FISH de informarnos sobre las traslocaciones y de los *partners* de estas [35,102].

El diagnóstico molecular, que comprende tanto a la PCR como a la NGS, es una disciplina que ha crecido rápidamente y se ha convertido en uno de los pilares básicos en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, al contribuir junto con la edad del paciente y sus comorbilidades, y resto de las técnicas, a hacer una mejor estratificación de pronóstico de la AML, pero sobre todo al aportar información relevante sobre la accionabilidad y el conocimiento de la biología de la enfermedad. Ya con la aparición de la clasificación de la WHO las características moleculares cobraron gran importancia, lo que sigue siendo una tendencia con la aparición de terapias dirigidas contra mutaciones concretas. Por esto, estas técnicas también han ganado peso a la hora de establecer el tratamiento óptimo de la enfermedad, así como de su pronóstico. Por un lado, la PCR permite ampliar de forma específica uno o varios genes diana de forma relativamente sencilla y rápida, mientras que la secuenciación masiva permite la secuenciación de cientos de muestras o loci distintos de forma simultánea. Esto permite en un solo ensayo el estudio de todos los genes conocidos asociados a la AML con relevancia diagnóstica y/o clínica, de uno o varios pacientes en la misma prueba, así como, permite la investigación de otros genes y la acumulación de conocimiento sobre estos, lo que puede tener implicación en el futuro manejo de la enfermedad [35,102].

Sin embargo, no es oro todo lo que reluce y las moléculas dirigidas no tienen un impacto tan importante en la evolución de la enfermedad como se esperaba. Esto tiene que ver con que muchas dianas terapéuticas actuales son mutaciones fruto de la inestabilidad genética propia del clon inicial, es decir, no se dirigen contra las mutaciones *driver* subyacentes que son el último responsable de la enfermedad, así como a la existencia de aberraciones que no conocemos en los genes no estudiados, fenómenos epigenéticos no explorados ni conocidos, mecanismos adicionales relacionados con el microambiente tumoral e incluso a diferente metabolización de los fármacos, posiblemente en relación con la farmacogenómica.

En el caso expuesto, podíamos ver como se utilizaban moléculas dirigidas contra FLT3-ITD como puede ser midostaurina, asociados a poliquimioterapia, con la consiguiente erradicación de los clones que presentaban esta mutación. Aun así, esta eliminación no evito la reaparición del clon originario principal portador del reordenamiento *KMT2A::AFDN* FLT3 negativo, refractario a este y otros tratamientos.

La constante persistencia de la traslocación t(6;11)(q27;q23) a lo largo de la enfermedad de la paciente orienta a que esta alteración es la responsable de la etiopatogenia del cuadro y de la formación de nuevos clones. Esto nos lleva a la conclusión de que si queremos alcanzar con otros subtipos de leucemias lo que se consiguió con la APL y los tratamientos dirigidos contra *PML::RARA*, son necesarios nuevas moléculas dirigidas contra estas mutaciones *driver* o contra vías de señalización que se encuentren por debajo en la cascada de señales de estas mutaciones.

Progresivamente con la integración de estas técnicas citogenético-moleculares va siendo posible aplicar una medicina personalizada, identificando aberraciones accionables cuya eliminación permite la erradicación del clon leucémico. Sin embargo, todavía existe gran desconocimiento del papel de muchas de las variantes encontradas. No es todavía posible establecer la actitud ante la coexistencia de varias variantes patogénicas accionables. Los ensayos clínicos siguen enfocados en su mayoría a estudios multipaciente y no a un enfoque más personalizado. Es un reto el análisis conjunto de la información obtenida de las diferentes técnicas y la introducción de la inteligencia artificial y del *Big Data* para la obtención de nuevos conocimientos y como herramienta para la asistencia en la consulta y clasificación de la información que se plantea como esencial. Aunque por falta de tiempo estos temas no se han podido incluir en el trabajo es de destacar que son temas en boga. La inteligencia artificial es de gran interés en el diagnóstico de distintas enfermedades hematológicas entre las que se encuentra la AML. Aportaría la capacidad de automatizar ciertos pasos del diagnóstico facilitando la interpretación de los datos y reduciendo los tiempos de respuesta de técnicas como la NGS. Sin embargo, es una tecnología todavía emergente y que necesita de un potente software y hardware para su realización.

Las nuevas técnicas como la dPCR y NGS, han mejorado no solo lo comentado anteriormente, sino que también la monitorización de la MRD, ya que estas pruebas permiten el estudio de muestras con una alta sensibilidad y especificidad. Actualmente, las dos técnicas más utilizadas con este fin son la citometría de flujo y la qPCR, aunque es posible que en el futuro la dPCR e incluso, en algunos casos, la NGS sustituyan la función de esta última, debido a que pueden alcanzar sensibilidades incluso más altas.

Resumiendo, la introducción de la clasificación de la WHO en 2001 produjo un cambio radical en el paradigma de la AML. Mientras que la FAB tenía una visión de la enfermedad que giraba en torno al fenotipo, la WHO ha conseguido unificar todas las disciplinas diagnósticas. Esta visión multidisciplinar permite un diagnóstico rápido de la enfermedad con técnicas como la citomorfología, la citoquímica y el inmunofenotipado (2-6 horas para el diagnóstico), que junto con las técnicas más potentes para determinar el pronóstico y clasificación (citogenética y técnicas moleculares), permiten la caracterización integral de la AML, dando lugar a un mayor conocimiento de esta [102].

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se han explicado las distintas funciones y utilidades de cada técnica, así como sus principales desventajas. En este apartado, se enumeran las conclusiones que se extraen de este trabajo.

1. La AML constituye un grupo de enfermedades heterogéneas. Los distintos subtipos se diferencian en la existencia de una o varias aberraciones, fenotípicas o citogenómicas.
2. Para la correcta orientación diagnóstica y pronóstica de la AML es necesaria la aplicación de múltiples técnicas fenotípicas y citogenómicas, que nos informan de las alteraciones fenotípicas y citogenómicas. Esto permite un diagnóstico más preciso de la enfermedad, con la clasificación en, cada vez más, subtipos de AML que presentan características más homogéneas en cuanto a pronóstico, respuesta al tratamiento y evolución de la enfermedad.
3. El uso secuencial e integrado de todas las técnicas no sólo permite un mejor diagnóstico, también favorece un uso eficiente de los recursos, dirigiendo y orientando el estudio a partir de las técnicas más básicas y rápidas.
4. La NGS es una tecnología que está aportando información muy relevante respecto a la complejidad genética de los diferentes subtipos de la AML, identificando nuevos grupos distintos caracterizado por mutaciones concretas, así como, la identificación de las neoplasias de origen germinal.
5. Las leucemias germinales representan un porcentaje importante de los pacientes con AML. Además, son un grupo de AML con características especiales en su manejo, alterando el pronóstico y tratamiento de los pacientes.
6. Aunque vamos incorporando estrategias de medicina personalizada, todavía precisa de un largo recorrido. El paradigma de esta en la hematología es la APL, lo cual requiere el reconocer las anomalías responsables de mantener el fenotipo de la enfermedad y disponer de tratamientos eficaces contra ellas.
7. Por lo anterior, es necesario la investigación y desarrollo de fármacos dirigidos contra las mutaciones driver de las AML, buscando dianas que se encuentren al menos por debajo de su cascada de señalización [101].
8. La introducción de la clasificación de la WHO no sólo integraba todas las técnicas en el diagnóstico, sino que supuso un cambio en el prisma con el que nos dirigíamos a la enfermedad, pasando de un enfoque exclusivamente fenotípico a uno basado en la integración de todas las técnicas, reconociendo la importancia de las alteraciones genética subyacentes en la AML.
9. Actualmente existen ciertas dificultades en la introducción de las técnicas más modernas en la rutina del diagnóstico de la AML, siendo la más importante su elevado coste, aunque también destacando otros como los mayores tiempos de respuesta o una interpretación de resultados más compleja y el disponer de información validada de muchas de las variantes que se detectan.

REFERENCIAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
2. Montesinos P, Gil A, Sierra J. Current status of acute myeloid leukaemia in Spain: Results from a Delphi study on its epidemiology, disease management and unmet clinical needs. *Medicina Clinica*. 2021;156(11).
3. Visser O, Trama A, Maynadié M, Stiller C, Marcos-Gragera R, de Angelis R, et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European Journal of Cancer*. 2012;48(17).
4. Marsà A, Ascanio M, Diaz-García J, Darbà J. Epidemiology, management, and economic impact of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in Spain at the hospital level: a claims database analysis. *Journal of Medical Economics*. 2020;23(12).
5. Mehdipour P, Santoro F, Minucci S. Epigenetic alterations in acute myeloid leukemias. *FEBS Journal*. 2015;282(9).
6. Arai Y, Chi S, Minami Y, Yanada M. FLT3-targeted treatment for acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology* [Internet]. 2022 May 9 [cited 2022 May 31]; Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12185-022-03374-0>
7. Levis M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood*. 2017;129(26).
8. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Vol. 115, *Blood*. 2010.
9. Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, et al. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: Results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(2).
10. Shah A, Andersson TML, Rachet B, Björkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *British Journal of Haematology*. 2013;162(4).
11. Creutzig U, Büchner T, Sauerland MC, Zimmermann M, Reinhardt D, Döhner H, et al. Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years: A common analysis of the pediatric trials AML-BFM 93/98 and the adult trials AMLCG 92/99 and AMLSG HD93/98A. *Cancer*. 2008;112(3).

12. Timilshina N, Breunis H, Brandwein JM, Minden MD, Gupta V, O'Neill S, et al. Do quality of life or physical function at diagnosis predict short-term outcomes during intensive chemotherapy in AML? *Annals of Oncology*. 2014;25(4).
13. Estey EH. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer*. 2001;92(5).
14. Kohlmann W, Schiffman JD. Discussing and managing hematologic germ line variants. Vol. 128, *Blood*. 2016.
15. Tallman MS. Acute myeloid leukemia; decided victories, disappointments, and detente: an historical perspective. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2008.
16. Hayhoe FGJ. Classification of acute leukaemias. *Blood Reviews*. 1988 Sep 1;2(3):186–93.
17. Salama ME, Hoffman R. Progress in the Classification of Hematopoietic and Lymphoid Neoplasms: Clinical Implications. In: *Hematology: Basic Principles and Practice*. 2018.
18. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M -T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4).
19. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Mendoza-García E, et al. Morphology of leukaemias. *Revista Médica del Hospital General de México*. 2016 Apr 1;79(2):107–13.
20. BENNETT JM. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. *Annals of Internal Medicine*. 1985;103(4).
21. Angelescu S, Berbec NM, Colita A, Barbu D, Lupu AR. Value of multifaced approach diagnosis and classification of acute leukemias. *Maedica*. 2012;7(3).
22. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Vol. 111, *Blood*. 2008.
23. Berman JN, Look AT. Pediatric Myeloid Leukemia, Myelodysplasia, and Myeloproliferative Disease. In: Nathan and Oski's *Hematology and Oncology of Infancy and Childhood*. 8th ed. Elsevier; 2015. p. 1555–613.
24. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 TRANSLOCATION, A CONSISTENT CHROMOSOMAL CHANGE IN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKAEMIA. Vol. 309, *The Lancet*. 1977.
25. Rowley JD, Testa JR. Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. *Advances in Cancer Research*. 1982;36(C).

26. Larson RA, Golomb HM, Rowley JD. Chromosome Changes in Hematologic Malignancies. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 1981;31(4).
27. Rowley JD. Cytogenetics in Clinical Medicine. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1969;207(5).
28. Nimer SD. Is it important to decipher the heterogeneity of “normal karyotype AML”? Vol. 21, Best Practice and Research: Clinical Haematology. 2008.
29. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Vol. 100, *Blood*. 2002.
30. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. Vol. 114, *Blood*. 2009.
31. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Vol. 127, *Blood*. 2016.
32. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013 May 30;368(22):2059–74.
33. O'Donnell EA, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter Flow Cytometry: Advances in High Resolution Analysis. *Immune Network*. 2013;13(2).
34. Rich RR. Técnicas básicas de laboratorio en inmunología clínica. 1st ed. Barcelona: Elsevier España; 2020. 93–111 p.
35. Batlle-López A, Costa D, Martínez-Laperche C, Anguita E, Espinet B, Buño I. *Genética Hematológica. Manual Práctico*. 1st ed. 2016.
36. A. Arber D. *Hematopathology*. 2nd ed. Filadelfia: Elsevier; 2017. 817–845 p.
37. Ramdial PK, Bastian BC, Goodlad J, McGrath JA, Lazar A. Specialized techniques in dermatopathology. In: *McKee's Pathology of the Skin*. 2012.
38. Veritasint.
39. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 24th ed. Banki K, Bluth MH, Bock JL, Bowne WB, Hutchison RE, Karcher DS, et al., editors. Filadelfia: Elsevier; 2022. 1441–1433 p.
40. Bain BJ, Béné MC. Morphological and Immunophenotypic Clues to the WHO Categories of Acute Myeloid Leukaemia. *Acta Haematologica*. 2019.
41. Najfeld V. Conventional and Molecular Cytogenomic Basis of Hematologic Malignancies. In: *Hematology: Basic Principles and Practice*. 2018.

42. Venugopal S, Mascarenhas J, Steensma DP. Loss of 5q in myeloid malignancies – A gain in understanding of biological and clinical consequences. Vol. 46, Blood Reviews. 2021.
43. Gibson CJ, Ebert BL, Steensma DP. Myelodysplastic Syndromes. In: Hematology: Basic Principles and Practice. 2018.
44. Campbell LJ. Fluorescence in situ hybridisation in acute myeloid leukaemia. Pathology. 2010;42.
45. van der Burg M, Beverloo HB, Langerak AW, Wijsman J, van Drunen E, Slater R, et al. Rapid and sensitive detection of all types of MLL gene translocations with a single FISH probe set. Leukemia. 1999;13(12).
46. Bednar M. DNA microarray technology and application. Medical Science Monitor. 2000;6(4).
47. de Jonge HJM, Huls G, de Bont ESJM. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia. The Netherlands Journal of Medicine. 2011 Apr;69:167–73.
48. Nolte FS, Hirschhorn JW, Hill CE. POLYMERASE CHAIN REACTION AND OTHER NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 2022. p. 1387–400.
49. Liquori A, Ibañez M, Sargas C, Sanz MÁ, Barragán E, Cervera J. Acute promyelocytic leukemia: A constellation of molecular events around a single PML-RARA fusion gene. Vol. 12, Cancers. 2020.
50. Gupta S, Yel L. Molecular Biology and Genetic Engineering. In: Middleton's Allergy: Principles and Practice. 9th ed. Elsevier; 2020. p. 154–75.
51. Panuzzo C, Jovanovski A, Ali MS, Cilloni D, Pergolizzi B. Revealing the Mysteries of Acute Myeloid Leukemia: From Quantitative PCR through Next-Generation Sequencing and Systemic Metabolomic Profiling. Vol. 11, Journal of Clinical Medicine. 2022.
52. Foroni L, Reid AG, Gerrard G, Toma S, Hing S. Análisis molecular y citogenético. In: Dacie y Lewis Hematología práctica. 12th ed. Elsevier; 2018. p. 126–64.
53. Larson RA. Remission criteria in acute myeloid leukemia and monitoring for residual disease. UpToDate. 2019;
54. He R, Oliveira JL, Hoyer JD, Viswanatha DS. Molecular Hematopathology. In: Hematopathology. 3rd ed. Elsevier; 2018. p. 712–60.
55. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. Scientific Reports. 2017;7(1).

56. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021;138(26).
57. Lindeman NI, Fletcher JA, Longtine JA. Application of Modern Techniques. In: *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 5th ed. Elsevier; 2021. p. 2288–310.
58. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, Andreani G, Dragani M, Fava C, et al. Digital PCR in myeloid malignancies: Ready to replace quantitative PCR? *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(9).
59. Voso MT, Ottone T, Lavorgna S, Venditti A, Maurillo L, Lo-Coco F, et al. MRD in AML: The Role of New Techniques. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. 2019.
60. Turnpenny PD, Ellard S, Cleaver R. Laboratory Techniques for Diagnosis of Monogenic Disorders. In: *Emery's Elements of Medical Genetics and Genomics*. 16th ed. Elsevier; 2022. p. 51–66.
61. Mao X, Liu C, Tong H, Chen Y, Liu K. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. Vol. 11, *American Journal of Translational Research*. 2019.
62. Basu AS. Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR. Vol. 22, *SLAS Technology*. 2017.
63. Belmont JW. Técnicas para el análisis del genoma. In: *Técnicas básicas de laboratorio en inmunología clínica*. Elsevier; 2020. p. 93–111.
64. Elenitoba-Johnson KSJ, Lim MS, Bagg A. Molecular Diagnosis in Hematopathology. In: *Hematopathology*. 2nd ed. Elsevier; 2017. p. 69–104.
65. Ishige T, Itoga S, Matsushita K. Locked Nucleic Acid Technology for Highly Sensitive Detection of Somatic Mutations in Cancer. In: *Advances in Clinical Chemistry*. 2018.
66. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*. 2013;98(6).
67. Mestan KK, Ilkhanoff L, Mouli S, Lin S. Genomic sequencing in clinical trials. Vol. 9, *Journal of Translational Medicine*. 2011.
68. Yang F, Anekpuritanang T, Press RD. Clinical Utility of Next-Generation Sequencing in Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Diagnosis and Therapy*. 2020;24(1).
69. Alonso CM, Llop M, Sargas C, Pedrola L, Panadero J, Hervás D, et al. Clinical Utility of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia Diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2019;21(2).

70. Daver N, Venugopal S, Ravandi F. FLT3 mutated acute myeloid leukemia: 2021 treatment algorithm. Vol. 11, Blood Cancer Journal. 2021.
71. Sanders MA, Valk PJM. The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia. Vol. 20, Current Opinion in Hematology. 2013.
72. He R, Viswanatha DS. Molecular Diagnosis of Hematopoietic Neoplasms. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 24th ed. Elsevier; 2022. p. 1542–78.
73. Ghemlas I, Li H, Zlateska B, Klaassen R, Fernandez C v., Yanofsky RA, et al. Improving diagnostic precision, care and syndrome definitions using comprehensive next-generation sequencing for the inherited bone marrow failure syndromes. Journal of Medical Genetics. 2015;52(9).
74. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. New England Journal of Medicine. 2010 Dec 16;363(25):2424–33.
75. Calonje E, Brenn T, Lazar AJ, Billings SD. McKee's Pathology of the Skin. 5th ed. Elsevier; 2020. 32–52 p.
76. Bibault JE, Figeac M, Hélevaut N, Rodriguez C, Quief S, Sebda S, et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2015;6(26).
77. Vega-Garcia N, Benito R, Esperanza-Cebollada E, Llop M, Robledo C, Vicente-Garcés C, et al. Helpful criteria when implementing ngs panels in childhood lymphoblastic leukemia. Journal of Personalized Medicine. 2020;10(4).
78. Cho BC, Loong HHF, Tsai CM, Teo MLP, Kim HR, Lim SM, et al. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) in East Asia Using Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Clinical Practice. Current Oncology. 2022;29(3).
79. Prieto-Conde MI, Corchete LA, García-Álvarez M, Jiménez C, Medina A, Balanzategui A, et al. A New Next-Generation Sequencing Strategy for the Simultaneous Analysis of Mutations and Chromosomal Rearrangements at DNA Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. Journal of Molecular Diagnostics. 2020;22(1).
80. Levine RL, Valk PJM. Next-generation sequencing in the diagnosis and minimal residual disease assessment of acute myeloid leukemia. Haematologica. 2019;104(5).
81. Zhou Y, Ren M, Zhang P, Jiang D, Yao X, Luo Y, et al. Application of Nanopore Sequencing in the Detection of Foodborne Microorganisms. Nanomaterials (Basel). 2022 May 2;12(9).

82. Dremsek P, Schwarz T, Weil B, Malashka A, Laccone F, Neesen J. Optical genome mapping in routine human genetic diagnostics—its advantages and limitations. *Genes (Basel)*. 2021;12(12).
83. Suttorp J, Lühmann JL, Behrens YL, Göhring G, Steinemann D, Reinhardt D, et al. Optical Genome Mapping as a Diagnostic Tool in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 19;14(9).
84. Khan WA, Toledo DM. Applications of Optical Genome Mapping in Next-Generation Cytogenetics and Genomics. *Advances in Molecular Pathology*. 2021;4.
85. Appelbaum FR. Leucemias agudas en adultos. In: Abeloff *Oncología clínica*. 2020.
86. Vears DF, Niemiec E, Howard HC, Borry P. Analysis of VUS reporting, variant reinterpretation and recontact policies in clinical genomic sequencing consent forms. *European Journal of Human Genetics*. 2018;26(12).
87. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béne MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12).
88. Moreno C, Mora A. MRD in CLL: some answers, many questions. Vol. 138, *Blood*. 2021.
89. Kovach AE, Raca G, Bhojwani D, Wood BL. Next-Generation Sequencing for Measurable Residual Disease Assessment in Acute Leukemia. *Advances in Molecular Pathology*. 2021;4.
90. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. 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*. 2015;17(5).
91. Baliakas P, Tesi B, Wartiovaara-Kautto U, Stray-Pedersen A, Friis LS, Dybedal I, et al. Nordic Guidelines for Germline Predisposition to Myeloid Neoplasms in Adults: Recommendations for Genetic Diagnosis, Clinical Management and Follow-up. *Hemasphere*. 2019;3(6).
92. Rio-Machin A, Vulliamy T, Hug N, Walne A, Tawana K, Cardoso S, et al. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. *Nature Communications*. 2020;11(1).
93. Pollyea DA, Bixby D, Perl A, Bhatt VR, Altman JK, Appelbaum FR, et al. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021;19(1).
94. Bruneau J, Molina TJ. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. In 2020.

95. Mattes K, Gerritsen M, Folkerts H, Geugien M, van den Heuvel FA, Svendsen AF, et al. CD34+ acute myeloid leukemia cells with low levels of reactive oxygen species show increased expression of stemness genes and can be targeted by the BCL2 inhibitor venetoclax. Vol. 105, *Haematologica*. 2020.
96. Balgobind B v., Zwaan CM, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia. Vol. 25, *Leukemia*. 2011.
97. Huret JL. t(6;11)(q27;q23) KMT2A/AFDN. Vol. 22, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2018.
98. Blum W, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Rao KW, Pettenati MJ, et al. Adult de novo acute myeloid leukemia with t(6;11)(q27;q23): Results from cancer and leukemia group B study 8461 and review of the literature. Vol. 101, *Cancer*. 2004.
99. Tamai H, Yamaguchi H, Takahashi S, Tojo A, Hamaguchi H, Kobayashi T, et al. Treatment of adult AML with t(6;11)(q27;q23) by allogeneic hematopoietic SCT in the first CR. Vol. 42, *Bone Marrow Transplantation*. 2008.
100. Abel HJ, Al-Kateb H, Cottrell CE, Bredemeyer AJ, Pritchard CC, Grossmann AH, et al. Detection of gene rearrangements in targeted clinical next-generation sequencing. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2014;16(4).
101. Tsakaneli A, Williams O. Drug Repurposing for Targeting Acute Leukemia With KMT2A (MLL)—Gene Rearrangements. Vol. 12, *Frontiers in Pharmacology*. 2021.
102. Haferlach T, Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. Vol. 188, *British Journal of Haematology*. 2020.
103. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;32(2).
104. Arnaud B, Douet-Guilbert N, Morel F, le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, et al. Screening by fluorescence in situ hybridization for MLL status at diagnosis in 239 unselected patients with acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005;161(2).
105. Morrisette JJD, Bagg A. Acute myeloid leukemia: Conventional cytogenetics, FISH, and molecuolocentric methodologies. Vol. 31, *Clinics in Laboratory Medicine*. 2011.
106. Marschalek R. Classification of mixed-lineage leukemia fusion partners predicts additional cancer pathways. Vol. 36, *Annals of Laboratory Medicine*. Seoul National University; 2016. p. 85–100.

ANEXO I

Clasificación de la WHO 2001 – Primera edición [29]

AML con alteraciones genéticas recurrentes
AML con t(8;21)(q22;q22), (<i>AML1::ETO</i>)
AML con eosinófilos anómalos en BM e inv(16)(p13;q22) o t(16;16)p13;q22), (<i>CBFβ::MYH11</i>)
APL con t(15;17)(q22;q12),(<i>PML::RARA</i>) y sus variantes
AML con anomalías del 11q23 (<i>KMT2A</i> , antes <i>MLL</i>)
AML con displasia multilineal
Después de un MDS o MDS/enfermedad mieloproliferativa (MPD)
Sin antecedentes de MDS o MDS/MPD, pero con displasia en al menos un 50% de las células o en 2 o más linajes mieloides
AML y MDS relacionados con la terapia
Tipo relacionado con agentes alquilantes o radiación
Tipo relacionado con inhibidores de la topoisomerasa II (algunos pueden ser linfoides)
Otros
AML no especificada de otra manera
AML mínimamente diferenciada
AML sin maduración
AML con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/monocítica aguda
Leucemia eritroide aguda (eritroide/mieloide o eritroleucemia pura)
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielosis con mielofibrosis aguda
Sarcoma mieloide

ANEXO II

Clasificación de la WHO 2008 – Segunda edición [30]

AML y neoplasias relacionadas
AML con alteraciones genéticas recurrentes
AML con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
AML con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB::MYH11</i>
AML con t(15;17)(q22;q12); <i>PML::RARA</i>
AML con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3::KMT2A</i>
AML con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK::NUP214</i>
AML con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1::EVI1</i>
AML (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15::MKL1</i>
<i>Entidad provisional: AML con NPM1 mutado</i>
<i>Entidad provisional: AML con CEBPA mutado</i>
AML con cambios relacionados con mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas con terapia
AML no especificada de otra manera
AML con maduración mínima
AML sin maduración
AML con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monocítica/monoblástica aguda
Leucemia eritroide aguda
Leucemia eritroide pura
Eritroleucemia, eritroide/mieloide
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down
Mielopoiesis anormal transitoria
Leucemia mieloide asociada al síndrome de Down
Neoplasia de células dendríticas blásticas plasmocitoides

ANEXO III

Clasificación de la WHO 2016 – Tercera edición [31].

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

ANEXO IV

Tabla que recoge el recombinoma de KMT2A [103].

Cytogenetic abnormality		Breakpoint	Partner	References	Leukemia type
A. MLL fusion in-frame					
1	t(1;11)(p32;q23)	1p32	EPS15/AF1P	Bernard et al. (1994)	ALL, BAL, AML, CML
2	t(1;11)(q21;q23)	1q21	MLLT11/AF1Q	Tse et al. (1995)	AML, t-AML, ALL, t-ALL, BAL
3	t(2;11)(p23.3;q23)	2q23.3	ASXL2	Haferlach et al. (2016)	t-AML
4	ins(2;11)(q11.2;q23)	2q11.2	AFF3/LAF4	von Bergh et al. (2003)	ALL
5	t(2;11)(q33;q23)	2q33	ABI2	Coenen et al. (2012)	AML
6	t(2;11)(q37;q23)	2q37	SEPT2	Cerveira et al. (2006)	t-AML, AML, t-MDS
7	t(2;11)(q37.1;q23)	2q37.1	GIGYF2	Not published yet	ALL
8	t(3;11)(p21;q23)	3p21	NCKIPSD/AF3P21	Sano et al. (2000)	t-AML
9	t(3;11)(p21.1;q23)	3p21.1	DCP1A	Meyer et al. (2008)	ALL, AML
10	t(3;11)(q13.13;q23)	3q13.13	KIAS1524	Coenen et al. (2011)	AML
11	t(3;11)(q24;q23)	3q24	GMPS	Pegram et al. (2000)	t-AML, t-MDS
12	t(3;11)(q28;q23)	3q28	LPP	Daheron et al. (2001)	t-AML
13	t(4;11)(p14;q23)	4p14	PDS5A	Meyer et al. (2011)	t-AML, AML
14	t(4;11)(p11;q23)	4p11	FRYL	Hayette et al. (2006)	t-ALL, t-AML, t-MDS
15	t(4;11)(q21.1;q23)	4q21.1	SEPT11/FLJ10849	Kojima et al. (2004)	T-ALL, CML, t-ALL, t-AML
16	t(4;11)(q21;q23)	4q21	AF4/AFF1	Gu et al. (1992)	ALL, t-ALL, BAL, AML
17	t(4;11)(q35.1;q23)	4q35.1	SORBS2/ARGBP2	Pession et al. (2006)	AML
18	t(5;11)(q12.1;q23)	5q12.1	KIF2A	Not published yet	ALL
19	complex abnormalities	5q12.3	CENPK/FKSG14	Taki et al. (1996)	AML
20	t(5;11)(q23.2;q23)	5q23.2	PRRC1	Douet-Guilbert et al. (2014)	t-ALL
21	ins(5;11)(q31;q13q23)	5q31	AFF4/AF5Q31	Taki et al. (1999)	ALL

22	t(5;11)(q31;q23)	5q31	ARHGAP26/GRAF	Borkhardt et al. (2000)	JMML
23	t(6;11)(q13;q23)	6q13	SMAP1		AML
24	t(6;11)(q15;q23)	6q15	CASP8AP2	Park et al. (2009)	AML
25	t(6;11)(q21;q23)	6q21	FOXO3/AF6Q21	Hillion et al. (1997)	t-AML, t-ALL
26	t(6;11)(q27;q23)	6q27	MLLT4/AF6	Prasad et al. (1993)	T-ALL, AML, t-AML, ALL
27	t(7;11)(p22.1;q23)	7p22.1	TNRC18/KIAS1856	Meyer et al. (2008)	T-ALL, ALL
28	t(7;11)(q11.23;q23)	7q11.23	CLIP2	Not published yet	B-ALL
29	t(7;11)(q21.12;q23)	7q21.12	RUNDC3B		T-ALL
30	t(7;11)(q32.1;q23)	7q32.1	FLNC	Haferlach et al. (2016)	t-AML
31	t(9;11)(p13;q23)	9p13	CLTA	Not published yet	ALL
32	t(9;11)(p22;q23)	9p22	MLLT3/AF9	Nakamura et al. (1993)	AML, t-AML, ALL, T-ALL, BAL
33	t(9;11)(q33.2;q23)	9q33.2	DAB2IP/AF9Q34	von Bergh et al. (2004)	AML
34	t(9;11)(q34.11;q23)	9q34.11	RABGAP1	Not published yet	ALL
35	ins(11;9)(q23;q34)inv(11)(q13)(q23)	9q34	FNBP1/FBP17	Fuchs et al. (2001)	AML
36	t(9;11)(q34.12;q23)	9q34.12	LAMC3		t-AML
37	ins(10;11)(p12;q23)	10p12	NEBL	Cóser et al. (2010)	AML
38	ins(10;11)(p12;q23q13)	10p12	MLLT10/AF10	Chaplin et al. (1995)	AML, t-AML, ALL, T-ALL, BAL
39	t(10;11)(p11.2;q23)	10p11.2	ABI1	Taki et al. (1998)	AML
40	t(10;11)(q21;q23)	10q21	TET1/LCX	Ono et al. (2002)	AML, ALL
41	inv(11)(p15.3q23)	11p15.3	NRIP3		AML
42	inv(11)(q12.1q23)	11q12.1	BTBD18	Alonso et al. (2012)	ALL
43	inv(11)(q12.2q23)	11q12.2	PRPF19		ALL
44	t(11;11)(q13.4;q23)	11q13.4	ARHGEF17	Teuffel et al. (2005)	AML
45	inv(11)(q13.4q23)	11q13.4	C2CD3		AML
46	inv(11)(q14q23)	11q14	PICALM/CALM	Wechsler et al. (2003)	AML, ALL
47	inv(11)(q21q23)	11q21	MAML2		T-ALL, t-T-ALL, t-AML, t-MDS
48	del(11)(q23q23.3)	11q23.3	CBL	Fu et al. (2003)	AML, t-AML, ALL

49	del(11)(q23q23.3)	11q23.3	ARHGEF12/LARG	Kourlas et al. (2000)	AML, t-AML
50	del(11)(q23q24.2)	11q24.2	DCPS		AML
51	t(11;12)(q23;p11.23)	12p11.23	ITPR2	Haferlach et al. (2016)	t-MDS
52	t(11;12)(q23;q13.2)	12q13.2	SARNP/CIP29	Hashii et al. (2004)	AML
53	t(11;14)(q23;q23.3)	14q23.3	GPHN	Kuwada et al. (2001)	AML, t-AML
54	t(11;14)(q23;q32.33)	14q32.33	CEP170B/KIAA0284	Burmeister et al. (2008)	t-AML
55	t(11;15)(q23;q14)	15q14	KNL1/CASC5	Hayette et al. (2000)	AML, t-MDS, ALL,
56	t(11;15)(q23;q15.1)	15q15.1	ZFYVE19/MPFYVE	Chinwalla et al. (2003)	AML
57	t(11;15)(q23;q21)	15q21	TCF12	Not published yet	t-AML
58	t(11;15)(q23;q25.3)	15q25.3	AKAP13		t-AML
59	t(11;16)(q23;p13.3)	16p13.3	CREBBP/CBP	Taki et al. (1997)	t-MDS, t-AML, AML, t-ALL, t-CML
60	t(11;16)(q23;p13.11)	16p13.11	MYH11		AML
61	t(11;17)(q23;p13.1)	17p13.1	GAS7	Megonigal et al. (2000)	t-AML
62	t(11;17)(q23;p11.2)	17p11.2	TOP3A	Herbaux et al. (2012)	AML
63	t(11;17)(q23;q12)	17q12	LASP1	Strehl et al. (2003)	AML
64	ins(11;17)(q23;q21)	17q21	ACACA		AML
65	t(11;17)(q23;q21)	17q21	MLLT6/AF17	Prasad et al. (1994)	AML, ALL
66	t(11;17)(q23;q23.1)	17q23.1	CLTC	Not published yet	AML
67	t(11;17)(q23;q25)	17q25	SEPT9/AF17Q25	Osaka et al. (1999)	t-AML, AML, MDS, ALL
68	t(11;18)(q23;q21)	18q21	ME2	Szotkowski et al. (2015)	t-AML
69	t(11;19)(q23;p13.3)	19p13.3	MLLT1/ENL	Tkachuk et al. (1992)	ALL, T-ALL, AML, BAL, t-AL
70	t(11;19)(q23;p13.3)	19p13.3	ACER1/ASAH3	Lo Nigro et al. (2002)	ALL
71	t(11;19)(q23;p13.3)	19p13.3	SH3GL1/EEN	So et al. (1997)	AML
72	ins(11;19)(q23;p13.3)	19p13.3	VAV1		AML
73	t(11;19)(q23;p13.2)	19p13.2	MYO1F	Lo Nigro et al. (2002)	AML
74	t(11;19)(q23;p13.1)	19p13.1	ELL	Thirman et al. (1994)	ALL, BAL, AML, t-AML
75	t(11;19)(q23;q13)	19q13	ACTN4	Burmeister et al. (2009)	t-ALL, t-AML

76	t(11;20)(q23;q11.21)	20q11.21	MAPRE1	Fu et al. (2005)	ALL
77	t(11;20)(q23;q13.2)	20q13.2	PFDN4	Not published yet	T-ALL
78	t(11;22)(q23;q11.21)	22q11.21	SEPT5/CDCREL	Megonigal et al. (1998)	AML, T-ALL
79	t(11;22)(q23;q13)	22q13	MKL1	Not published yet	ALL
80	t(11;22)(q23;q13.2)	22q13.2	EP300/P300	Ida et al. (1997)	t-AML
81	t(X;11)(q13.1;q23)	Xq13.1	FOXO4/AFX	Parry et al. (1994)	T-ALL, ALL, t-ALL, CLL, AML
82	ins(X;11)(q24;q23)	Xq24	SEPT6	Borkhardt et al. (2001)	AML
83	ins(X;11)(q26.3;q23)	Xq26.3	CT45S2	Cerveira et al. (2010)	BAL
84	ins(11;X)(q23q28q13.1)	Xq28	FLNA	De Braekeleer et al. (2009)	AML
B. MLL fusion not in-frame					
1	t(3;11)(p21.3;q23)	3p21.3	SACM1L		N/A
2	t(3;11)(q21.3;q23)	3q21.3	EEFSEC/SELB		ALL
3	t(6;11)(p22.3;q23)	6p22.3	NUP153	Not published yet	ALL
4	inv(11)(p15.5q23)	11p15.5	AP2S2		AML
5	complex	11q14	NOX4	Not published yet	ALL
6	t(11;15)(q23.3;q21)	11q23.3	LOC100131626		MDS
7	inv(11)(q23.3q23)	11q23.3	BUD13		AML
8	del(11)(q23q23.3)	11q23.3	CEP164		t-ALL
9	del(11)(q23q23.3)	11q23.3	BCL9L		ALL
10	t(2;11;19)(p23.3;q23;p13.3)	19p13.3	LOC100128568		AML
C. No partner gene fused to 5'-MLL gene					
1	t(1;11)(p13.1;q23)	1p13.1			PMF
2	t(6;11)(q27;q23)	6q27		Not published yet	AML
3	t(9;11)(p13.3;q23)	9p13.3			t-ALL
4	t(11;11)(q23;q23.3)	11q23.3			ALL, AML
5	t(11;11)(q23;q24.3)	11q24.3			AML
6	t(11;21)(q23;q22)	21q22			t-ALL
D. Not characterized at the molecular level (published by others)					
1	t(1;11)(p36;q23)				
2	t(1;11)(q31;q23)				
3	t(1;11)(q32;q23)				
4	t(2;11)(p21;q23)				
5	t(2;11)(q37;q23)				
6	t(3;11)(p13;q23)				
7	t(4;11)(p11;q23)				
8	t(6;11)(q13;q23)				

9	t(7;11)(p15;q23)
10	t(7;11)(q22;q23)
11	t(7;11)(q32;q23)
12	t(8;11)(q11;q23)
13	t(8;11)(q21;q23)
14	t(8;11)(q24;q23)
15	t(9;11)(p11;q23)
16	t(9;11)(q33;q23)
17	t(10;11)(q25;q23)
18	t(11;11)(q11;q23)
19	t(11;11)(q13;q23)
20	t(11;11)(q21;q23)
21	t(11;12)(q23;p13)
22	t(11;12)(q23;q13)
23	t(11;12)(q23;q24)
24	t(4;13;11)(q21;q34;q23)
25	t(11;14)(q23;q11)
26	t(11;14)(q23;q32)
27	t(11;15)(q23;q15)
28	t(11;17)(q23;q11)
29	t(11;17)(q23;q23)
30	t(11;18)(q23;q12)
31	t(11;18)(q23;q23)
32	t(11;20)(q23;q13)
33	t(11;21)(q23;q11)
34	t(Y;11)(p11;q23)
35	t(X;11)(q22;q23)

En esta tabla podemos ver las distintas traslocaciones de KMT2A descritas. Las distintas traslocaciones se relacionan distintos tipos de neoplasias, y dentro de la AML, implican un distinto impacto en el pronóstico de la enfermedad. Por ejemplo, la t(9;11)(p22;q23), tiene un mejor pronóstico que el resto de las AML con translocaciones en KMT2A, por lo que fue separada en la clasificación de la WHO de 2008 en otro grupo, con una supervivencia global a los 10 años de aproximadamente un 39%. Esta se asocia con características monocíticas y constituye un tercio de todas las reordenaciones de KMT2A en la AML [104,105].

Otra translocación interesante de este gen es la t(1;11)(q21;q23) que expresa la proteína de fusión *MLL-AF1Q::MLLT1*. Como el caso anterior, esta anomalía confiere buen pronóstico, con una supervivencia de alrededor del 90%, lo que sugiere una baja capacidad oncogénica [106].