

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Implicaciones clínicas de la detección de mutaciones
recurrentes mediante secuenciación masiva en leucemia
mieloide aguda y correlación con la sensibilidad a fármacos
antileucemia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Esther Onecha de la Fuente

Directores

**Rosa Ayala Díaz
Joaquín Martínez López**

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina
Departamento de Medicina



IMPPLICACIONES CLÍNICAS
DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES RECURRENTE
MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA EN
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y
CORRELACIÓN CON LA
SENSIBILIDAD A FÁRMACOS ANTILEUCEMIA

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

María Esther Onecha de la Fuente

Dirigida por:

Dra. Rosa Ayala Díaz

Dr. Joaquín Martínez López

TESIS DOCTORAL

Madrid. 2018



ROSA AYALA DÍAZ, M.D., PhD, profesora asociada del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de sección del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

JOAQUÍN MARTÍNEZ LÓPEZ, M.D., PhD, profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

CERTIFICAN:

La tesis doctoral titulada: “IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES RECURRENTES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y CORRELACIÓN CON LA SENSIBILIDAD A FÁRMACOS ANTILEUCEMIA”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Esther Onecha de la Fuente**, Licenciada en Biología.

El presente trabajo ha sido revisado por ambos directores, y es considerado apto para su presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral ante el tribunal que en su día se designe.

Esto Es Digo Anda...

*Y los acordes de tu risa,
inundaron el valle del cerrato,
eternamente.*

ÍNDICE

	<u>Página</u>
LISTADO DE FIGURAS	13
LISTADO DE TABLAS	15
LISTADO DE ANEXOS	15
ABREVIATURAS	16
RESUMEN/ABSTRACT	22
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. DEFINICIÓN Y ESTADO ACTUAL DE LA LMA	32
1.2. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LA LMA	32
1.3. CLASIFICACIÓN DE LA LMA	33
1.4. LA NUEVA ERA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR	34
1.4.1. VARIANTES GENÓMICAS	34
1.4.2. PRIORIZACIÓN Y CATEGORIZACIÓN DE VARIANTES SOMÁTICAS	36
1.4.3. GENÓMICA EN LA LMA	37
1.5. TRATAMIENTOS TERAPEÚTICOS EN LMA	43
1.5.1. TRATAMIENTO EN PACIENTES \leq 65 AÑOS	43
1.5.2. TRATAMIENTO EN PACIENTES $>$ 65 AÑOS	45
1.6. FRACASO TERAPÉUTICO EN LMA	46
1.7. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LMA	49
1.8. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EX VIVO	50
2. OBJETIVOS	
2.2. OBJETIVOS	56
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	56
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. PACIENTES, MUESTRAS Y CONTROLES	58
3.1.1. SELECCIÓN DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO DE FRACASO TERAPEUTICO EN LA LMA	58
3.1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO EN ESTADOS DE FRACASO TERAPEUTICO EN LA LMA	58
3.1.3. SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES PARA EL ESTUDIO DE EMR EN LA LMA	59
3.1.4. SELECCIÓN DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO	61
3.2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA	61
3.3. EXTRACCIÓN DE ADN	62
3.4. ANÁLISIS GENÉTICO POR SECUENCIACIÓN MASIVA	62
3.4.1. DISEÑO DEL PANEL GENÉTICO	62
3.4.2. FLUJO DE TRABAJO	63
3.4.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	64

3.4.3.1. ALGORITMOS COMPUTACIONALES DE PREDICIÓN DE IMPACTO FUNCIONAL	66
3.4.3.2. BASES DE DATOS	66
3.5. NUEVO MÉTODO DE EVALUACIÓN DE EMR EN LMA	68
3.5.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN TÉCNICA	68
3.5.1.1. PCR DIGITAL	70
3.5.2. NPM1 EN LA MONITORIZACIÓN DE EMR	71
3.5.3. CMF EN LA MONITORIZACIÓN DE EMR	72
3.6. ESTUDIO FARMACOLÓGICO	72
3.6.1. CÁLCULO DEL ÁREA BAJO LA CURVA (AUC)	75
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76

4. RESULTADOS

<u>4.1. PERFIL MUTACIONAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LMA</u>	
4.1.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE	80
4.1.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA SERIE	80
4.1.2.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR CONVENCIONALES	80
4.1.2.2. PERFIL MUTACIONAL DETERMINADO POR NGS	81
4.1.2.2.1. ANOTACIÓN, FILTRADO Y PRIORIZACIÓN DE VARIANTES	81
4.1.2.2.2. PERFIL MUTACIONAL AL DIAGNÓSTICO	83
4.1.2.2.3. VÍAS FUNCIONALES	83
4.1.2.2.4. ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS Y/O GENÉTICAS	86
4.1.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	88
4.1.3.1. IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN LA SUPERVIVENCIA	88
4.1.3.2. IMPACTO DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN LA SUPERVIVENCIA	91
4.1.4. RIESGO PRONÓSTICO	95
<u>4.2. PERFIL MUTACIONAL EN EL FRACASO TERAPEUTICO</u>	
4.2.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE	98
4.2.2. CASOS DE REFRACTARIEDAD PRIMARIA	98
4.2.3. CASOS COMBINADOS DE REFRACTARIEDAD Y RECAÍDA	101
4.2.4. CASOS DE RECAÍDA	102
4.2.5. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA SERIE	108
<u>4.3. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL</u>	
4.3.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE	113
4.3.2. SECUENCIACIÓN A ALTA PROFUNDIDAD	113
4.3.2.1. APLICABILIDAD Y SENSIBILIDAD DE LA NGS EN EMR	114
4.3.2.2. VALIDACIÓN TÉCNICA DE LA NGS EN EMR	114
4.3.2.3. VALIDACIÓN CLÍNICA DE LA NGS EN EMR	115
<u>4.4. ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO</u>	
4.4.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE	121
4.4.2. ENSAYOS EN MONOTERAPIA	121
4.4.2.1. RESPUESTA FARMACOLÓGICA	121
4.4.2.2. IMPACTO DEL PERFIL MUTACIONAL EN LA FARMACODINÁMICA	124

4.4.3. ENSAYOS EX VIVO CON TERAPIA COMBINADA	127
4.4.4. CORRELACIÓN DE RESPUESTA EX VIVO Y RESPUESTA CLÍNICA	128
5. DISCUSIÓN	
5.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO EN EL DIAGNÓSTICO DE LMA MEDIANTE NGS	133
5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO EN EL FRACASO TERAPÉUTICO DE LMA MEDIANTE NGS	137
5.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EMR EN LMA MEDIANTE NGS	140
5.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO PRE-TRATAMIENTO EN LMA	142
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	150
ANEXOS	
ANEXO 1. Fichero de salida de RUBioSeq	164
ANEXO 2. Fichero ejemplo sequencingAP.conf	165
ANEXO 3. Fichero ejemplo Template.ionTorrent.3.8.xlm	166
ANEXO 4. Variantes detectadas en el diagnóstico	167
ANEXO 5. Distribución de las variantes en los genes	172
ANEXO 6. Variantes detectadas en estados de fracaso terapéutico	175
ANEXO 7. Curvas dosis-respuesta	177
PUBLICACIONES	18

Onecha, E. Et al. Novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018 Aug 9. doi: 10.3324/haematol.2018.194712.

LISTADO DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Categorización de las Variantes Basada en Criterios Clínicos.
- FIGURA 2.** Grupos de Pacientes LMA Según Perfil Citogenético y Molecular.
- FIGURA 3.** Categorías Funcionales de Genes Comúnmente Mutados en la LMA.
- FIGURA 4.** Tratamiento Estándar Para Pacientes con LMA \leq 65 Años.
- FIGURA 5.** Tratamiento Estándar Para Pacientes con LMA \geq 65 Años.
- FIGURA 6.** Prototipo de Expansión Clonal.
- FIGURA 7.** Modelo E_{max} Sigmoide.
- FIGURA 8.** Muestras Evaluadas en el Seguimiento de la LMA.
- FIGURA 9.** Esquema de la Preparación de Librerías por NGS.
- FIGURA 10.** Esquema del Flujo de Trabajo de RUBioSeq 3.8.
- FIGURA 11.** Esquema del Flujo de Procesamiento de Ficheros.
- FIGURA 12.** Flujo de Trabajo del Método de Detección y Cuantificación de EMR.
- FIGURA 13.** Proceso Técnico de PCR Digital.
- FIGURA 14.** Esquema del Flujo de Trabajo de la Plataforma *PharmaFlow^{PM}*.
- FIGURA 15.** Prototipo del Cálculo de AUC Sobre Curva Dosis-Respuesta.
- FIGURA 16.** Flujo de Filtrado y Priorización de las Variantes del Pipeline Desarrollado.
- FIGURA 17.** Tipo de Variantes Alélicas Detectadas Al Diagnóstico.
- FIGURA 18.** Frecuencia Poblacional de los Genes Estudiados por NGS.
- FIGURA 19.** Distribución de las Variantes en los Genes.
- FIGURA 20.** Curvas KM de Supervivencia de la Serie (N=185).
- FIGURA 21.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Cariotipo al Diagnóstico.
- FIGURA 22.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Riesgo Pronóstico (ELN 2010).
- FIGURA 23.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Edad al Diagnóstico.
- FIGURA 24.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Origen de LMA al Diagnóstico.
- FIGURA 25.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Respuesta al Tratamiento de Inducción.
- FIGURA 26.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Tratamiento de Inducción.
- FIGURA 27.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Tratamiento de Consolidación.
- FIGURA 28.** Curvas KM de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en los Genes *EZH2* (A), *KMT2A* (B), *U2AF1* (C), y *TP53* (D).
- FIGURA 29.** Curvas KM de SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en los Genes *EZH2* (A), *SF3B1* (B) y Grupo Supresor de Tumores (C; *VHL*, *TP53* y *PTEN*).
- FIGURA 30.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Número Genes Mutados.
- FIGURA 31.** Curvas KM de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en NPM1, en Ausencia de Variantes en *FLT3* (A), o en *TET2* (B) o en *TP53* (C).
- FIGURA 32.** Curvas KM de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en *CBL*, en Ausencia de Variantes en *FLT3-ITD* (A), o en *DNMT3A* (B) o en *KIT* (C).
- FIGURA 33.** Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en *DNMT3A*, en Co-Existencia con Variantes en *IDH1* (A, B) o *RUNX1* (C).
- FIGURA 34.** Curvas KM de SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Muta) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en el Gen *DNMT3A*, en Ausencia de Variantes en *EPOR* (A), *KDM6A* (B) y *JAK2* (C).
- FIGURA 35.** Curva de SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No Mut) de Variantes en *IDH1* en Ausencia de Variantes en Genes de la Vía de Señalización de Citoquinas.

FIGURA 36. Curva de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en *JAK2* en Ausencia de Variantes en *NPM1*.

FIGURA 37. Dinámica del Perfil Mutacional en Casos de Refractoriedad Respecto al Diagnóstico.

FIGURA 38. Dinámica del Perfil Mutacional en Casos Combinados de Refractoriedad y Recaída Respecto al Diagnóstico.

FIGURA 39. Dinámica del Perfil Mutacional en Casos de Recaídas Respecto al Diagnóstico (Pacientes 11-16).

FIGURA 40. Dinámica del Perfil Mutacional en Casos de Recaídas Respecto al Diagnóstico (Pacientes 17-22).

FIGURA 41. Fluctuación de la VAF en Refractoriedad Respecto a Diagnóstico

FIGURA 42. Fluctuación de la VAF en Recaída Respecto a Diagnóstico

FIGURA 43. Curvas de Calibración Para Detectar EMR Mediante NGS

FIGURA 44. Curvas de Calibración Para Detectar EMR Mediante dPCR

FIGURA 45. Curvas ROC Para Determinar el Mejor Punto de Corte.

FIGURA 46 Análisis de SG y SLE en Pacientes Estratificados Según Niveles de EMR Detectados Mediante NGS.

FIGURA 47.Análisis de la Probabilidad de SG y SLE en Pacientes con LMA Estratificados Según los Niveles de EMR Detectados Mediante CMF o qPCR.

FIGURA 48. Curvas Dosis Respuesta de los Fármacos Incluidos en Protocolos Clínicos

FIGURA 49. Mapa de Sensibilidad al Test Farmacológico

FIGURA 50. Impacto de Mutaciones en *NPM1* en la Respuesta Farmacológica.

FIGURA 51. Impacto de Mutaciones en *U2AF1* en la Respuesta Farmacológica.

FIGURA 52. Impacto de Mutaciones en *TP53* en la Respuesta Farmacológica.

FIGURA 53. Impacto de Mutaciones en Genes de Señalización de Citokinas en la Respuesta Farmacológica.

FIGURA 54. Impacto de Mutaciones en Genes de Regulación Epigenética en la Respuesta Farmacológica.

FIGURA 55. Impacto de Mutaciones en *KRAS* en la Respuesta Farmacológica.

FIGURA 56 . Mapa de Sensibilidad *Ex Vivo* a Drogas en Terapia Combinada

FIGURA 57 Impacto del Perfil Mutacional en la Respuesta Farmacológica en Ensayos de Terapia Combinada.

FIGURA 58. Curvas KM de SG en Pacientes Categorizados en Sensibles, Neutros o Resistentes a Fármacos. N=74

FIGURA 59. Curva KM de SG en Pacientes Categorizados en Sensibles y Resistentes a Citarabina.

FIGURA 60. Curva KM de SG en Pacientes Categorizados Según Respuesta a Múltiples Fármacos.

FIGURA 61. Curva KM de SG en Pacientes Categorizados en Según Score Farmacológico y Mutacional.

LISTADO DE TABLAS

- TABLA 1.** Clasificación de la LMA Según FAB.
- TABLA 2.** Clasificación de la LMA en Grupos de Riesgo Pronóstico Según ELN-2017.
- TABLA 3.** Criterios de Respuesta a la Quimioterapia de Inducción.
- TABLA 4.** Muestras y Pacientes Seleccionados Para el Estudio de EMR.
- TABLA 5.** Genes Incluidos en el Panel de NGS.
- TABLA 6.** Algoritmos Computacionales de Predicción del Impacto Funcional Debido a Variantes Genómicas.
- TABLA 7.** Bases de Datos Relevantes Para la Interpretación de Variantes Somáticas.
- TABLA 8.** Secuencia de Primers Para el Estudio de EMR
- TABLA 9.** Fármacos Incluidos en los Ensayos en Monoterapia.
- TABLA 10.** Fármacos Incluidos en los Ensayos en Combinación
- TABLA 11.** Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio al Diagnóstico.
- TABLA 12.** Frecuencia Alélica de las Variantes (VAF) Detectadas
- TABLA 13.** Análisis Univariante de los Factores Pronóstico
- TABLA 14.** Análisis Multivariante de los Factores Pronóstico
- TABLA 15.** Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio de Fracaso Terapéutico
- TABLA 16.** Variantes Involucradas en los Casos de Seguimiento de la Enfermedad.
- TABLA 17.** Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio de EMR.
- TABLA 18.** Puntos de Corte Usados Para la Clasificación de Pacientes Según Niveles de EMR.
- TABLA 19.** Análisis Univariante en EMR.
- TABLA 20.** Análisis Multivariante en EMR.
- TABLA 21.** Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio Farmacodinámico.
- TABLA 22.** Correlación Entre Fármacos Según su Actividad Farmacológica.

LISTADO DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Fichero de Salida de RUBioSeq
- ANEXO 2.** Fichero Ejemplo sequencingAP.conf
- ANEXO 3.** Fichero Ejemplo Template.ionTorrent.3.8.xlm
- ANEXO 4.** Variantes Detectadas en el Diagnóstico
- ANEXO 5.** Distribución de las Variantes en los Genes
- ANEXO 6.** Variantes Detectadas en Estados de Fracaso Terapéutico
- ANEXO 7.** Curvas Dosis-Respuesta

ABREVIATURAS

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNg: ADN genómico

AlotPH: trasplante hematopoyético alogénico

Ams: amsacrina

ARA-C: citarabina

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ASXL1: abreviatura del inglés, Sex combs-like gene

AUC: área bajo la curva. Del inglés Area Under the Curve

AutoTPH: trasplante hematopoyético autólogo

AZA/ 5-AZA: 5-Azacitidina

BD: base de datos

BUS: busulfán

C: citosina

CBF: abreviatura del inglés, core binding factor

CBL: abreviatura del inglés, Casitas B-lineage Lymphoma

CEBPA: de las siglas en inglés, CCAAT enhancer-binding protein alpha

CETLAM: grupo cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodispasias

CI: del inglés, combinación índice

CIT/ CYT/ Cita: citarabina

CHIP: abreviatura del inglés, *clonal hematopoiesis of indeterminate potencial*

CLO: clofarabina

CMF: citometría de flujo

CONDEL: abreviatura del inglés, CONsensus DELeteriousness score

DAU: daunorubicina

DEC: decitabina

Del: delección

dPCR: digital PCR

EC₅₀: eficacia la 50%

ELN: abreviatura del inglés, *European LeukemiaNet Foundation*

EMR: Enfermedad Mínima Residual

E₀: eficacia basal

E_{max}: eficacia máxima

EPOR: abreviatura del inglés, erythropoietin receptor

ETV6: abreviatura del inglés, ETS variant 6

ETO: etopósido

EZH2: abreviatura del inglés, Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit

FAB: abreviatura del inglés, French-American-British cooperative group

FCS: Forward Scatter

FITC: fluoresceína

FISH: abreviatura del inglés, *Fluorescent in situ hybridization*

FLT3-ITD: FLT3-internal tandem duplication

FLU / Fluda: fludarabina

Fw: forward

G: guanina

HC: hematopoyesis clonal

HLA: antígenos leucocitarios humanos, acrónimo inglés de *Human leukocyte antigen*)

HR: hazard ratio

HRAS: GTPasa HRas

IC: intervalo de confianza

InDel: inserción o delección (de pequeño tamaño)

IDA: idarubicina

IDH1: Isocitrato deshidrogenasa-1

IDH2: Isocitrato deshidrogenasa-2

inv: inversión

IPSS: índice pronóstico internacional (International Prognosis Score System)

IPSSr: índice pronóstico internacional revisado (International Prognosis Score System revised)

JAK2: abreviatura del inglés, Janus-kinase-2

KIT: receptor tirosin kinas (del inglés, receptor tirosin kinasa)

KM: Kaplan Meier

KMT2A: abreviatura del inglés, Lisina-(K) metiltransferasa 2A

KMD6A: abreviatura del inglés, Lisina-(K) demetilasa 6A

KRAS: GTPasa KRas

LEN: lenamidomida

LMA: leucemia mieloide aguda

LOQ: límite de cuantificación, del inglés Limit of Quantification

MAF: mafosfamida

MEL: melfalán

MIT: mitoxantrona

MO: médula ósea

MPL: receptor de la tromboeritropoyetina (del inglés, myeloproliferative leukemia protein)

NGS: secuenciación masiva de nueva generación (del inglés, *Next Generation Sequencing*)

NMP: neoplasia mieloproliferativa crónica

NPM1: nucleofosmina

NRAS: GTPase NRas
NS: no significativa
OR: Odds Ratio
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAN: panobinostat
Pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)
PD: Farmacodinámica
PK: Farmacocinética
PETHEMA: Programa Español de Tratamientos en Hematología
PolyPhen: Polymorphism Phenotyping
PRPF40B: Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B
PTEN: abreviatura del inglés, phosphatase and tensin homolog
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, quantitative polymerase chain reaction)
RC: remisión completa
Ri: remisión incompleta
Rp: remisión parcial
RUNX1: abreviatura del inglés, runt related transcription factor 1
Rv: reverse
SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant
SG: supervivencia global
SF1: abreviatura del inglés, Splicing Factor 1
SF3A1: abreviatura del inglés, Splicing factor 3A subunit 1
SF3B1: abreviatura del inglés, Splicing factor 3B subunit 1
SH2B3: abreviatura del inglés, SH2B adapter protein 3 (SH2B3), also known as lymphocyte adapter protein (LNK)
SLE: supervivencia libre de enfermedad
SMD: síndrome mielodisplásico
SNV: variante de un solo nucleótido (del inglés, single nucleotide variant)
SOR: sorafenib
SP: sangre periférica
SRSF2: abreviatura del inglés, Splicing factor, arginine/serine-rich 2
SSC: Side scatter
t: traslocación
T: timina
TET2: abreviatura del inglés, Tet metilcitosina dioxigenasa-2
TIO / 6-TIO: 6-tioguanina
TP53: Tumor protein p53
TPH: trasplante hematopoyético

U2AF1: abreviatura del inglés, U2 small nuclear RNA auxiliary factor

VAF: frecuencia alélica de la variante (del inglés, Variant Allele Frequency)

VEP: abreviatura del inglés, variant effect predictor

VHL: abreviatura del inglés, von Hippel-Lindau tumor suppressor

VOL: volasertib

Wt: wild type

ZRSR2: abreviatura del inglés, Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2

RESUMEN
ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una patología hematológica de origen mieloide caracterizada por su alta heterogeneidad molecular y citogenética, cuyos parámetros clínicos, respuesta al tratamiento y supervivencia global es muy divergente. La LMA es la leucemia aguda más frecuente y su pronóstico es muy desfavorable, e incluso en muchos casos impredecible como consecuencia de la falta de herramientas diagnósticas más específicas e informativas. Además la relevancia clínica y pronóstica de muchas alteraciones genéticas está poco definida.

El diagnóstico genético de los tumores hematológicos se realiza de forma rutinaria mediante estudios cito-morfológico y bioquímicos, apoyados por estudios de secuenciación mediante Sanger de un conjunto pequeño de genes candidatos. Este proceso resulta lento y laborioso en enfermedades genéticamente heterogéneas, como es el caso de la LMA.

Una alta proporción de pacientes con LMA que alcanzan RC o incluso enfermedad mínima residual (EMR) negativa finalmente recaen como consecuencia del resurgimiento de una fracción de clones patológicos indetectables por técnicas convencionales.

Ante esta circunstancia, es necesario la implantación de nuevas tecnologías, tales como la secuenciación masiva o NGS que permitan una optimización en la caracterización del paciente tanto en el inicio de la enfermedad como a lo largo seguimiento clínico del paciente.

OBJETIVOS

1. Implementar y validar la aplicabilidad de la NGS como método de caracterización del perfil mutacional de pacientes con LMA en el diagnóstico y en estados de fracaso terapéutico (refractoriedad primaria al tratamiento de inducción y recaída). Así como evaluar la capacidad de la NGS para identificar marcadores moleculares con valor pronóstico en pacientes con LMA.
2. Desarrollar y validar, técnica y clínicamente, un método basado en secuenciación masiva de alta profundidad para la monitorización de la EMR en pacientes con LMA.
3. Validar la aplicabilidad de ensayos farmacológicos ex vivo previos al tratamiento para la predicción de la respuesta a fármacos antileucemia. Estudiar el efecto del perfil mutacional en la respuesta farmacológica. Así como evaluar el impacto del perfil farmacológico en combinación con el perfil mutacional en la predicción del pronóstico de los pacientes con LMA.

MÉTODOS

El estudio a nivel molecular incluye las regiones codificantes de 32 genes recurrentemente mutados en patologías mieloides mediante secuenciación por NGS. Se analizó una cohorte representativa de pacientes en edad adulta diagnosticados de LMA no M3 tratados de manera uniforme según criterios de protocolos PETHEMA. El estudio incorpora muestras de médula ósea en varios momentos de la enfermedad: diagnóstico (n=190), refractariedad/recaída (n=38), y durante el seguimiento y/o monitorización de la enfermedad mínima residual (n=106).

El estudio farmacológico ex vivo fue realizado de forma paralela mediante una plataforma basada en citometría de flujo, *PharmaFlow*. Este ensayo incluye 18 fármacos antileucemia testados en 74 de los pacientes incluidos en la cohorte del estudio genómico por NGS al diagnóstico y siempre antes de iniciar el tratamiento.

RESULTADOS

El desarrollo e implementación de pipelines bio-informáticos concatenados y automatizados para el procesamiento de datos derivados de NGS, identifica y prioriza variantes alélicas según criterios técnicos y criterios clínico/biológicos permitiendo caracterizar el perfil genético de la LMA con alta fiabilidad y eficacia.

En el inicio de la enfermedad se identificaron 264 variantes en 190 pacientes agrupadas en 6 niveles de mayor a menor relevancia biológica, pronóstica y terapéutica asociada a esta patología. La mediana del número de mutaciones por paciente fue de dos, y los genes con mayor frecuencia poblacional corresponden a *NPM1* (28%), *DNMT3A* (26%), *FLT3* (25%), *TET2* (21%) y *NRAS* (19%).

El análisis multivariable, donde se considera además características clínicas relevantes en el diagnóstico, distingue como marcadores moleculares de mayor riesgo de muerte: presentar variables alélicas en los genes *TP53* (Hazard Ratio (HR): 2,79; p< 0,001), *EZH2* (HR: 2,42; p= 0,046), *U2AF1* (HR: 2,98; p= 0,009) y/o *KMT2A* (HR: 2,24; p= 0,029). Mientras que la presencia de mutaciones en el gen *ZRSF2* (HR: 0,20; p= 0,033) se muestra como el único marcador molecular de menor riesgo de muerte. Tan solo *EZH2* (HR:3,77; p= 0,017) se manifiesta a la vez como marcador con valor pronóstico independiente adverso de recaída.

Los resultados derivados del estudio en estados de fracaso terapéutico realizado en 23 pacientes identificó 72 variantes, incluyendo muestras en el diagnóstico (n=23), en remisión completa (n=31), en remisión parcial (n=4), en refractariedad (n=16) o en recaída (n=18).

El estudio pareado diagnóstico vs. refractariedad reveló que la mediana de la frecuencia alélica de las variantes entre ambos momentos disminuyó un 20%. El 75 % de las variantes detectadas al

inicio de la enfermedad se manifestaban en las muestras en refractariedad a diferencia del 25 % restante que se perdieron; mientras que otras 5 variantes fueron identificadas *de novo*. Lo que demuestra estabilidad clonal en los casos de refractariedad al tratamiento de inducción, que pudiera justificar la refractariedad al tratamiento observada.

El estudio pareado diagnóstico vs recaída reveló que la mediana de la frecuencia alélica de las variantes entre ambos momentos disminuyó un 30%. El 78 % de las variantes detectadas al inicio de la enfermedad se manifestaban en las muestras en recaída, a diferencia del 22 % restante que no fueron detectadas; mientras que otras 17 variantes fueron identificadas *de novo*. Lo que demuestra resurgimiento clonal en los casos de recaída, y por otro lado evolución hacia nuevos clones derivados de presión selectiva desencadenada por el tratamiento.

El desarrollo del método basado en NGS a alta profundidad para la evaluación de EMR mediante detección de clonotipos celulares con mutaciones en *NPM1*, *IDH1/2* y/o *FLT3*-SNV logró una sensibilidad de 10^{-4} para la detección de variantes de un solo nucleótido y 10^{-5} para la detección de variantes de tipo inserción/delección. Este método tiene una aplicabilidad en pacientes con LMA que presenten alguna mutación, 86% de los pacientes de nuestra serie, y la capacidad de estratificar a los pacientes en grupos de riesgo pronóstico.

Los pacientes con EMR positiva determinada por secuenciación se asoció con una menor supervivencia libre de enfermedad (HR=3,4; p=0,005) y menor supervivencia global (HR= 4,2; p <0,001). El análisis multivariable mostró que presentar EMR positiva determinada por secuenciación es un factor independiente asociado a riesgo de muerte (HR=4,54; p=0,005) y el único factor independiente que confiere riesgo de recaída (HR=3,76; p=0,012).

Este método basado en secuenciación simplifica y estandariza la monitorización de EMR, con alta aplicabilidad en LMA. También mejora la predicción respecto otras metodologías (citometría de flujo y qPCR) y podría incorporarse en la práctica clínica como método de cuantificación y detección de EMR en LMA.

Es text de sensibilidad *ex vivo* a fármacos antileucemia identifica sorafenib como el fármaco con mayor actividad farmacológica ($AUC_{norm}=4,73$) y melfalán como el fármaco con menor actividad farmacológica ($AUC_{norm}=55,73$). El test es capaz de discriminar buenos respondedores, o sensibles, de malos respondedores, o resistentes, a citarabina y presenta valor pronóstico. Los pacientes resistentes a citarabina muestran menor supervivencia global que los pacientes sensibles (p=0,058).

Se ha observado variabilidad de la respuesta farmacológica en relación a marcadores moleculares. Se observa mayor sensibilidad *ex vivo*: 1) en pacientes mutados en *NPM1* en los ensayos con mitoxantrona y con amsacrina; 2) pacientes mutados en *FLT3* en los ensayos con daunorubicina, panobinostat, 6-tioguanina y 5-azacitidina; 3) pacientes mutados en *KMT2A* en los ensayos con

idarubicina y fludarabina; y 4) pacientes mutados en *KRAS* en los ensayos con sorafenib y mafosfamida.

Por otro lado se ha observado menor sensibilidad *ex vivo*: 1) en pacientes mutados en *U2AF1* en los ensayos con amsacrina y 6-tioguanina; 2) pacientes mutados en *TP53* en los ensayos con fludarabina y mitoxantrona; 3) pacientes mutados en *EPOR* en el ensayo con citarabina; y 4) pacientes mutados en *IDH2* en el ensayo con citarabina.

El grupo de pacientes que presenta un patrón de resistencia a múltiples fármacos tienen menor supervivencia global que el resto de pacientes ($p=0,015$). Este patrón de multi-resistencia es uno de los factores independientes de riesgo de muerte (HR:2,52; $p=0,047$), junto con los marcadores genéticos: *TP53* (HR:12,22; $p<0,001$), *TET2* (HR:4,39; $p=0,024$) y *KMT2A* (HR:6,43; $p=0,032$).

Sin embargo, el valor predictivo de este estudio se potencia gracias a un score que incluye marcadores moleculares con valor pronóstico adverso independiente derivados del perfil mutacional combinado con el perfil farmacológico. Los pacientes con score alto tienen peor pronóstico que los pacientes con un score bajo (HR:2,554; $p<0,001$).

Este nuevo abordaje puede ayudar a predecir la respuesta de los pacientes a los tratamientos actuales y otros medicamentos antileucemia en desarrollo. Además, permite la identificación de biomarcadores relevantes que determinan sensibilidad, resistencia o toxicidad del paciente a un fármaco.

CONCLUSIONES

La tecnología de secuenciación masiva optimiza la caracterización genética de los pacientes con LMA. Los resultados obtenidos en nuestra cohorte se reproducen con otros estudios publicados, respecto a la frecuencia poblacional de genes mutados y a la frecuencia alélica. Se identificaron 4 genes cuyo estado mutacional tiene impacto adverso en el pronóstico del paciente (*TP53*, *KMT2A*, *EZH2*) y uno (*ZRSF2*) con impacto favorable.

El método basado en NGS para la evaluación de EMR tiene una sensibilidad de 10^{-4} – 10^{-5} y una aplicabilidad del 86% de los pacientes con LMA. Y la capacidad de estratificar a los pacientes en grupos de riesgo pronóstico mejorando incluso las alcanzadas por los métodos actuales de monitorización de EMR (CMF y qPCR).

La combinación de ensayos de sensibilidad *ex vivo* y los estudios del perfil mutacional optimizan la predicción de pronóstico del paciente. Ofreciendo mayor información al clínico ante la selección del tratamiento óptimo para cada paciente de manera individualizada.

INTRODUCTION

Acute myeloid leukaemia (AML) is a hematologic disease of myeloid origin characterized by its high molecular and cytogenetic heterogeneity, whose clinical parameters, response to treatment and overall survival is very divergent. AML is the most frequent acute leukaemia and its prognosis is very unfavourable, and even in many cases unpredictable as a consequence of the lack of more specific and informative diagnostic tools. In addition, the clinical and prognostic relevance of many genetic alterations is poorly defined.

The genetic diagnosis of haematological tumours is carried out routinely through cytomorphological and biochemical studies, supported by sequencing studies by Sanger of a small set of candidate genes. This process is slow and laborious in genetically heterogeneous diseases, as is the case of acute myeloid leukaemia (AML). In addition, the clinical and prognostic relevance of many genetic alterations is poorly defined.

A high proportion of patients with AML who reach CR or even minimal residual disease (MRD) ultimately relapse as a consequence of the resurgence of a fraction of pathological clones undetectable by conventional techniques.

Given this circumstance, it is necessary to implement new technologies, such as massive sequencing or NGS that allow an optimization in the characterization of the patient both at the beginning of the disease and throughout the patient's clinical follow-up.

AIMS

1. To implement and validate the applicability of the NGS as a method of characterization of the mutational profile of patients with AML in the diagnosis and in states of therapeutic failure (primary refractoriness to the treatment of induction and relapse). As well as assess the ability of NGS to identify molecular markers with prognostic value in patients with AML.
2. To develop and validate, technically and clinically, a method based on high depth mass sequencing for the monitoring of MRD in patients with AML.
3. To validate the applicability of *ex vivo* pharmacological tests prior to treatment for the prediction of the response to antileukemia drugs. To study the effect of the mutational profile on the pharmacological response. As well as to evaluate the impact of the pharmacological profile in combination with the mutational profile in predicting the prognosis of patients with AML.

METHODS

The study at the molecular level includes the coding regions of 32 genes recurrently mutated in myeloid pathologies by sequencing by NGS. A representative cohort of adult patients diagnosed with non-M3 AML treated uniformly according to criteria of PETHEMA protocols was analyzed. The study incorporates bone marrow samples at various times of the disease: diagnosis (n = 190), refractoriness/relapse (n = 38), and during monitoring and/or monitoring of minimal residual disease (n = 106).

The ex vivo pharmacological study was carried out in parallel using a platform based on flow cytometry, PharmaFlow. This trial includes 18 anti-leukaemia drugs tested in 74 of the patients included in the cohort of the genomic study by NGS at diagnosis and always before starting treatment.

RESULTS

The development and implementation of concatenated and automated bio-computer pipelines for the processing of NGS-derived data identify and prioritizes allelic variants according to technical criteria and clinical/biological criteria allowing characterizing the genetic profile of AML with high reliability and efficacy.

At the beginning of the disease, 264 variants were identified in 190 patients grouped into 6 levels of greater to lesser biological, prognostic and therapeutic relevance associated with this pathology. The median number of mutations per patient was two, and the genes with the highest population frequency correspond to *NPM1* (28%), *DNMT3A* (26%), *FLT3* (25%), *TET2* (21%) and *NRAS* (19%).

The multivariate analysis, which also considers relevant clinical features in the diagnosis, distinguishes molecular markers of higher risk of death: presenting allelic variables in the TP53 genes (Hazard Ratio (HR): 2.79, p <0.001), *EZH2* (HR: 2.42, p = 0.046), *U2AF1* (HR: 2.98, p = 0.009) and / or *KMT2A* (HR: 2.24, p = 0.029). While the presence of mutations in the *ZRSF2* gene (HR: 0.20, p = 0.033) is shown as the only molecular marker of lower risk of death. Only *EZH2* (HR: 3.77, p = 0.017) manifests itself as a marker with an independent adverse prognostic value of relapse.

The results derived from the study in states of therapeutic failure in 23 patients identified 72 variants, including samples in the diagnosis (n = 23), in complete remission (n = 31), in partial remission (n = 4), in refractoriness (n = 16) or relapse (n = 18).

Paired diagnostic study vs. Refractoriness revealed that the median allelic frequency of the variants between both moments decreased by 20%. 75% of the variants detected at the beginning of the

disease were shown in the samples in refractoriness, unlike the remaining 25% that was lost; while other 5 variants were identified de novo. This shows clonal stability in cases of refractoriness to the induction treatment, which could justify refractoriness to the treatment observed.

The paired study diagnosis vs. relapse revealed that the median allelic frequency of the variants between both moments decreased by 30%. 78% of the variants detected at the beginning of the disease were manifested in the relapsed samples, unlike the remaining 22% that were not detected; while another 17 variants were identified de novo. What shows the clonal resurgence in cases of relapse, and on the other hand evolution towards new clones derived from selective pressure triggered by the treatment.

The development of the high-depth NGS-based method for the evaluation of MRD by detection of cell clonotypes with mutations in *NPM1*, *IDH1 / 2* and/or *FLT3*-SNV achieved a sensitivity of 10^{-4} for the detection of single-nucleotide variants and 10^{-5} for the detection of insertion/deletion type variants. This method has an applicability in patients with AML who present some mutation, 86% of the patients in our series, and the ability to stratify patients into groups of prognostic risk.

Patients with positive MRD determined by sequencing were associated with lower disease-free survival (HR = 3.4, $p = 0.005$) and lower overall survival (HR = 4.2, $p < 0.001$). The multivariate analysis showed that positive MRD determined by sequencing is an independent factor associated with the risk of death (HR = 4.54, $p = 0.005$) and the only independent factor that confers risk of relapse (HR = 3.76; $p = 0.012$).

This method based on sequencing simplifies and standardizes MRD monitoring, with high applicability in AML. It also improves the prediction regarding other methodologies (flow cytometry and qPCR) and could be incorporated in clinical practice as a method of quantification and detection of MRD in AML.

The text of ex vivo sensitivity to antileukemia drugs identifies sorafenib as the drug with the highest pharmacological activity (AUCnorm = 4.73) and melphalan as the drug with the lowest pharmacological activity (AUCnorm = 55.73). The test is able to discriminate good responders, or sensitive, from bad responders, or resistant, to cytarabine and presents prognostic value. Patients resistant to cytarabine show lower overall survival than sensitive patients ($p = 0.058$).

Variability of the pharmacological response has been observed in relation to molecular markers. Greater ex vivo sensitivity is observed: 1) in patients mutated in *NPM1* in the trials with mitoxantrone and with amsacrine; 2) patients mutated in *FLT3* in the trials with daunorubicin, panobinostat, 6-thioguanine and 5-azacitidine; 3) patients mutated in *KMT2A* in the trials with idarubicin and fludarabine, and 4) patients mutated in *KRAS* in the trials with sorafenib and mafosfamide.

On the other hand, lower ex vivo sensitivity was observed: 1) in patients mutated in *U2AF1* in the trials with amsacrine and 6-thioguanine; 2) patients mutated in *TP53* in the trials with fludarabine and mitoxantrone; 3) patients mutated in EPOR in the trial with cytarabine, and 4) patients mutated in IDH2 in the trial with cytarabine.

The group of patients that present a pattern of resistance to multiple drugs have a lower overall survival than the rest of patients ($p = 0.015$). This multi-resistance pattern is one of the independent risk factors for death (HR: 2.52, $p = 0.047$), along with the genetic markers: *TP53* (HR: 12.22, $p < 0.001$), *TET2* (HR : 4.39, $p = 0.024$) and *KMT2A* (HR: 6.43, $p = 0.032$).

However, the predictive value of this study is enhanced by a score that includes molecular markers with an independent adverse prognostic value derived from the mutational profile combined with the pharmacological profile. Patients with a high score have a worse prognosis than patients with a low score (HR: 2.544, $p < 0.001$).

This new approach can help predict the response of patients to current treatments and other antileukemia drugs in development. In addition, it allows the identification of relevant biomarkers that determine sensitivity, resistance or toxicity of the patient to a drug.

CONCLUSIONS

Sequencing technology optimizes the genetic characterization of patients with AML. The results obtained in our cohort are reproduced with other published studies, regarding the population frequency of mutated genes and the allelic frequency. We identified 4 genes whose mutational status has an adverse impact on the prognosis of the patient (*TP53*, *KMT2A*, *EZH2*) and one (*ZRSF2*) with favourable impact.

The NGS-based method for the evaluation of MRD has a sensitivity of 10^{-4} - 10^{-5} and an applicability of 86% of patients with AML. And the ability to stratify patients into prognostic risk groups, improving even those achieved by current MRD monitoring methods (MFC and qPCR).

The combination of ex vivo sensitivity assays and mutational profile studies optimize the prediction of patient prognosis. Offering more information to the clinician regarding the selection of the optimal treatment for each patient individually.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN Y ESTADO ACTUAL DE LA LMA

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es una patología onco-hematológica originada como consecuencia de alteraciones moleculares (reordenamientos cromosómicos y mutaciones genéticas) en células precursoras hematopoyéticas, concretamente en los denominados blastos mieloides. Estos pierden la capacidad de maduración y diferenciación, y proliferan de forma clonal en un estado inmaduro invadiendo la médula ósea de forma progresiva, e incluso, infiltrando a sangre periférica y otros tejidos extramedulares. Esta situación provoca un desequilibrio en la hematopoyesis y un desplazamiento del tejido hematopoyético normal que condiciona la aparición de sintomatología en el paciente, tales como anemia, neutropenia y trombopenia.⁽¹⁾

La LMA es la leucemia aguda más frecuente, representa el 15-20% de las leucemias en edad infantil y el 80% en edad adulta. La incidencia de esta patología es de aproximadamente 3 casos/100 000 habitantes/año y se ve aumentada con la edad, cuya mediana de diagnóstico es de 69 años, alcanzando aproximadamente de 18 casos/100 000 habitantes/año en pacientes mayores de 65 años. Además, predomina en la población masculina, con un ratio hombre:mujer de 3:2.⁽¹⁾⁽²⁾

1.2. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LA LMA

Para establecer un correcto diagnóstico de LMA en un individuo, y por lo tanto una buena caracterización biológica de la enfermedad, se requieren y realizan diversos estudios:

I. Estudio en médula ósea (MO):

- pruebas citológicas: recuento de blastos mieloides y de células con perfil displásico.
- pruebas inmunofenotípicas: el estudio de alteraciones inmunofenotípicas mediante citometría multiparamétrica de flujo (CMF), apoyan el diagnóstico de la LMA al establecer el subtipo morfológico y resultan útiles para la monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR) a lo largo del tratamiento especialmente en pacientes con ausencia de alteraciones citogenéticas o moleculares.
- pruebas cito-genéticas: estudio del cariotipo mediante tinción con Giemsa y alteraciones cromosómicas mediante FISH (del inglés, *Fluorescent in situ hybridization*). El estudio mediante FISH debe incluir (fundamentalmente cuando el cariotipo no es informativo) reordenamientos asociados a *core binding factor (CBF)*: t(8;21), inv(16) y t(15;17), alteraciones de los cromosomas 5 y 7, y anomalías en la región 11q23.
- pruebas moleculares: estudio de marcadores moleculares, tales como *NPM1* mediante qPCR (del inglés, *quantitative polymerase chain reaction*) y *FLT3-ITD (Internal Tandem Duplication)* mediante análisis de fragmentos. Opcionalmente se puede estudiar otros marcadores relevantes para esta patología: *DNMT3A*, *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *IDH1* e *IDH2*.

II. **estudio en sangre periférica (SP):** extensión de sangre periférica y hemograma completo, además de estudios bioquímicos y de coagulación.

1.3. CLASIFICACIÓN DE LA LMA

El grupo Francés-Americano-Inglés (FAB, French-American-British cooperative group), estableció en el año 1976⁽³⁾ los primeros criterios de clasificación en LMA distinguiendo 8 tipos de LMA en base a criterios morfológicos e inmunohistoquímicos, ver tabla 1. Dicha clasificación fue actualizada en 1985,⁽⁴⁾ y nuevamente en 1991.⁽⁵⁾

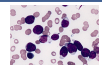
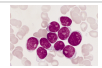
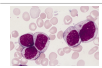
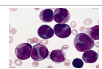
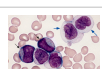
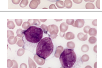


	Tipo LMA	Morfología	Frecuencia (%)
	M0	LMA sin diferenciación	3 %
	M1	LMA con mínima maduración	15 - 20 %
	M2	LMA con maduración	25 - 30 %
	M3	LMA promielocítica	5 -10 %
	M4	LMA mielomonocítica	25 - 30 %
	M5	LMA monocítica y monoblástica	2 - 10 %
	M6	Leucemia aguda eritroide Eritoleucemia	3 - 5 %
	M7	Leucemia Aguda Megacariocítica	3 -12 %

TABLA 1. Clasificación de la LMA Según FAB.

Se indica los 8 grupos (M0-M7) de pacientes con LMA clasificados según criterios morfológicos y la frecuencia poblacional de cada uno de ellos (%).

El avance de la tecnología para el estudio molecular permitió incorporar criterios genéticos y moleculares con el fin de mejorar la clasificación al diagnóstico y establecer el pronóstico de los distintos grupos. Esta propuesta establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) cuya última revisión fue publicada en 2016,⁽⁶⁾ incluye más de 20 tipos de LMA, englobados en el grupo de *Leucemias Mieloides Agudas y otras neoplasias asociadas*, († indica su equivalencia al tipo de LMA según clasificación FAB):

◆ **LMA con alteraciones genéticas recurrentes**

- LMA con t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
- LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
- APL con *PML-RARA* - † *M3*
- LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
- LMA con t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
- LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
- LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKLI*
- Provisional: LMA con *BCR-ABL1*
- LMA con *NPM1* mutado
- LMA con *CEBPA* bialélico mutado
- Provisional: LMA con *RUNX1* mutado

◆ **LMA con cambios mielodisplásicos**

◆ **Neoplasias mieloides relacionadas a terapia**

◆ **Otras LMAs, no especificadas**

- LMA con mínima diferenciación - † *MO*
- LMA sin maduración - † *M1*
- LMA con maduración - † *M2*
- Leucemia Mielomonocítica Aguda - † *M3*
- Leucemia Monobástica/Monocítica Aguda - † *M5*
- Leucemia Eritroide Pura - † *M6*
- Leucemia Megacariobástica Aguda - † *M7*
- Leucemia Basofílica Aguda
- Panmielosis Aguda con Mielofibrosis

◆ **Sarcoma mieloide**

◆ **Proliferaciones Mieloides relacionadas con síndrome de Down**

- Mielopoyesis anormal transitoria
- Leucemia Mieloide asociada a síndrome de Down

◆ **Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica**

◆ **Leucemias Agudas de linaje ambiguo**

- Leucemia Aguda Indiferenciada
- Leucemia Aguda fenotípicamente mixta con t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
- Leucemia Aguda fenotípicamente mixta con t(v;11q23.3); reordenamiento *KMT2A*
- Leucemia Aguda fenotípicamente mixta, mieloide/linfoide B, no específica
- Leucemia Aguda fenotípicamente mixta, mieloide/linfoide T, no específica

Hasta la fecha se han identificado muchas alteraciones genéticas con valor pronóstico en pacientes con LMA, que permite una estratificación en grupos de riesgo más simplificada, y por lo tanto más práctica, capaz de discriminar satisfactoriamente supervivencia global (SG) y tasa de remisión completa (RC).⁽⁷⁾ En este sentido, la organización *European LeukemiaNet* (ELN) publicó en 2010 la primera recomendación de clasificación en LMA que incorpora criterios moleculares,⁽⁸⁾ revisada en 2017⁽⁹⁾, donde se establece tres grupos según riesgo pronóstico, tabla 2.

Grupo de riesgo pronóstico	Alteraciones genéticas
FAVORABLE	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> bajo†
	<i>CEBPA</i> bialélico mutado
INTERMEDIO	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> alto †
	<i>NPM1</i> wt sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> bajo† (en ausencia de alteraciones de riesgo)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ‡
	Alteraciones citogenéticas no clasificadas en riesgo favorable/adverso
ADVERSO	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); reordenamiento de <i>KMT2A</i>
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i>
	-5 o del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Cariotipo complejo;§ Monosomías
	<i>NPM1</i> wt y <i>FLT3-ITD</i> alto †
	<i>RUNX1</i> mutado¶
	<i>ASXL1</i> mutado¶
<i>TP53</i> mutado#	

Tabla 2. Clasificación de la LMA en Grupos de Riesgo Pronóstico Según ELN-2017.

bajo†, ratio *FLT3-ITD* < 0,5; alto†, ratio *FLT3-ITD* ≥ 0,5;

‡ La presencia de t(9;11) (p21.3;q23.3) tiene prioridad sobre las mutaciones genéticas de riesgo adverso.

§ Tres o más anomalías cromosómicas no relacionadas en ausencia de una de las translocaciones o inversiones recurrentes designadas por la OMS, es decir, t(8;21), inv (16) o t (16;16), t (9;11), t(v;11) (v;q23.3), t(6;9), inv (3) o t (3;3); LMA con *BCR-ABL1*.

|| Definido por la presencia de una monosomía única (excluida la pérdida de X o Y) en asociación con al menos una monosomía adicional o anomalía cromosómica estructural (excluyendo el factor de unión al núcleo).

¶ No deben usarse como un marcador de pronóstico adverso si coinciden con subtipos de LMA de riesgo favorable.

Las mutaciones en *TP53* se asocian significativamente con la LMA con cariotipo complejo y monosómico.

1.4. LA NUEVA ERA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

1.4.1. VARIANTES GENÓMICAS

Las variantes genómicas se definen como alternativas alélicas del genoma y se clasifican como germinales si se presentan en células de la línea germinal (células precursoras de gametos) o somáticas si ocurren en células somáticas (células no sexuales que conforman el crecimiento de los tejidos y órganos). Cuando la variante involucra al menos dos nucleótidos, ya sea por duplicación, inserción o delección, se denominan **InDels** y siempre que no superen 1 Kb ya que en este caso pasaríamos a hablar de variantes estructurales. Mientras que si afectan a un solo nucleótido se denominan **SNVs**. (del inglés, *Single Nucleotide Variant*). Además, centrándonos en variantes localizadas en regiones codificantes y según su impacto en la secuencia proteica, se clasifican en:

- **missense**, la variante provoca un cambio de un aminoácido.
- **silent**, la variante no altera la secuencia de aminoácidos.
- **nonsense**, la variante provoca un cambio de un aminoácido pero esta además se localiza en un codón de terminación.
- **frameshift**, hay un cambio en la pauta de lectura como consecuencia de una inserción o delección de uno o varios nucleótidos.

1.4.2. PRIORIZACIÓN Y CATEGORIZACIÓN DE VARIANTES SOMÁTICAS

No todas las variantes somáticas tienen un impacto relevante en la patología objeto de estudio. Sino que se trata mayoritariamente de polimorfismos, variantes con una frecuencia alélica (VAF, del inglés *Variant Allele Frequency*) $\geq 1\%$, o variantes tipo *passengers*, sin impacto desencadenante de la patogénesis de la enfermedad.

Por ello es necesario discriminar tipos de variantes e identificar variantes somáticas *drivers*, asociadas a efectos fundadores de la patología y por lo tanto tienen relevancia clínica.

Incluso estas variantes podrían establecerse como un biomarcador, si cumple alguna de las siguientes condiciones:⁽¹⁰⁾

- altera la función del gen
- influye en el pronóstico de la enfermedad
- detecta precozmente el cáncer
- predice sensibilidad, resistencia o toxicidad a una terapia específica

Dentro de un contexto clínico, las variantes eran clasificadas en 5 categorías: patológica, probablemente patológica, de significado incierto, probablemente benigna y benigna; según recomendaciones del *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* y *American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists*.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, estos criterios han sido actualizados por la propia ACMG,⁽¹¹⁾ y las variantes somáticas se estratifican actualmente, según su condición exclusivamente clínica (figura 1) en 4 grandes categorías:

- **tier I**, variantes con fuerte significación clínica
- **tier II**, variantes con significación clínica potencial
- **tier III**, variantes con significación clínica incierta
- **tier IV**, variantes benignas o presuntamente benignas

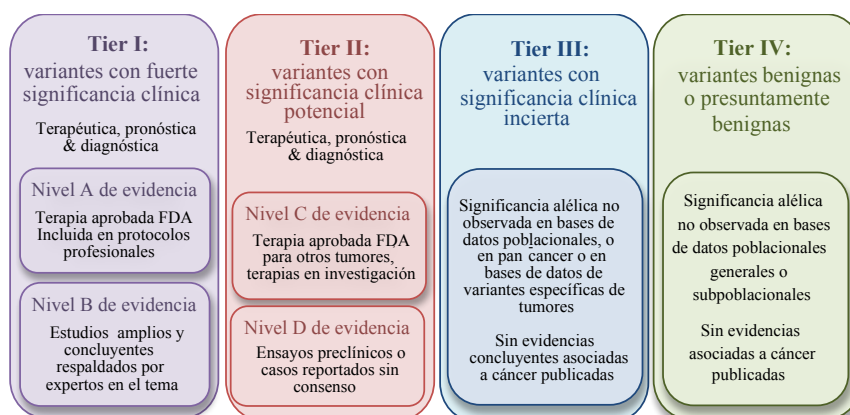


Figura 1. Categorización de las Variantes Basada en Criterios Clínicos.

Las variantes somáticas han sido clasificadas en 4 grupos jerarquizados según relevancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica. Algunos grupos incluyen varios niveles de evidencia. FDA, Food and Drug Administration. Modificado de *Li et al. Jmd.2016*.

1.4.3. GENÓMICA EN LA LMA

En la última década, son muchos los estudios genómicos llevados a cabo gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva que han permitido identificar nuevas mutaciones genéticas asociadas a LMA y establecer un catálogo de genes involucrados en LMA.⁽¹²⁻¹⁶⁾ Incluso algunas alteraciones con significación pronóstica ya han sido reportadas para algunos genes, incluidos *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *WT1* y *RUNX1*.^(14, 17)

Estos avances, junto con el incremento de precisión de tecnologías tradicionales (bandeo cromosómico, FISH, arrays de expresión, clonación y secuenciación por Sanger) han permitido prosperar en el conocimiento de la LMA, su caracterización molecular y citogenética, así como en la clasificación dentro de subgrupos en función de las anomalías identificadas, figura 2.⁽¹⁸⁾

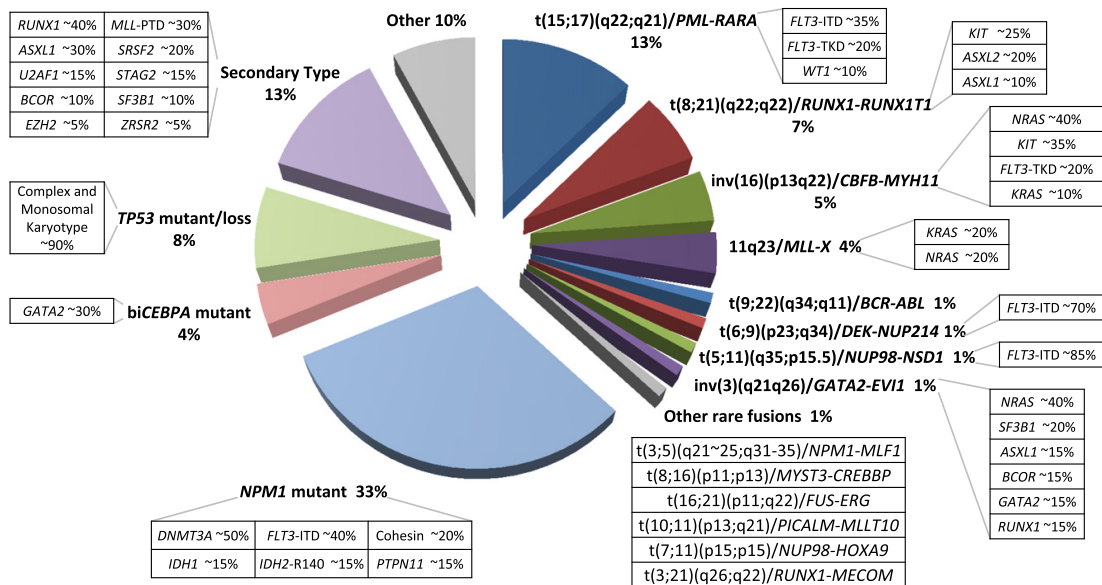


Figura 2. Grupos de Pacientes con LMA Según Perfil Citogenético y Molecular.

La distribución de patrones citogenéticos y moleculares define grupos de LMA con identidad biológica y pronóstica propia. Modificado de *Grimwade et al. Blood, 2016*.

Un tercio de los pacientes se caracterizan por la presencia de reordenamientos cromosómicos balanceados,⁽¹⁹⁾ que dan lugar a proteínas quiméricas que conforman el evento iniciador de patogénesis. Estos reordenamientos son mutuamente excluyentes de mutaciones en *NPM1* y de mutaciones bialélicas en *CEBPA*, conformando dos grupos independientes que a su vez se asocian típicamente a cariotipo normal.⁽²⁰⁾

Otro gran grupo (8%) está definido por pacientes con mutaciones en *TP53*, la cual además se relaciona a cariotipo complejo.⁽²¹⁾ El resto de pacientes presentan otros espectros mutacionales en menor frecuencia, dentro de los cuales un alto porcentaje (13% de los casos) se asocian a LMA secundarias derivadas de un síndrome mielodisplásico (SMD) previo.⁽²²⁾

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por caracterizar patrones moleculares sigue existiendo una alta heterogeneidad molecular ligada a la LMA, lo cual obliga a reducir el estudio en la rutina

clínica a alteraciones moleculares en *NPM1*, *FLT3* y *CEBPA*, con la reciente incorporación de *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53* según criterios de la última actualización establecida por la ELN.⁽⁹⁾

Los genes frecuentemente mutados en LMA pueden ser reorganizados en categorías funcionales, con el fin de abordar mejor el efecto fisiopatológico de las alteraciones en los mismos, ver figura 3. Aunque algunos forman una entidad propia por sí mismos, como en el caso de *NPM1* o *CEBPA*.

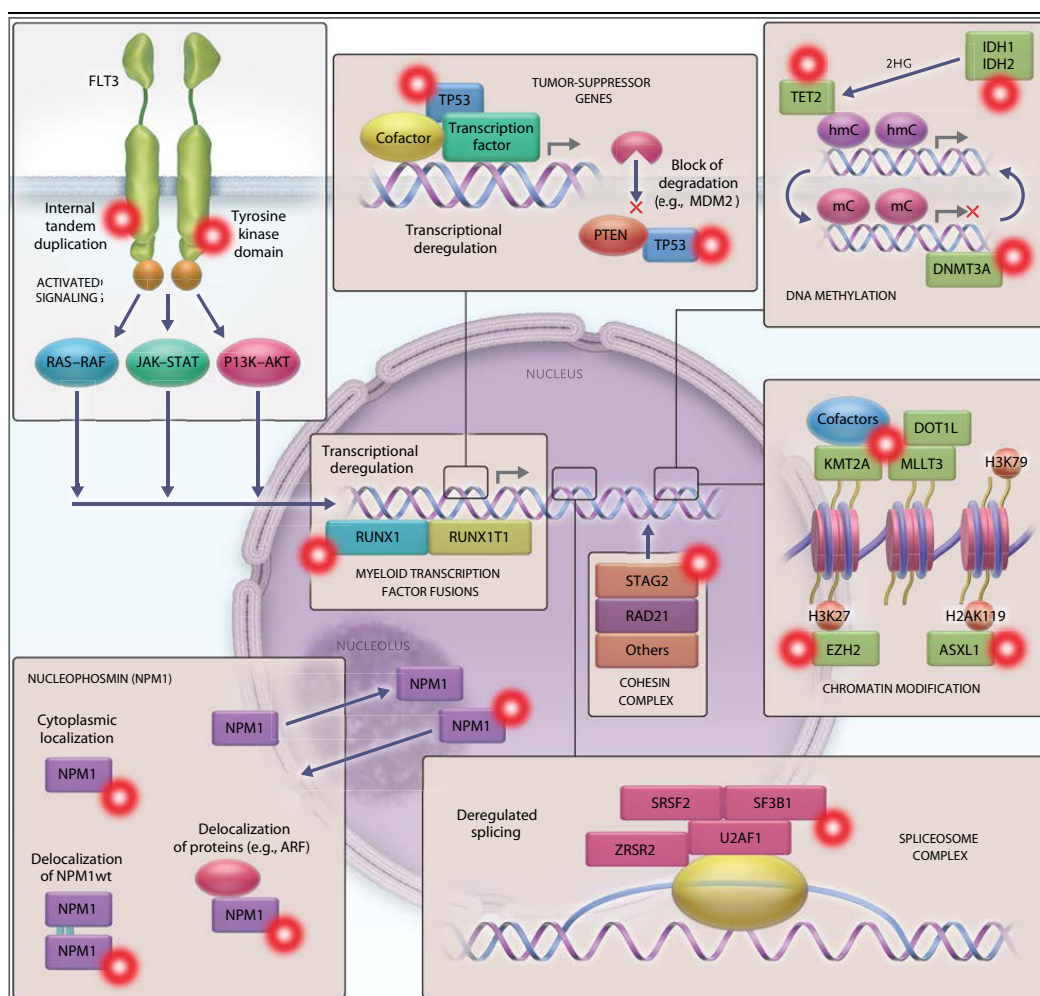


Figura 3. Categorías Funcionales de Genes Comúnmente Mutados en la LMA.

Las mutaciones en genes de señalización, como *FLT3*, confieren una ventaja proliferativa a través de las rutas de señalización *RAS-RAF*, *JAK-STAT* y *PI3K-AKT* (cuadro superior izquierdo). Las mutaciones en los factores de transcripción mieloides como *RUNX1* y el transcrito de fusión asociado *RUNX1-RUNX1T1*, conducen a la desregulación transcripcional y la alteración en la diferenciación hematopoyética (cuadro central izquierdo). Mutaciones en el gen *NPM1*, dan como resultado la localización citoplásmica aberrante de esta proteína y proteínas de interacción con esta (cuadro inferior izquierdo). Las mutaciones de los genes del complejo espliceosoma (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* y *ZRSR2*) están implicadas en el procesamiento de ARN desregulado (cuadro inferior derecha). Las mutaciones del complejo de la cohesina, *STAG2* y *RAD21*, alteran la segregación cromosómica y la regulación transcripcional (caja central del medio). Las mutaciones de los genes implicados en la homeostasis epigenética de las células, *ASXL1* y *EZH2*, conducen a la desregulación de la modificación de la cromatina. Tráscritos de fusión del gen *KMT2A-MLLT3*, puede dañar otras metiltransferasas tales como *DOT1L* (metiltransferasa de histona H3K79 tipo DOT1) (cuadro central derecha). Las mutaciones en *DNMT3A* y *TET2*, así como las mutaciones en *IDH1* e *IDH2*, que actúan a través de la producción del metabolito 2-hidroxiglutarato (2HG), pueden conducir a la desregulación de la metilación del ADN (hmC denota 5-hidroximetil-citosina y mC5-metilcitosina) (arriba cuadro derecho). En genes supresores de tumores como *TP53*, las mutaciones pueden conducir a desregulación transcripcional y alteración en la degradación a través de *MDM2* y *PTEN* (cuadro media superior). Modificado de *Döhner*, 2015.

A continuación se detallan los genes más relevantes en LMA:

♦ CCAAT enhancer-binding protein alpha, *CEBPA*.

Este gen codifica para un factor de transcripción implicado en mielopoyesis mediante control de proliferación y diferenciación de progenitores mieloides. Las mutaciones en *CEBPA* solo se han descrito en LMA y en ausencia de factores pronóstico adversos.⁽²³⁾

♦ Nucleofosmina 1, *NPM1*.

Este gen codifica una chaperona de naturaleza ubicua predominante en el nucléolo aunque se desplaza al citoplasma para la participación en la síntesis de ribosomas, duplicación del centrosoma, estabilidad genómica, progresión del ciclo celular y apoptosis. Para ejercer esta última función requiere interacción con *TP53* y p19ARF (ambos supresores de tumores).

Mutaciones somáticas localizadas en el exón 12 del gen *NPM1* consolidan la alteración genética más común en la LMA, identificada en el 25-30% de los pacientes alcanzando una frecuencia del 60% dentro de los pacientes con cariotipo normal. En ausencia de *FLT3-ITD*, *NPM1* se asocia a pronóstico favorable. Se establece como marcador de enfermedad mínima residual (EMR),⁽²⁴⁾ y marcador predictivo de recaída,⁽²⁵⁾ ya que presenta cierta estabilidad a lo largo de la evolución de la enfermedad. Se han descrito 55 mutaciones distintas dentro del exón 12 de *NPM1*, sin embargo el 75-80% de las mutaciones identificadas son del tipo A, una mutación *frameshift* (inTCTG) que altera el extremo C-terminal ⁽²⁴⁾ y la pérdida de residuos de triptófano, generando una señal de exportación permanente del núcleo al citoplasma y su acumulación aberrante.⁽²⁵⁾

♦ Genes implicados en regulación transcripcional: *EZH2*, *ASXL1*, y *PHF6*

– **Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit, *EZH2*:** mutaciones en este gen, presente en menos del 5% de los pacientes con LMA, se asocia a pronóstico adverso.⁽²⁶⁾ *EZH2* mutado actúa como un oncogen en cáncer, y promueve la activación constitutiva de esta proteína con actividad metiltransferasa. Causan hipermetilación de histonas y por lo tanto metilación del ADN y la consecuente represión transcripcional de ciertos genes supresores de tumores.⁽²⁷⁾

– **Sex combs-like gene, *ASXL1*:** es una proteína que actúa reprimiendo la transcripción de genes mediante unión a la cromatina. Este gen está mutado en 10-20 % de los pacientes con LMA y se asocia a pronóstico adverso.⁽²⁶⁾ Su frecuencia aumenta con la edad, además se asocia a hematopoyesis clonal en personas sanas de edad avanzada así como a eventos tempranos en la leucemogénesis, justificando su relación a LMA secundarias derivadas de SMD.⁽²²⁾ Mutaciones en *ASXL1* alteran la actividad de PCR2 (polycomb repressive complex-2), decae la regulación de H3K27me3 y se reprime el dominio de unión. Además, desencadena indirectamente disminución de interacción de *EZH2* con la cromatina. ⁽²⁸⁾

– **PHD finger protein 6, *PHF6***, gen ligado al cromosoma X e implicado en el remodelamiento de la cromatina. Mutaciones en este gen se presentan en 2-3% de la población con LMA y se ha confirmado su pronóstico adverso en pacientes de riesgo intermedio sin *FLT3*-ITD mutado.⁽²⁹⁾

♦ Genes implicados en regulación epigenética: *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*, *KDM6A* y *KMT2A*

Los cambios epigenéticos afectan en la transcripción y traducción de los genes. Existen varios mecanismos por los que pueden llevarse a cabo la regulación epigenética: metilación ADN, hipometilación del ADN y modificación de histonas. Las histonas pueden ser modificadas por metilación, acetilación, fosforilación, ADP-ribosilación y ubiquitinización, afectando la estructura de la cromatina y la accesibilidad al ADN.

– **DNA metiltransferasa 3A, *DNMT3A***: enzima que cataliza la adición *de novo* de grupos metilo en residuos citosina dentro de islas CpG del ADN. Mutaciones en este gen se han identificado en el 10-25% de los pacientes con LMA, causando activación constitutiva y la consecuente hipermetilación de islas CpG. Si se localizan dentro de promotores de genes supresores de tumores causa el silenciamiento de los mismos.^(26, 30) Se asocia a hematopoyesis clonal en personas sanas de edad avanzada, así como a eventos tempranos en la leucemogénesis. De manera generalizada persiste durante la remisión completa por lo que pierde su interés como marcador de supervivencia o de EMR.⁽³¹⁾ Co-expresan con mutaciones en *NPM1* y *FLT3*-ITD, indicando cooperación en la patogénesis de LMA.⁽³²⁾

La hidroxilación de citosinas metiladas es uno de los mecanismos de reversión de la metilación de ADN en islas CpG, liberando la represión que pudiera existir sobre genes supresores de tumores. Sin embargo, mutaciones en los genes hipometilantes, *TET2*, *IDH1* e *IDH2*, que son a su vez mutuamente excluyentes impiden este mecanismo.

– **Tet metilcitosina dioxygenasa-2, *TET2***: enzima de la familia de oncogenes *TET*. Encargada de catalizar el paso de 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (5hmC). Mutaciones en este gen son altamente frecuentes en otras patologías mieloides como SMD⁽³³⁾ y se detectan en 5-25% de los pacientes con LMA. Mutaciones en este gen implica pérdida de función, e hipermetilación del ADN y aunque existen muchos estudios su papel directo en leucemogénesis no es clara aún. Se asocia a hematopoyesis clonal en personas sanas de edad avanzada, y a eventos tempranos en la leucemogénesis. Su frecuencia aumenta en pacientes edad avanzada.⁽¹⁶⁾

– **Isocitrato deshidrogenasa-1, *IDH1* y -2, *IDH2***: isoformas de una de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs. *IDH1* se localiza en el citoplasma y en peroxisomas mientras que *IDH2* se localiza en la mitocondria. Mutaciones en estos genes son mutuamente excluyentes en tumores mieloides de mutaciones en *TET2* y se concentran en residuos de arginina altamente conservados (132 para *IDH1*, y 140 y 172 para *IDH2*). Ambos se presentan con una frecuencia del 5-10% en pacientes con LMA.⁽³⁴⁾

Implican principalmente pérdida de función y reducción final de NADPH. Sin embargo, mutaciones que generan ganancia de función provocan acumulación de 2-hidroxiglutarato y la consecuente inhibición de dioxigenasas dependientes de alpha-ketoglutarato, como *TET2* e hidroximetilación del ADN,⁽²⁶⁾ así como la inhibición de enzimas tipo demetilasa de histonas, lo que condiciona el incremento de metilación de las mismas (H3K27, H2K9 y H3K4).⁽²⁸⁾

Además, mutaciones en estos genes se asocian a hematopoyesis clonal así como a eventos tempranos en la leucemogénesis y se observa en personas sanas de edad avanzada. Tienen especial interés porque supone dianas terapéuticas alternativas en desarrollo clínico.⁽¹⁶⁾

– **Lisina-(K) metiltransferasa 2A, *KMT2A*:** denominada antiguamente *MLL*. Metiltransferasa reguladora de la transcripción de genes mediante unión a regiones promotoras y metilación de histonas. Controlando así la expresión de genes, en concreto genes *HOX* implicados en proliferación y diferenciación celular.⁽²⁶⁾ Reordenamientos en este gen son ampliamente conocidos en varios tipos leucémicos, sin embargo en pacientes con LMA destaca la recurrencia de duplicaciones parciales en tándem (*KMT2A-PTK*). Tiene una frecuencia poblacional de 4-14% y se asocia a peor pronóstico especialmente en LMA de cariotipo normal.⁽²⁹⁾

– **Lisina-(K) demetilasa 6A, *KMD6A*:** este gen se localiza en el cromosoma X y codifica para una demetilasa que cataliza la desmetilación de la histona H3 trimetilada a dimetilada.

♦ Genes implicados en *splicing*: *SF1*, *SF3A1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *PRPF40B* y *ZRSR2*

Mutaciones en componentes del complejo del espliceosoma resulta en *splicing* anómalo de genes involucrados en diferenciación y proliferación de precursores mieloides. Su frecuencia es muy baja y varía mucho entre los estudios reportados. Se asocian con hematopoyesis clonal en individuos sanos de edad avanzada. Por lo que también se asocia a pacientes mayores, además de a LMA secundarias y a pronóstico adverso.⁽¹⁶⁾

♦ Genes implicados en señalización de citoquinas y vías *JAK/STAT*: *FLT3*, *KIT*, *JAK2*, *SH2B3*, *EPOR*, *MPL* y *CBL*

– ***Fms-like* tirosin kinasa-3, *FLT3*:** receptor tirosin kinasa involucrado en proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, la activación por homo-dimerización origina la activación mediante fosforilación de la vías *STAT*, *AKT/p13K* y *MAPK*. Las duplicaciones en tándem tipo *in frame* (ITD) en el dominio juxta-membrana (exón 14-15) constituye la alteración más recurrente en este gen y una de las más frecuentes en LMA (25%). Mutaciones en el exón 20 en el dominio tirosin kinasa (TKD) también activa constitutivamente el receptor *FLT3*, y constituye la segunda mutación más recurrente en este gen (7-8%). Numerosos estudios han confirmado la mutación *FLT3*-ITD es un marcador independiente asociado a recaída y a peor pronóstico, incluso en presencia de mutaciones clasificadas de buen pronóstico como *NPM1* o *CEBPA*.^(16, 26, 34); mientras que la mutación *FLT3*-TKD se asocia a buen pronóstico.⁽³⁵⁾

– **receptor tirosin kinasa, *KIT***: es un receptor tirosin kinasa que ocasionalmente presenta mutaciones en pacientes con LMA (>5%), y siempre asociado al del grupo *CBF-LMA*.⁽³⁶⁾

El grupo *CBF* considerado de buen pronóstico clínico constituye el 15% de las LMA e incluye pacientes con t(8;21), inv(16) o t(16;16). Las mutaciones más recurrentes en el gen *KIT* se localizan en los exones 8 y 17 resultando en la activación del receptor, y adquiriendo función proto-oncogénica y adquiriendo bajo esta situación valor pronóstico adverso.⁽²⁶⁾ Especialmente interesante por la disposición de un inhibidor TK específico en desarrollo clínico. ⁽¹⁶⁾

– **Janus-kinase-2, *JAK2***: se trata de una tirosin kinasa involucrada en crecimiento celular y diferenciación, responsable de la fosforilación de las proteínas *STAT* y su posterior traslocación al núcleo. Mutaciones en este gen son infrecuentes y se localizan en el grupo de *CBF-LMA*.⁽²⁶⁾

♦ Genes asociados a la vía RAS: *HRAS*, *KRAS* y *NRAS*

– ***HRAS*, *NRAS* y *KRAS***: pertenecen la familia de GTPasas tipo RAS. *NRAS* está presente en 10-15% de los pacientes con LMA, sin embargo *KRAS* solo representa el 2% de los pacientes en edad adulta y un 9% en menores de edad. Mutaciones en la vía RAS tiene un pronóstico neutro, sin embargo se ha visto relacionado al grupo *CBF-LMA*⁽²⁹⁾, asociándose indirectamente a buen pronóstico.^(37, 38)

♦ Genes asociados a factores de transcripción: *ETV6* y *RUNX1*

– ***runt related transcription factor 1, RUNX1***: codifica para la subunidad alpha del heterodímero *CBF*, implicado en transcripción. La alteración t(8;21) en este gen da lugar a una proteína de fusión, *RUNX1-RUNX1T1*, que define uno de los dos perfiles del grupo *CBL-LMA*. Mutaciones puntuales en este gen alcanzan una frecuencia poblacional de 5-18% de los pacientes con LMA, y su frecuencia aumenta con la edad. Normalmente asociado a peor pronóstico aunque de manera no concluyente.^(16, 29) *RUNX1* se halla mutado también en el 10% de los pacientes con SMD, lo que podría justificar por qué un gran número de pacientes del subgrupo de LMA secundarias derivada de esta patología previa.⁽³⁹⁾

– **ETS variant 6, *ETV6***: codifica un factor de transcripción fundamental en la hematopoyesis. Mutaciones germinales en *ETV6* están implicadas en el desarrollo de leucemia linfática aguda ^(40, 41) Pero también en la transformación de SMD a LMA. (Patron E, Blood 2015).

♦ Genes asociados a supresor de tumores: *VHL*, *TP53* y *PTEN*

– **Tumor protein p53, *TP53***: supresor de tumor altamente representativo en cáncer. Participa en diversas funciones fisiológicas de la célula para mantener la integridad y estabilidad genómica de la misma, destacando su papel en la regulación del ciclo celular en respuesta a condiciones de estrés.

Mutaciones en este gen se ha determinado en el 2-9% de los pacientes con LMA, está asociado a pacientes con cariotipo complejo, y a pacientes con LMA derivada de otros tratamientos quimioterápicos.⁽⁴²⁾ Además raramente se co-expresa con mutaciones en *CEBPA*, *NPM1*, *FLT3-ITD*, *ASXL1* o *RUNX1*.

– **von Hippel-Lindau tumor suppressor, *VHL***: codifica una proteína supresora de tumores que se poliubiquitila mediante un factor dependiente de oxígeno (HIF). En ausencia de esta proteína HIF induce la expresión de genes diana, muchos de los cuales importantes en la regulación de la angiogénesis, crecimiento celular y supervivencia celular.⁽⁴³⁾ Mutaciones somáticas de este gen se han relacionado con el desarrollo de hemangioblastomas esporádicos y carcinomas renales.^(43, 44)

– ***phosphatase and tensin homolog, PTEN***: supresor tumoral que se encuentra mutado con alta frecuencia en gran cantidad de cánceres. Codifica para una proteína capaz de modificar a otras proteínas y lípidos mediante eliminación de grupos fosfatos. Además, PTEN regula negativamente la vía de señalización AKT-PKB. La presencia de PTEN mutado se asocia con un mayor riesgo de recaída en la leucemia linfoblástica aguda de células T infantil.

1.5. TRATAMIENTOS TERAPEÚTICOS EN LMA

En este trabajo se contempla el protocolo terapéutico establecido por *PETHEMA* (Programa Español de Tratamientos en Hematología), cuyo abordaje se centra en un primer tratamiento de inducción a remisión completa (RC) y un tratamiento de consolidación, enmarcados en dos protocolos discriminados por la edad del paciente.

1.5.1. TRATAMIENTO EN PACIENTES \leq 65 AÑOS

Los esquemas de tratamiento destinados a pacientes jóvenes (\leq 65 años) se componen de un primer tratamiento de inducción a la RC basado en dosis combinadas de citarabina (Cita o ARA-C, 200 mg/m²) y una antraciclina, generalmente idarubicina (Ida, 12 mg/m²). El paciente recibe entonces el denominado esquema 3+7, citarabina durante los 7 primeros días, acompañado de idarubicina durante los 3 primeros días.

Si el paciente alcanza RC, ver tabla 3 y figura 4, tras 1-2 ciclos de inducción, pasa al tratamiento de consolidación basado en quimioterapia intensiva (2-4 ciclos) con o sin trasplante hematopoyético (TPH) en función del grupo pronóstico a la que pertenece el paciente.

El tratamiento de consolidación para pacientes de riesgo favorable consiste en dos ciclos de citarabina a dosis altas (3 g/m²/12h días 1, 3 y 5), seguido de trasplante autólogo (autoTPH) y acondicionamiento con BEA (busulfán: 3,2 mg/m²/día los días 1 a 4; etopósido: 20 mg/kg/día los días 5 y 6; citarabina: 3 g/m²/12h los días 6 y 7).

Si no ha sido posible recolectar células progenitoras hematopoyéticas se sustituirá el TPH por un tercer ciclo de consolidación, ver figura 4.

El tratamiento de consolidación de los pacientes de riesgo intermedio consiste en un ciclo de citarabina (200 mg/m²/día, días 1, 3 y 5) combinado con idarubicina (12 mg/m²/día, días 1-3). Si se dispone de un donante familiar HLA idéntico se recomienda proceder a aloTPH, en caso contrario se administrará un segundo ciclo de consolidación con citarabina a dosis altas (3 g/m²/12h, días 1, 3 a 5) seguido de autoTPH con acondicionamiento BEA. En caso de no haber sido posible la recolección de progenitores hematopoyéticos se sustituirá el TPH por un tercer ciclo de citarabina a dosis altas, ver figura 4.

TIPO	Aspirado de MO	Recuento en SP
Remisión completa (RC)	Valorable, < 5% blastos	PMN \geq 1·10 ⁹ /L Plaquetas \geq 100·10 ⁹ /L Ausencia de blastos leucémicos
Remisión sin recuperación (RCi)	Valorable, < 5% blastos	PMN < 1·10 ⁹ /L y/o Plaquetas < 100·10 ⁹ /L Ausencia de blastos leucémicos
Remisión parcial (RP)	Valorable, 5-25% blastos, con disminución > 50% respecto al diagnóstico	Ausencia de blastos leucémicos
Resistencia absoluta	Valorable, > 25% blastos y/o reducción de blastos < 50% respecto al diagnóstico	-
Muerte	-	-

Tabla 3. Criterios de Respuesta a la Quimioterapia de Inducción.

Respuesta al tratamiento de inducción y criterios según estudio de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP). Si el paciente presenta menos del 5% de blastos en MO, alcanza remisión completa (RC) si el recuento en SP es óptimo, o remisión incompleta (RCi) en caso contrario. Si presenta entre un 5-25% de blastos en MO pero este valor corresponde a la mitad o menos de los blastos detectados al diagnóstico, el paciente alcanza remisión parcial (RP). Y si presenta más de un 25% blastos el paciente no ha respondido a la terapia y presenta refractariedad primaria. PMN = leucocito polimorfonuclear.

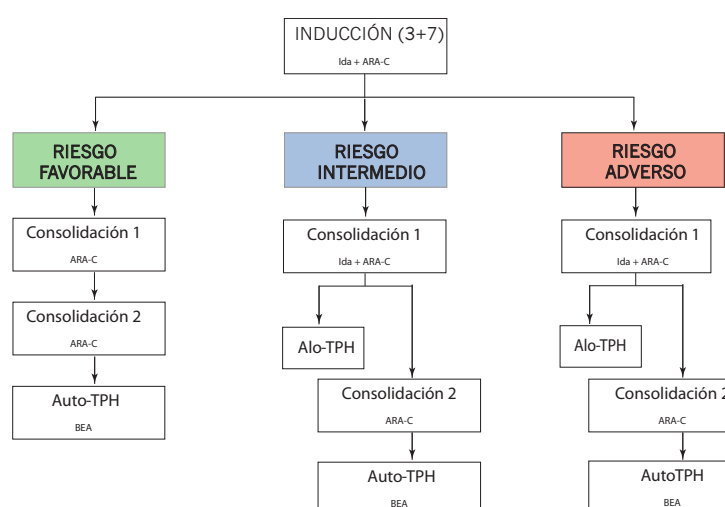


Figura 4. Tratamiento Estándar Para Pacientes con LMA ≤ 65 Años.

Representación del esquema 3+7 y opciones alternativas según riesgo pronóstico del paciente. Ida=idarubicina; ARA-C=citarabina, Alo-TPH= trasplante hematopoyético alogénico; Auto= trasplante hematopoyético autólogo; BEA=busulfán+etopósido+citarabina.

El tratamiento de consolidación de los pacientes de riesgo adverso incluye como primera opción el TPH alogénico, ya sea de donante familiar HLA idéntico o donante alternativo y se realiza tras recibir el primer ciclo de consolidación con citarabina (200 mg/m²/día, días 1, 3 y 5) e idarubicina (12 mg/m²/día, días 1-3).

En el caso de pacientes de alto riesgo que no dispongan de donante o en los que exista contraindicación para el TPH alogénico, se le administra dos ciclos de consolidación seguido de TPH autólogo con acondicionamiento BEA. En caso de no haber sido posible la recolección de progenitores hematopoyéticos se sustituirá el TPH por un tercer ciclo de citarabina a dosis altas, ver figura 4.

1.5.2. TRATAMIENTO EN PACIENTES > 65 AÑOS

Los pacientes con edad comprendida entre 65 y 70 años son estudiados mediante FISH/PCR/ cariotipo convencional para la detección de reordenamientos asociados a *CBF*:

- t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
- inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*.

Si el paciente es *CBF* positivo seguirá protocolo descrito para pacientes ≤65 años reduciendo la dosis de ARA-C de 3 a 1 g/m²/12h. Por el contrario, los pacientes ≤70 años *CBF* negativo o los pacientes >70 años, recibirán quimioterapia según esquema FLUGA, compuesto por tratamiento de inducción, tratamiento de consolidación y tratamiento de mantenimiento, figura 5.

Inducción: 1 ciclo de FLUGA:

- Fludarabina: 25-40 mg/m²/día, días 2 a 6; se suprime día 6 en pacientes ≥ 75 años.
- Citarabina: 75 mg/m²/día, días 2 a 5.
- G-CSF: 5 µg/kg/día, días 1 a 3; suprimir día 3 si leucocitos >10·10⁹/L, omitir si > 25·10⁹/L.

Consolidación: 2 ciclos de FLUGA.

Los pacientes que alcancen RC, RCi o RP tras la inducción, con recuperación hematológica (PMN > 1·10⁹/L), recibirán 2 ciclos sucesivos de consolidación equivalentes al ciclo de inducción. Los pacientes menores ≤ 70 años que alcancen RC o RCi tras el tratamiento de consolidación, pertenezcan al grupo de riesgo favorable y presenten buen estado general, son llevados a TPH autólogo (acondicionamiento con BEA), siempre y cuando sea posible recolección de progenitores hematopoyéticos.

El resto de pacientes seguirán tratamiento de mantenimiento, compuesto por 6 ciclos mensuales de monoterapia de baja intensidad:

- ciclos 1, 3 y 5: citarabina 75 mg/m²/día, días 1 a 4
- ciclos 2, 4 y 6: fludarabina 40 mg/m²/día, días 1 a 5; descartar día 5 en pacientes ≥ 75 años.

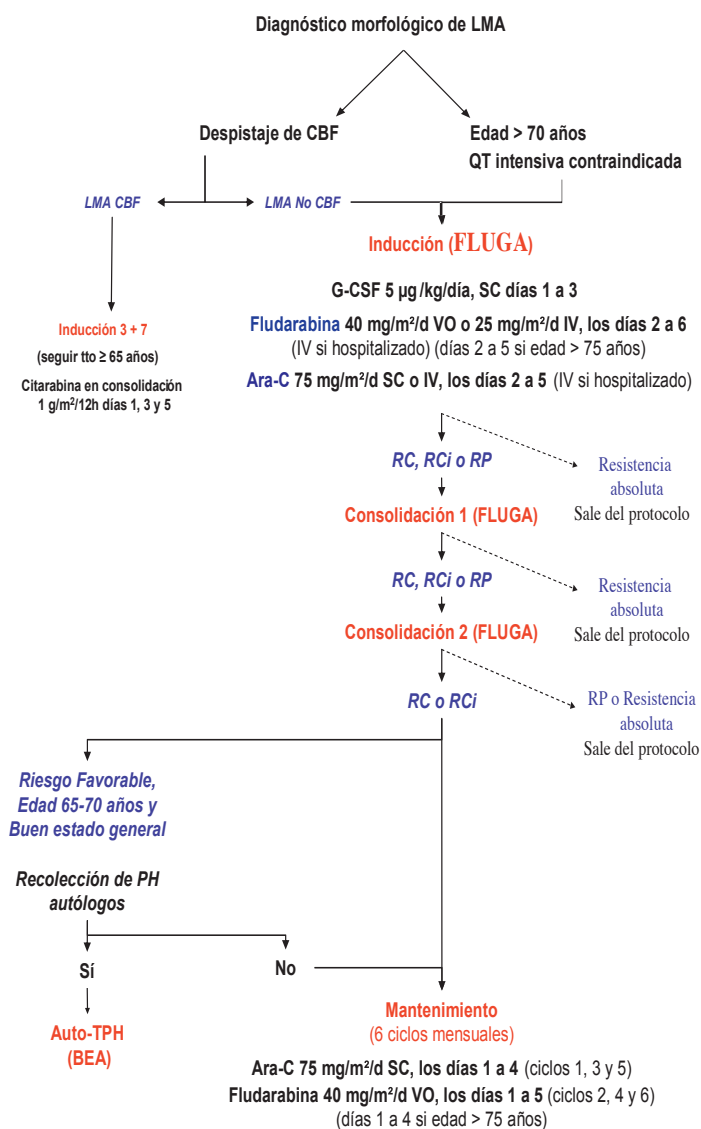


Figura 5. Tratamiento Estándar Para Pacientes con LMA ≥ 65 Años

QT= quimioterapia; SC=subcutáneo; VO=oral; IV=intravenoso; tto=tratamiento; PH=progenitores hematopoyéticos; CBF=core binding factor

1.6. FRACASO TERAPÉUTICO EN LMA

Aproximadamente el 20% de los pacientes con LMA presentan refractariedad primaria al tratamiento de inducción y no llegan a alcanzar RC. Y en torno al 50% de los casos la enfermedad resurge y el paciente recae.⁽⁴⁵⁾ Ambos escenarios, refractariedad primaria y recaída, suponen fracaso terapéutico asociado a pronóstico adverso y menos del 30% de los pacientes sobreviven 12 meses después de una recaída.^(46, 47) en el caso de recaída la SG de los pacientes se estima en no más del 30% a los 3 años.⁽⁴⁸⁾ Varios factores condicionan el pronóstico adverso en pacientes que sufren recaída, incluyendo citogenética adversa detectada en el diagnóstico, estado en RC menor a 12 meses, edad avanzada, y recaídas posteriores a un transplante hematopoyético.⁽⁴⁹⁾

En la última década se han hecho progresos significativos en la comprensión de la biología de la LMA y de los mecanismos de leucemogénesis de la misma. Gracias al avance de técnicas de última generación como NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*), se pueden identificar de forma rutinaria alteraciones genómicas recurrentes y establecer biomarcadores capaces de predecir el pronóstico incluso antes de iniciar el tratamiento de inducción, y a lo largo de la evolución clínica del paciente.

Sin embargo, la mayoría de los pacientes con LMA terminan falleciendo debido a la reaparición de la enfermedad tras una recaída debida a clones leucémicos no erradicados con la quimioterapia y que pueden emerger o evolucionar según varios patrones: ^(18, 50)

- a) el clon fundador o mayoritario adquiere nuevas mutaciones, se expande y se convierte en el clon de la recaída.
- b) un clon minoritario o subclon, independiente al clon fundador, resiste a la quimioterapia, adquiere nuevas mutaciones, se expande y se convierte en el clon dominante en la recaída.
- c) un clon ancestral, no debutante al diagnóstico, evoluciona y se convierte en el clon debutante en la recaída.
- d) el tratamiento desencadena la aparición de un nuevo clon, no presente anteriormente, generando realmente una segunda patología y no una recaída como tal, de manera análoga al proceso acontecido en LMA-t (LMA derivadas de otras terapias).

No obstante, se ha visto que la hematopoyesis se modifica fisiológicamente con la edad. Los individuos de edad avanzada presentan reducción de la síntesis de glóbulos rojos y de linfocitos, mientras que la producción de células mieloides se ve incrementada. Estos cambios alteran la distribución del ciclo celular, respuesta al daño del ADN y alteración de la expresión génica.⁽⁵¹⁾ Estudios recientes demuestran que la cantidad de mutaciones en células madre hematopoyéticas es proporcional a la edad y se acumulan con una tasa de $0,13 \pm 0,02$ mutaciones por año de vida.⁽⁵²⁾ De tal manera que individuos de edad avanzada portan mutaciones somáticas, normalmente por encima de ciertos niveles de VAF, que también han sido relacionadas con patologías hematológicas pero sin desarrollar la misma; dando cabida a la denominada *CHIP, clonal hematopoiesis of indeterminate potencial*.^(51, 53)

En este sentido, la hematopoyesis clonal se define como la presencia de mutaciones somáticas en genes asociados a tumores hematológicos que involucra la expansión clonal de una célula madre hematopoyética denominada clon. Este clon porta una o varias variantes genéticas específicas, disruptivas y recurrentes pero sin tener diagnóstico claro de tumor hematológico, aunque asociado a alto riesgo de desarrollarlo.

En técnicas como la NGS, donde los clones no pueden identificarse por celularidad, a diferencia de la citometría de flujo, los diversos clones fundadores o subclones se discriminan en base a los rangos de las frecuencias alélicas VAF que presentan las mutaciones detectadas.⁽⁵⁰⁾

La hematopoyesis clonal se ha observado tan solo en el 1% de individuos sanos < 50 años y en el 10% de individuos sanos \geq 60-65 años, lo que nos lleva a establecer un nuevo término para este último caso, *ARCH*, *age related clonal hematopoiesis*.^(54, 55) Estudios multivariables asocian la presencia de hematopoyesis clonal a un mayor riesgo de aparición de tumores hematológicos y a una menor supervivencia global, justificado por la selección positiva de los clones mutados permitiendo aumentar su tasa de renovación, incrementar su proliferación, y/o reducir la apoptosis. lo que nos lleva a pensar que la dinámica clonal de las células madre hematopoyéticas con anomalías pueden ser los desencadenantes de patologías hematológicas,⁽⁵⁶⁾ figura 6.

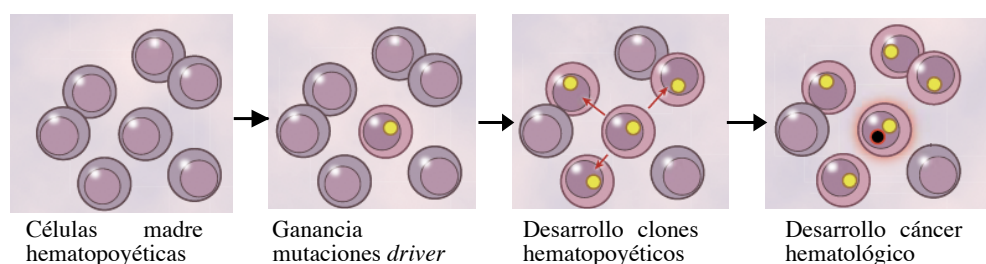


Figura 6. Prototipo de Expansión Clonal.

Modelo de evolución clonal a partir de una sola célula hematopoyética hasta generar una población clonal, bajo presión selectiva de una mutación somática (círculo amarillo), que desencadena cáncer hematológico con la subsecuente mutación (círculo negro-rojo). Modificado de *Genovese et al., 2014*.

Además, no hay que olvidar que un tercio de los pacientes con SMD evolucionan a LMA, en un proceso de evolución clonal en el que se han identificado varios genes involucrados, *NPM1*, *RUNX1*, *TP53* y *NRAS*. El clon dominante en LMA secundaria a SMD deriva de un clon fundador de SMD que persiste en algunos casos con un aumento del número de mutaciones derivada de la evolución. Originando una expansión policlonal, originada por diferentes clones que componen un mosaicismo de varios perfiles genéticos con una combinación de mutaciones única.⁽⁵⁷⁾

El estudio de la hematopoyesis clonal podría ser una estrategia para detectar estados pre-leucémicos en individuos sanos. Las mutaciones más frecuentes asociadas a la edad, en el contexto de la hematopoyesis clonal principalmente afecta a genes epigenéticos (*DNMT3A*, *TET2*), genes implicados en regulación transcripcional (*ASXL1*), genes de splicing (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) y genes implicados en control del ciclo celular (*TP53*).⁽⁵⁴⁾ Mutaciones en *DNMT3A* y *JAK2* incrementan en individuos con edad superior a 40, mientras que *SF3B1* y *SRSF2* lo hace con edades por encima de los 70.⁽⁵⁵⁾ Otros estudios han visto que hematopoyesis clonal se relaciona con mutaciones en *TET2*, *RUNX1*, *EZH2*, mientras que pacientes sin hematopoyesis clonal se asocia a *NPM1* y *FLT3*.⁽⁵³⁾

Recapitulando, CHIP y ARCH son términos que definen la presencia de mutaciones somáticas asociadas a tumores hematológicos con una VAF de al menos del 2% pero en ausencia de criterios convencionales de diagnóstico para la misma.^(53, 54)

Este hecho dificulta el estudio de la dinámica clonal a la hora de discriminar *drivers* implicados en la evolución de la LMA. Por ello, la identificación al diagnóstico de mutaciones asociadas a clones leucémicos podría ser de gran interés con el fin de detectar enfermedad el seguimiento del paciente que permita anticiparnos a la recaída.

1.7. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LMA

Durante más de 50 años, la RC en LMA se define por la recuperación funcional de la médula ósea, valorada mediante recuento celular en muestras de SP y por estudio citológico de MO que revele <5% de blastos, ver tabla 3.⁽⁵⁸⁾ Sin embargo este umbral, puede ser compatible con la presencia de células leucémicas en MO no detectables por las técnicas empleadas. Esta persistencia de células leucémicas tras el tratamiento en niveles muy minoritarios define el concepto de enfermedad mínima residual (EMR).⁽⁵⁹⁾

El estudio e identificación de células tumorales a lo largo de la evolución clínica de los pacientes en niveles tan minoritarios, del rango de 1 célula leucémica entre 10000 (10^{-4}) o 1000000 (10^{-6}), se denomina monitorización de la EMR. La monitorización de la EMR en LMA es todo un desafío debido a la alta heterogeneidad cito-molecular de esta patología. Existen varios abordajes técnicos para su estudio, basados en la identificación en médula ósea de la población leucémica con la misma identidad a la detectada en el diagnóstico. En la actualidad, y convencionalmente, la monitorización de la EMR se lleva a cabo mediante citometría de flujo (CMF) o PCR cuantitativa (qPCR).

La CMF detecta inmunofenotipos asociados a blastos leucémicos con alta aplicabilidad en pacientes con LMA (70-80%) y una sensibilidad en torno a 10^{-3} si se emplea paneles de anticuerpos monoclonales de 4 colores, y 10^{-4} si se emplea un panel de 8 colores. Sin embargo, es una técnica compleja y no estandarizada debido a la falta de consenso sobre el inmunofenotipo adecuado en caso de recaída, lo que obliga al uso de paneles de anticuerpos múltiples bajo criterios subjetivos.⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾

En contraposición la qPCR, es una técnica muy estandarizada con una alta sensibilidad, 10^{-4} - 10^{-6} . Aunque su aplicabilidad se limita al 40% de los pacientes con LMA que presentan alteraciones moleculares muy específicas (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*, *PML-RARA* o *NPM1*) en el momento del diagnóstico.⁽⁵⁹⁾

Numerosos estudios han demostrado el papel de la EMR como indicador pronóstico independiente y con un papel importante para establecer la clasificación pronóstica al diagnóstico, para la estratificación del riesgo de recaída y la planificación del tratamiento.⁽⁶²⁻⁶⁴⁾ Aunque todavía no se aplica de manera generalizada en la práctica clínica,⁽⁶⁵⁾ el concepto de RC por criterios morfológicos establecidos hasta el momento,⁽⁶⁶⁾ comienza a redefinirse mediante criterios adicionales relativos a EMR; tanto es así que que la última publicación de la *ELN LMA*

recommendation en 2017 ya incluye un nuevo criterio de respuesta al tratamiento denominado RC con/sin EMR.⁽⁹⁾

Determinar correctamente el estado de RC en un paciente es crucial puesto que decisiones terapéuticas, como puede ser recibir o no TPH, se basan en este criterio.⁽⁵⁸⁾ Por lo tanto, el estudio de EMR en LMA es necesario para evaluar el estado de remisión y optimizar la detención de una posible recaída, así como valorar la realización de tests de sensibilidad a drogas que nos permita elegir un tratamiento eficaz e intervenir tempranamente.⁽⁵⁹⁾ Hoy en día están surgiendo nuevas tecnologías, incluida la PCR digital (dPCR) y la NGS, que se están consolidando como plataformas potencialmente prometedoras para detectar y cuantificar la EMR. Especialmente la NGS es capaz de detectar mutaciones somáticas y cuantificar su VAF de manera específica para cada paciente tanto en el momento del diagnóstico como durante el tratamiento.⁽⁶⁵⁾

1.8. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EX VIVO.

El conocimiento de las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD) de los fármacos puede optimizar la terapia antileucemia mediante modelos PK/PD. Estos modelos PK/PD relacionan el curso temporal de los fármacos en el organismo, evaluada por la farmacocinética, y la intensidad de la respuesta observada, evaluada por la farmacodinámica.⁽⁶⁷⁾ Permitiendo a su vez, la estimación de parámetros como el efecto máximo (E_{max}), y la concentración que produce el 50% de respuesta máxima (EC_{50}).

La identificación de factores que justifiquen la variabilidad individual de respuesta a distintos fármacos o drogas anti leucemia ya sea de carácter biológico, experimental o debido al propio ajuste del modelo, pueden mejorar la evaluación de la eficacia del fármaco con el fin último de identificar malos respondedores al tratamiento, y que entonces estos pacientes tengan acceso a alternativas terapéuticas. O por lo contrario, identificar buenos respondedores al tratamiento y que entonces la dosis de los fármacos pueda optimizarse de manera personalizada evitando toxicidad injustificada.

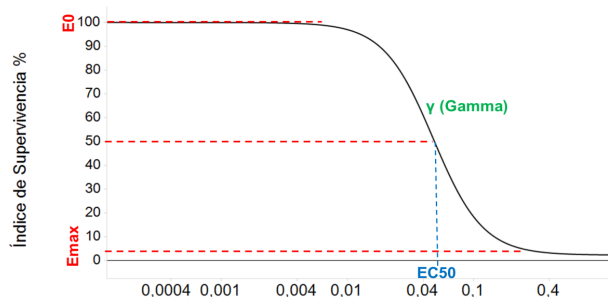
El modelo E_{max} sigmoide, ver figura 7, es el modelo PD más utilizado para generar los modelos finales PK/PD. Se basa en la ecuación de Hills, la cual asume que el efecto del fármaco se ve relacionado con el grado de ocupación del receptor del mismo.⁽⁶⁸⁾

La administración combinada de medicamentos produce diferentes interacciones que pueden sumarse, potenciarse o inhibirse. La farmacodinámica de las interacciones entre dos fármacos en ensayos combinados se caracteriza por el cálculo del índice de combinación estándar (CI, del inglés combinación index) establecido por Chou y Talalay,⁽⁶⁹⁾

Un parámetro cuantitativo que representa el efecto dependiente de varias drogas:

- $CI = 1$, indica aditividad. Los efectos de la dosis del fármaco A son iguales a los de la dosis del fármaco B, y a su vez, son iguales a la suma de la mitad de la dosis de A más la dosis de B.
- $CI < 1$, indica sinergismo. Los efectos de la dosis del fármaco A o del fármaco B son menores que los que se obtendrían con la suma de la dosis de A y la dosis de B.
- $CI > 1$, indica antagonismo. Los efectos de la dosis del fármaco A o del fármaco B son mayores que los que se obtendrían con la suma de la dosis de A y la dosis de B.

El CI proporciona una medida cuantitativa del grado de interacción de los fármacos en un nivel de efecto dado. Es decir, la combinación de la concentración del fármaco A (C_A) y la concentración del fármaco B (C_B) para producir un efecto (E) dado, se normalizan por las concentraciones correspondientes que producen el mismo efecto que un solo agente, IC_{xA} e IC_{xB} , respectivamente, ver ecuación 2. (70)



$$E = E_0 \times \left[1 - E_{MAX} \times \frac{C_{50}^{\gamma}}{C + EC_{50}^{\gamma}} \right]$$

Ecuación 1.

$$CI = \frac{C_A}{IC_{A,x}} + \frac{C_B}{IC_{B,x}}$$

Ecuación 2.

Figura 7. Modelo E_{max} Sigmoide.

Curva Estándar de Dosis-Respuesta Típica del Modelo E_{max} Sigmoide (Derecha)

E_0 = efecto observado a concentración cero del fármaco; E_{max} = efecto máximo observado (denota eficacia); EC_{50} = concentración del fármaco que produce el 50% de respuesta máxima; γ = pendiente de la curva dosis respuesta.

Ecuación 1, algoritmo de E_{max} basada en la ecuación de Hills. E= efecto observado; C= concentración del fármaco.

Ecuación 2, Ecuación del índice de combinación estándar. CI =índice de combinación; C =concentración del fármaco A, C_B =concentración del fármaco B; $IC_{x,A}$ = concentración del fármaco A para inhibir el efecto a un nivel x; $IC_{x,B}$ = concentración del fármaco B para inhibir el efecto a un nivel x.

Los ensayos funcionales para testar la sensibilidad *ex-vivo* a drogas a nivel individual, representa uno de los estudios más prometedores e interesantes de la medicina personalizada. Ya que se podría predecir la respuesta clínica a fármacos anti-cáncer con una tecnología no invasiva y de forma paralela antes y durante el tratamiento.(71, 72)

El test de sensibilidad proporciona información capaz de identificar rápidamente posibles casos de resistencia, justificado en cierta medida por el perfil mutacional del paciente. Identificando así biomarcadores relevantes que determinan la sensibilidad, resistencia o toxicidad del paciente a un tratamiento determinado y poder reconducir el tratamiento de manera individualizada en pacientes con LMA especialmente en caso de fracaso terapéutico.(73)

Los ensayos que analizan las células tumorales aisladas de un paciente, denominados test de respuesta tumoral individualizada (*ITRT*, del inglés *Individualized Tumor Response Testing*), se han utilizado durante casi 40 años para tratar de predecir la respuesta del paciente al tratamiento sin mucho éxito.^(74, 75)

La falta de predicción clínica podría verse justificada por el propio aislamiento de las células tumorales inherente a los ensayos de CMF, ya que al eliminar los componentes del microambiente tumoral podrían alterar la potencia y eficacia de los fármacos testados. El microambiente tumoral contiene factores clave como células estromales, plasma, plaquetas y glóbulos rojos, y se conoce su efecto en la supervivencia de las células tumorales, la proliferación y la resistencia a fármacos. Su papel se ha vuelto aún más importante con el desarrollo de fármacos oncológicos que se dirigen específicamente a estos componentes. Por ello es crucial el mantenimiento de los componentes del microambiente tumoral en los ensayos *ex vivo* para mejorar el valor predictivo de la eficacia clínica de los fármacos.⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾

Los avances de la última década respecto al espectro genómico y epigenómico de la LMA ha establecido nuevas dianas terapéuticas y el posible desarrollo de fármacos con mecanismos de acción más específicos. Los mecanismos de acción de los fármacos antileucemia, y concretamente los valorados en este trabajo, incluye:

- Actividad hipometilante: decitabina y 5-azacitidina.

Ampliamente utilizados en pacientes donde el tratamiento intensivo no es recomendable y como terapia de rescate. Los agentes de hipometilación son análogos de citidina que se incorporan en el ADN durante la replicación e interaccionan con las metiltransferasas de ADN de forma irreversible, provocando su inactivación.

Esta situación conduce a una reducción de la metilación del ADN, que se asocia a una desregulación de genes supresores de tumores, que conduce a la apoptosis de células leucémicas. También hay alguna evidencia de que estos agentes pueden dañar directamente el ADN y que la azacitidina altera además la estabilidad del ARN.⁽⁷⁹⁾

- Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: citarabina, fludarabina, 6-tioguanina y clofarabina.

Inhiben la síntesis de ADN y/o ARN intercalándose entre los pares de bases de la cadena de ADN/ARN, evitando así la replicación de las células tumorales.

La **citarabina** análogo de citidina que en el interior de la célula se convierte en citarabina trifosfato, que es el metabolito activo (ara-CTP). Presenta especificidad de fase celular (fase S) en la síntesis de ADN y, bajo ciertas condiciones, bloquea la progresión de las células de la fase G1 a la fase S. El ara-CTP también es un inhibidor eficaz de la ADN polimerasa, actúa disminuyendo la velocidad de elongación de la cadena de DNA y puede inhibir también la transcriptasa inversa.⁽⁸⁰⁾

La **fludarabina** es un análogo de purina. Inhibe la síntesis del ADN al interferir con la ribonucleótido reductasa y la ADN polimerasa; por lo que es activa contra células en división y en fase de reposo.⁽⁴⁹⁾

La **clofarabina** es un análogo de la adenosina. Se cree que su actividad antitumoral se debe a 3 mecanismos: 1) Inhibición de la ADN polimerasa, interrumpiendo la fase de elongación del ADN y/o de la síntesis/replicación del ADN. 2) Inhibición de la ribonucleótido reductasa, con la consiguiente disminución de los depósitos celulares de desoxinucleótido trifosfato. 3) Ruptura de la integridad de la membrana mitocondrial, con liberación de citocromo C y de otros factores proapoptóticos.^(81, 82)

La **6-tioguanina** es un análogo de guanina. La 6-tioguanina se convierte en varios compuestos denominados nucleótidos de tioguanina 6 (6-TGN). Los 6-TGN se incorporan en el ADN durante la fase de síntesis (fase S); e inhibe de la proteína Rac1, que regula la vía Rac/Vav. Adicionalmente los 6-TGN puede unirse al ARN y bloquear la interacción con los ribosomas durante la traducción proteica.^(83, 84)

- Inhibidores de la topoisomerasa II: idarubicina, daunorubicina, mitoxantrona, etopóxido y amsacrina.

Estos compuestos se intercalan en la cadena de ADN provocando un cambio estructural en la misma que reduce la interacción del ADN con moléculas implicadas tanto en la replicación como en la transcripción: la ADN polimerasa, la ARN polimerasa y los factores de transcripción. Inhiben específicamente la topoisomerasa II, enzima encargada del desenrollamiento del ADN durante la replicación y la transcripción del ADN.⁽⁸⁵⁾

- Inmunomodulador: lenamidotida.

Actúa sobre los mecanismos de respuesta inmune, potenciando la acción de los linfocitos T y las células killer (NK) y aumenta el número de células T/NK. Además inhibe el crecimiento y la proliferación de las células tumorales. Y posee acción antiangiogénica por lo cual dificulta la formación de nuevos vasos sanguíneos.⁽⁸⁶⁾

- Actividad alquilante: busulfán, mafosfamida y melfalán.

Los agentes alquilantes alteran la función del ADN y, en última instancia, provocan muerte celular mediante varios mecanismos diferentes. La alquilación promueve formación de puentes cruzados entre átomos en el ADN, emparejamiento incorrecto de los nucleótidos, y en tercer lugar, unión de grupos alquilo a bases de ADN, mientras que las enzimas reparadoras de la cadena intentan reemplazar las bases alquiladas, lo que da como resultado la fragmentación del ADN, alteración de la función del ADN y, en última instancia, muerte celular.⁽⁸⁷⁾

- Inhibidores moleculares específicos: sorafenib, panobinostat y volarsertib.

Sorafenib es un potente inhibidor de tirosin kinasa (TK) específico de FLT3-ITD pero no de FLT3 D835 o FLT3 no mutado.⁽⁸⁸⁾ Evaluado clínicamente con resultados muy prometedores en monoterapia o en combinación con otros fármacos.⁽⁸⁹⁾

Panobinostat es un inhibidor de histonas deacetilasas (HDAC). Estas enzimas están implicadas en la eliminación de grupos acetilo en las histonas, por lo que su inhibición provoca represión transcripcional y frena la diferenciación hematopoyética.⁽⁹⁰⁾

Volarsertib es un inhibidor de kinasas tipo polo (PLKs), particularmente PLK1. Las PLK1 son serina/treoninas quinasas reguladoras del ciclo celular y su inhibición induce apoptosis celular.^(91, 92)

2. OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La Leucemia Mieloide Aguda es una patología hematológica que implica adquisición de alteraciones moleculares de forma progresiva durante su patogénesis. Algunas de estas alteraciones ya han sido establecidas como marcadores moleculares y su valor biológico, pronóstico y terapéutico ya se ha validado. Sin embargo, la relevancia de muchas otras alteraciones descritas está poco definida; y muchas otras aún no han sido identificadas. Por lo tanto, una caracterización genómica más amplia y detallada de los pacientes permitiría un diagnóstico más preciso de la enfermedad que optimice la clasificación pronóstica y nos anticipe al fracaso terapéutico.

Además, los ensayos funcionales de sensibilidad *ex-vivo* a fármacos podrían predecir la respuesta clínica a fármacos anti-cáncer con una tecnología no invasiva y de forma paralela antes y durante el tratamiento, ofreciendo alternativas terapéuticas de manera individualizada.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es el estudio, mediante la tecnología de NGS, de nuevos marcadores moleculares con valor pronóstico y terapéutico, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento y en estados de refractariedad o recaída. Y analizar el impacto de este perfil genético en combinación con perfil farmacológico establecido por ensayos *ex vivo*. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1. Estudiar el perfil mutacional en el diagnóstico de pacientes con LMA**, mediante la evaluación de la utilidad pronóstica del perfil mutacional establecido mediante NGS en pacientes con LMA homogéneamente tratados. Con el fin de optimizar así la estratificación de los pacientes en función del riesgo pronóstico individual.
- 2. Estudiar el perfil mutacional asociado a fracaso terapéutico en pacientes con LMA**, a través de la caracterización del perfil genético mediante NGS en pacientes con LMA donde acontece fracaso terapéutico, bien por resistencia primaria al tratamiento de inducción y/o por recaída tras el mismo.
- 3. Estudiar la Enfermedad Mínima Residual en pacientes con LMA**, mediante la detección y cuantificación de marcadores moleculares identificados por NGS, en momentos post-terapia (post-inducción, post-consolidación). Y correlacionar el impacto pronóstico de los niveles de EMR en la supervivencia.
- 4. Estudiar la respuesta farmacológica *ex vivo* a drogas antileucemia previo al tratamiento en pacientes con LMA**, con el fin de detectar los estados de resistencia farmacológica. Y correlacionar el perfil mutacional identificado por NGS con el grado de sensibilidad/resistencia al test farmacológico.

3. MÉTODOS

3.1. PACIENTES, MUESTRAS Y CONTROLES

3.1.1. SELECCIÓN DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO DEL PERFIL MUTACIONAL EN EL DIAGNÓSTICO EN LA LMA.

Para llevar a cabo el estudio inicial al diagnóstico se seleccionó retrospectivamente una cohorte de 190 pacientes en edad adulta diagnosticados con LMA no M3 entre los años 2005 y 2015, cuyas muestras habían sido preservadas en el biobanco del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid (n=132), y en el Hospital Universitario y Politécnico de la Fe de Valencia (n=58). Se trata de un estudio multicéntrico, que abarca 13 de los principales hospitales de la comunidad de Madrid y centralizado en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Todos los pacientes fueron tratados según protocolos PETHEMA y firmaron el consentimiento informado según la Declaración de Helsinki.

Del total de casos, 152 pacientes (80%) eran de nuevo diagnóstico, 18 pacientes (9%) secundarios a otros tratamientos quimioterapéuticos y 20 (11%) derivan de SMD previo. La mediana de edad de los pacientes fue de 57 años (18-91). La distribución por género fue de 100 (53%) varones y 90 (47%) mujeres. Más de la mitad de los casos (n=131, 69%) pertenecen al grupo de riesgo citogenético intermedio, 14 pacientes (7%) pertenecen al grupo de riesgo favorable y 45 pacientes (24%) al grupo adverso. Respecto al tratamiento de inducción, 7 pacientes (3,5%) fueron derivados a tratamiento de soporte, 152 pacientes (80%) recibieron quimioterapia según esquema 3+7, 26 pacientes (14%) recibieron esquema FLUGA, y el resto (n=5; 2,5%) fueron incluidos en otros protocolos o ensayos clínicos. El resto de características clínicas se recogen en la sección de *resultados*, tabla 11.

Como controles del estudio se seleccionaron 10 individuos sanos, descartándose la presencia de cualquier alteración genética en los mismos. Con representación equitativa de ambos géneros y cubriendo un amplio rango de edad adulta.

3.1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO DE FRACASO TERAPEUTICO EN LA LMA.

Para llevar a cabo el estudio retrospectivo relativo a los estados de resistencia al tratamiento, ya sea manifestado como refractariedad primaria tras el tratamiento de inducción o como recaída en cualquier momento de la terapia, se seleccionó retrospectivamente muestras de interés en relación a la evolución de 23 pacientes diagnosticados entre los años 2007 y 2015 en el Hospital Universitario 12 de Octubre y seleccionados de la cohorte inicial de estudio al diagnóstico (n=190).

De tal manera que se seleccionaron 73 muestras, figura 8, tomadas en estados de remisión completa (n=31; 42%), en estados de remisión parcial (n=4; 5%), en estados de refractariedad primaria

(n=16; 22%), en estados de refractariedad a tratamientos de rescate tras una recaída (n= 4; 5%) y en estado de recaída (n=18; 25%).

La mediana de edad de diagnóstico de los 23 pacientes fue de 59 años (24-77). De los cuales 21 de los casos fueron tratados con esquema 3+7 y 2 de los pacientes según esquema Fluga. El resto de características clínicas se recogen en la sección de *resultados*, tabla 15.

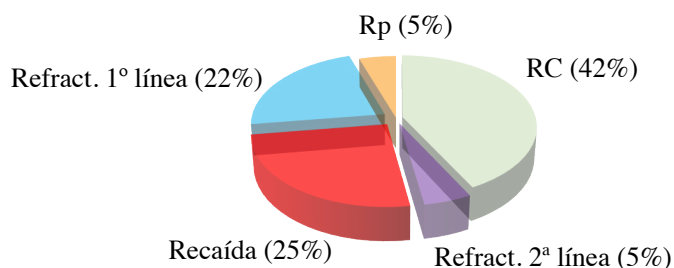


Figura 8. Muestras Evaluadas en el Seguimiento de la LMA

3.1.3. SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES PARA EL ESTUDIO DE EMR EN LA LMA

Para llevar a cabo el estudio enfocado a EMR se seleccionaron 106 muestras correspondientes a 63 pacientes diagnosticados con LMA entre los años 2006 y 2016. Incluye 51 (48%) muestras de seguimiento tomadas en post-inducción y 55 (52%) muestras tomadas en post-consolidación. Todas las muestras evaluadas se encontraban en estado de RC bajo criterios citomorfológicos (<5% de los blastos de médula ósea) después del correspondiente tratamiento, tabla 4.

Se trata de un estudio coordinado multicéntrico que en este caso recluta muestras de 11 hospitales de la comunidad de Madrid, centralizados en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid (n=56); y muestras del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo de Barcelona (n=7). De los 63 pacientes evaluados, 23 son coincidentes a la cohorte del estudio al diagnóstico y el resto, en su mayoría diagnosticados a posteriori (2015-2016), fueron incorporados de forma prospectiva, bajo los siguientes criterios: presencia de la mutación *NPM1* tipo A (InDel) o mutaciones tipo SNVs en los genes *FLT3*, *IDH1* y/o *IDH2* en el momento del diagnóstico, y disponibilidad de al menos una muestra de seguimiento. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Del total de pacientes, tratados de acuerdo a protocolos PETHEMA o CETLAM (Grupo cooperativo de Estudio y Tratamiento de Leucemias Agudas y Mielodisplasias), 50 (80%) de los casos recibieron terapia según esquema 3+7, 8 (13%) pacientes según esquema Fluga y 5 (7%) recibieron otros esquemas terapéuticos (Mylotarg, n=2; Panobidara, n=3). El resto de características clínicas de los pacientes se contemplan en la sección de *resultados*, tabla 17.

Paciente	Marcador	I1	I2	C1	C2	C3	Muestra elegida	
P1	NPM1	M1	M2		M3		M2	Inducción (n=35)
P2	NPM1	M1		M2	M3		M1	
P3	NPM1	M1			M2		M1	
	IDH1	M					-	
P4	NPM1	M1		M2			M1	
P5	NPM1	M1		M2	M3		M1	
P6	NPM1	M1				M2	M1	
P7	NPM1	M					M	
P8	NPM1	M					M	
P9	IDH1	M					-	
	NPM1	M					M	
P10	NPM1	M					M	
P11	NPM1	M					M	
P12	NPM1	M1		M2			M1	
P13	NPM1	M					M	
P14	NPM1	M					M	
P15	IDH2	M					M	
P16	NPM1	M					M	
P17	NPM1	M1	M2				M2	
P18	NPM1	M					M	
P19	NPM1	M					M	
P20	NPM1	M					M	
P21	NPM1	M					M	
P22	NPM1	M					M	
P23	NPM1	M					M	
P24	NPM1	M					M	
P25	NPM1	M					M	
P26	NPM1	M					M	
P27	FLT3		M				M	
	NPM1		M				M	
P28	IDH2	M					M	
P29	NPM1	M					M	
P30	FLT3	M					M	
P31	NPM1	M					M	
P32	NPM1	M					M	
P33	NPM1	M					M	
P34	NPM1	M					M	
P35	NPM1	M1		M2	M3		M1	
P36	IDH1			M1	M2		M2	
P37	NPM1	M1				M2	M2	
P38	IDH1				M1	M2	M1	
	NPM1				M1	M2	-	
P39	IDH2				M1	M2	M3	M4
P40	NPM1					M1	M2	M1
P41	NPM1	M1		M2				M2
P42	NPM1			M1		M2		M1
P43	NPM1				M1	M2		M2
P44	NPM1	M1				M2		M2
P45	NPM1	M1				M2		M2
P46	NPM1	M1				M2		M1
P47	NPM1					M		M
P48	NPM1					M		M
P49	NPM1	M1		M2				M1
P50	NPM1					M		M
P51	NPM1					M		M
P52	NPM1			M				M
P53	IDH2					M		M
P54	NPM1					M		M
P55	NPM1					M		M
P56	NPM1	M1		M2				M2
P57	NPM1			M				M
P58	NPM1			M				M
P59	NPM1	M1		M2	M3			M2
P60	NPM1	M1		M2				M2
P61	NPM1			M				M
P62	IDH1	M1			M2			M2
	NPM1	M1			M2			-
P63	NPM1	M1		M2				M2
-	NPM1	M1		M2				-
-	NPM1					M		-
		n=51		n=55				
		n = 106						

Tabla 4. Muestras y Pacientes Seleccionados Para el Estudio de EMR.

Muestras de seguimiento incluidas en el estudio, el momento de evaluación y el paciente correspondiente. M, indica pacientes donde solo se ha valorado una muestra. En pacientes donde se han valorado varias muestras el número de muestras han sido listadas numéricamente según orden cronológico (M1, M2, M3, M4), en este caso la muestra seleccionada finalmente para el estudio de supervivencia está indicado. Los niveles de EMR para los pacientes P3, P9, P38 y P62 fueron evaluados mediante estudio de NPM1 e IDH1, en cuyo caso se seleccionó uno de los dos. Dos pacientes adicionales fueron evaluados, pero se descartaron del estudio por la falta de datos clínicos.

Para la validación técnica se construyeron varias curvas de calibración, una como modelo de InDel (*NPM1*) y otras tres como modelo de SNVs (*IDH1*, *IDH2* y *DNMT3A*). Como material biológico se utilizó ADN genómico (ADNg) estándar comercial (Horizon Discovery, UK) que portan mutaciones al 50% de carga alélica en *IDH1* (R132C) o en *IDH2* (R172K); así como la línea celular OCI-LMA3 (ACC 582, DSMZ, Alemania) cuyas células portan en un 50% la mutación *NPM1* tipo A (863_864insCCTG), y la mutación en *DNMT3A* (R882C). Esta última solo fue valorada en este punto del estudio y como parte de la optimización técnica del método.

3.1.4. SELECCIÓN DE PACIENTES PARA EL ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO

El estudio de correlación entre el perfil mutacional, la respuesta *ex vivo*, y la respuesta clínica al tratamiento, se llevó a cabo de forma paralela en 74 de los 190 casos estudiados en el momento del diagnóstico. Todas las muestras procedían de médula ósea antes de iniciarse ningún tratamiento quimioterapia y los pacientes fueron incluidos dentro del ensayo clínico VIVIA-PMLMA (Personalize Medicine Acute Myeloid Leukemia) y firmaron el consentimiento informado correspondiente.

Se trata de un estudio prospectivo que incluye pacientes diagnosticados entre 2012 y 2015. Un estudio coordinado multicéntrico que en este caso incluye 5 hospitales de la comunidad de Madrid, centralizados de nuevo en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid (n=30); y el Hospital Universitario y Politécnico de la Fe (n=44).

La gran mayoría de los casos (n=47, 63%) pertenecen al grupo de riesgo citogenético intermedio, 11 pacientes (15%) pertenecen al grupo de riesgo favorable y 16 pacientes (22%) al grupo adverso. Respecto al tratamiento de inducción, 57 pacientes (77%) recibieron quimioterapia intensiva (esquema 3+7), 17 pacientes (23%) recibieron esquema FLUGA. Aunque casi todos alcanzaron RC (n=42, 57%) o remisión parcial (n=14, 19%) tras la inducción, 11 casos (15%) fallecieron después de la misma y 7 (9%) pacientes mostraron resistencia absoluta. El resto de características clínicas se recogen en la sección de *resultados*, tabla 21.

3.2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA

Para la caracterización clínica de los pacientes se han recogido aquellos datos relevantes tanto en el momento del diagnóstico como en momentos posteriores a lo largo de la evolución del paciente. Las variables clínicas incluidas para el estudio son: fecha de nacimiento, edad al diagnóstico, sexo, tipo de LMA según la clasificación *FAB*, recuento de leucocitos al diagnóstico, recuento de blastos al diagnóstico, índice ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group Index), citogenética, cariotipo, riesgo pronóstico, tipo de LMA (*de novo*, secundaria procedente de otras patologías mielodisplásicas, o derivada de tratamientos quimioterápicos), tipo de tratamiento de inducción, respuesta al tratamiento de inducción, recaída y fecha de la misma, trasplante hematopoyético (tipo y fecha), así como su estado final y fecha del mismo.

También se han añadido los datos de mutaciones determinadas en el laboratorio de Biología Molecular, respecto a *FLT3*-ITD (detectada por análisis de fragmentos, GeneScan) o respecto a *NPM1* (detectadas por qPCR).

En las muestras relativas al estudio de EMR, se incorporaron los datos de evaluación de EMR tomadas en las muestras de seguimiento, respecto al nivel de células con inmunofenotipo característico leucémico mediante CMF y respecto al nivel de marcadores moleculares mediante qPCR (*NPM1*).

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN

El material biológico principal utilizado fue ADNg procedente de médula ósea, o en su defecto sangre periférica. La extracción del ADNg se realizó de forma automática mediante la plataforma *Maxwell®16 MDx usando Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit* (Promega Biotech Iberica, SL), según el protocolo y partiendo de una cantidad inicial de 350-400 µL de aspirado de médula ósea total. La cuantificación se determinó mediante *Qubit® 2.0 Fluorometer; usando Qubit™ dsDNA BR Assay Kit o Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitroge™, Thermo Fisher Scientific Inc., WA, USA).

3.4. ANÁLISIS GENÉTICO POR SECUENCIACIÓN MASIVA

El análisis genético se realizó mediante la tecnología de secuenciación masiva de última generación o NGS usando los secuenciadores *Ion Proton™* o *Ion GeneStudio S5 System*, dentro de la plataforma *Ion Torrent™* (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Esta tecnología basada en semiconductores, utiliza chips con sensores de voltaje en cada pocillo capaces de detectar los hidrógenos (H⁺) liberados durante el proceso de polimerización del ADN. Un sistema capaz de detectar alteraciones químicas (cambios de pH) tras la incorporación de una base (A, C, G o T) a la cadena de ADN e interpretarlo como información digital (0, 1).

3.4.1. DISEÑO DEL PANEL GENÉTICO

En nuestro caso el primer paso para abordar los ensayos de NGS es la generación de un panel de genes de interés, bajo criterios biológicos y clínicos, de los genes asociados a mutaciones somáticas en patologías mieloides,^(13, 20, 29, 93) así como evidencias experimentales propias del laboratorio, que incluye no solo las zonas *hot-spot* sino toda la secuencia completa. Finalmente, se seleccionaron 32 genes, ver tabla 5, con la finalidad de unificar el estudio de cualquiera patología mieloide en la que se incluye la LMA.

El diseño del panel, concretamente el diseño de los primers que conforman el panel de genes, se desarrolló usando una aplicación web: *Ion AmpliSeq Designer* (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). El panel se compone finalmente de 1180 parejas de primers repartidos en dos pools que amplifica de forma dirigida fragmentos de ADN, denominados amplicones, con una longitud entre

125 pb y 175 pb, cubriendo las regiones codificantes al 90% de su totalidad y perdiendo el resto por incompatibilidades técnicas.

Vías funcionales	Gen	Chr	Inicio	Fin	Número amplicones	Cobertura (%)	Número exones
CALR	CALR	19	13049314	13055076	23	86	9
Regulación transcripcional	ASXL1	20	30954090	31025087	52	91	13
	EZH2	7	148504653	148544423	44	99	21
	PHF6	X	133511597	133559416	22	98	11
Regulación epigenética	DNMT3A	2	25457019	25523119	51	91	25
	TET2	4	106155047	106197701	64	99	10
	IDH1	2	209101751	209116313	22	98	8
	IDH2	15	90627407	90634952	21	87	11
	KDM6A	X	44732713	44970702	64	93	29
	KMT2A	11	118339409	118392930	145	96	37
Splicing	SF1	11	64532722	64545911	30	80	19
	SF3A1	22	30730553	30752852	37	94	18
	SF3B1	2	198256947	198299851	66	97	26
	SRSF2	17	74732208	74733231	5	70	2
	U2AF1	21	44513107	44524598	15	87	10
	ZRSR2	X	15808511	15841407	26	97	11
	PRPF40B	12	50024310	50037977	54	95	26
	EPOR	19	11488599	11495009	21	93	8
Señalización citoquinas - vía JAK/STAT	FLT3	13	28578144	28644774	53	97	24
	JAK2	9	5021946	5126885	57	97	23
	KIT	4	55524151	55604786	51	99	22
	SH2B3	12	111855922	111886159	15	64	7
	MPL	1	43803438	43818424	30	92	12
	CBL	11	119077153	119170540	41	93	16
Vía RAS	HRAS	11	532519	534348	10	83	5
	NRAS	1	115251095	115258874	9	100	4
	KRAS	12	25362621	25398385	10	83	5
Factores transcripción	ETV6	12	11802955	12044078	20	94	8
	RUNX1	21	36164534	36421235	18	69	10
Supresor de tumores	VHL	3	10183314	10195319	27	55	3
	TP53	17	7572847	7579960	21	93	13
	PTEN	10	89624161	89725315	21	93	9

Tabla 5. Genes Incluidos en el Panel de NGS.

Listado de genes que componen el panel de genes personalizado, agrupados por vías funcionales donde se especifica el nombre del gen, el cromosoma donde se localiza (chr), la región cromosómica estudiada (posición cromosómica de inicio-fin), número de amplicones necesarios para cubrir el gen, región total del gen que cubre los amplicones (cobertura en %) y el número de exones estudiados en cada gen.

3.4.2. FLUJO DE TRABAJO

La secuenciación incluye 3 etapas de trabajo: preparación de librerías, amplificación clonal y secuenciación, figura 9.

La preparación de librerías se llevó a cabo mediante el protocolo Ion AmpliSeq™ Library Preparation, partiendo de una cantidad de ADNg inicial de 30 ng. Incluye una primera fase donde se amplifica las secuencias diana mediante PCR convencional:

- activación de la polimerasa, 2 minutos a 99 °C
- 16 ciclos de: desnaturalización, 15 segundos a 99 °C, seguido del proceso de alineamiento y extensión, 4 minutos a 60 °C
- conservación a 10 °C

Una segunda fase donde se realiza la digestión parcial de los primers mediante la enzima FuPa, en un proceso de 10 minutos a 55 °C seguido de 20 minutos a 60 °C. Y una última fase que comprende la ligación de los barcodes mediante la enzima Ligasa, en un proceso de 30 minutos a 22 °C seguido de 10 minutos a 72 °C.

Una vez se realizan las librerías, y previa purificación mediante AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Inc., Espana, Sa), se procede a la amplificación clonal mediante PCR en emulsión donde una cadena aislada de ADN se une a una partícula magnética, y se replica de forma clonal creando lo que se denomina cluster. Empleando Ion OneTouch 2 System™ o Ion Chef™ System, según indicaciones del protocolo Ion P Hi-Q™ OT2 Kit User Guide o del protocolo Ion PI Hi-Q™ Chef Kit User Guide, respectivamente.

Por último, el producto de la amplificación clonal se inyecta en un chip, tras un procesamiento intermedio según protocolo y es secuenciado. Cada amplicón y por lo tanto cada posición cromosómica es secuenciada 2000 veces, por lo que el número de lecturas por muestra supera los 2,5 millones.

Tras la secuenciación de las muestras se realiza una análisis primario mediante el programa Torrent Suite™, en un proceso denominado *base calling* y se obtiene diferentes ficheros *fastq* que contienen los “datos crudos” de la secuenciación para cada muestra, secuencias de las bases nucleotídicas y un valor de calidad técnico asociado a cada una de ellas. Además se obtiene información sobre otros datos técnicos, tales como uniformidad o espectro del tamaño de los fragmentos, así como una primera aproximación de las variantes alélicas detectadas en cada muestra (archivo *alleles_IonExpress.xls*).

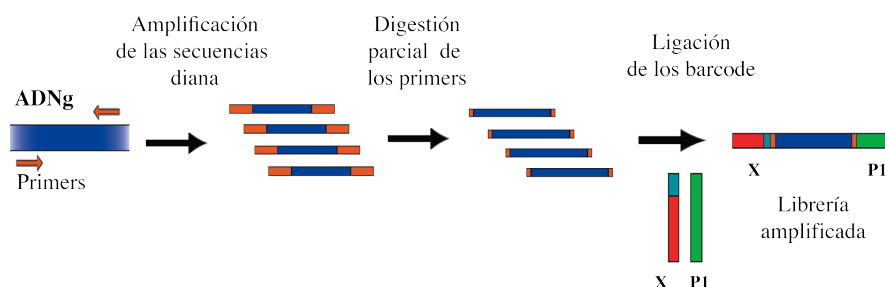


Figura 9. Esquema de la Preparación de Librerías por NGS

Las librerías son marcadas con barcodes con el fin de identificar de forma independiente la muestra secuenciada, permitiendo el estudio en conjunto de múltiples muestras en el mismo experimento.

3 4.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los archivos *fastq*, fueron procesados mediante *RUBioSeq 3.8*,^(94, 95) una aplicación multiplataforma, programada en *PERL*, que incorpora una serie de pipelines de forma automatizada y paralela para el análisis de variantes, figura 10, implementando a su vez más de 20 paquetes de software de libre acceso distintos.

En primer lugar los archivos *fastq* pasan un control de control de calidad mediante el programa FastQC. Las secuencias que superan el cribado de calidad, siguen la rama de análisis SNV, ver figura 10, en un proceso que agrupa tres módulos de trabajo:

- alineación de las secuencias con el genoma de referencia (hg19) mediante dos programas de alineamiento, *BWA* y *BFAST*.^(96, 97) Se genera un fichero tipo *.bam*
- identificación de las secuencias duplicadas contenidas en el fichero *.bam* mediante el programa *Picardtools*. Seguido de re-alineamiento y re-calibración usando el programa *GATK*,⁽⁹⁸⁾ y por último, un nuevo control de calidad mediante el programa *TEQC*.⁽⁹⁹⁾
- el *variant calling*, y el filtrado de las variantes alélicas se realiza mediante el programa *GATK*. Y finalmente, las variantes son anotadas utilizando la herramienta Variant Effect Predictor, *VEP*.⁽¹⁰⁰⁾ Se genera un fichero tipo *.vcf*.

Adicionalmente, se ha incorporado un análisis específico para detectar variantes a muy baja frecuencia alélica usando *MuTect*,⁽¹⁰¹⁾ una herramienta basada en clasificación bayesiana capaz de discriminar con alta especificidad variantes presentes con muy baja cobertura, y que podrían ser cruciales para la identificación de sub-clones o para la detección de EMR.

Dado que *RUBioSeq* está optimizado para datos obtenidos mediante la plataforma *Illumina*, se ha adaptado el flujo de trabajo para datos generados mediante la plataforma *Ion Torrent*, figura 11. Como resultado obtenemos un fichero en formato *.xls*, *Analysis.RUN_BC.xls*, equivalente a un fichero en formato *.vcf*, que contiene información anotada y relevante de las variantes detectadas (Anexo 1); sirviendo como criterios de descarte o selección en el proceso posterior de filtrado y priorización de variantes.

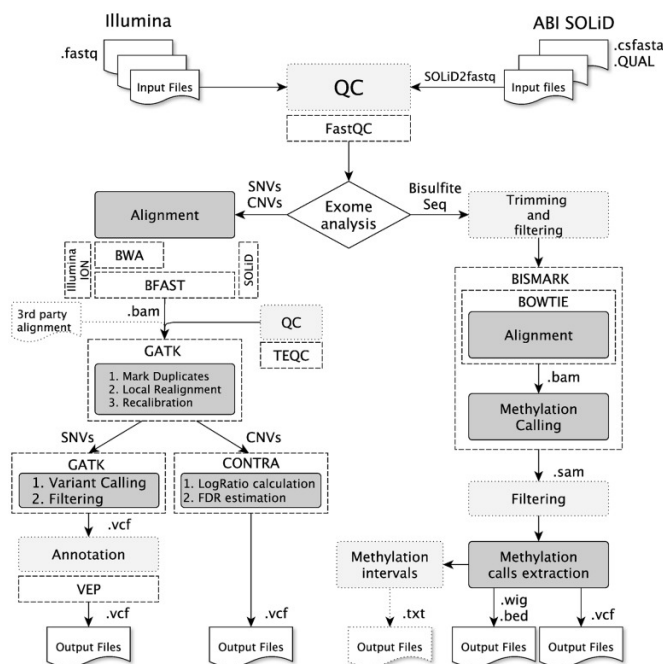


Figura 10. Esquema del Flujo de Trabajo de RUBioSeq 3.8.

El flujo de trabajo usado se limita a la rama específica de SNVs (izquierda). Los datos crudos en formato *fastq* es el punto de partida del análisis, los datos son procesados y los resultados entregados en formato *.vcf*. Modificado de *Rubio-Camarillo, M et al, 2013*.

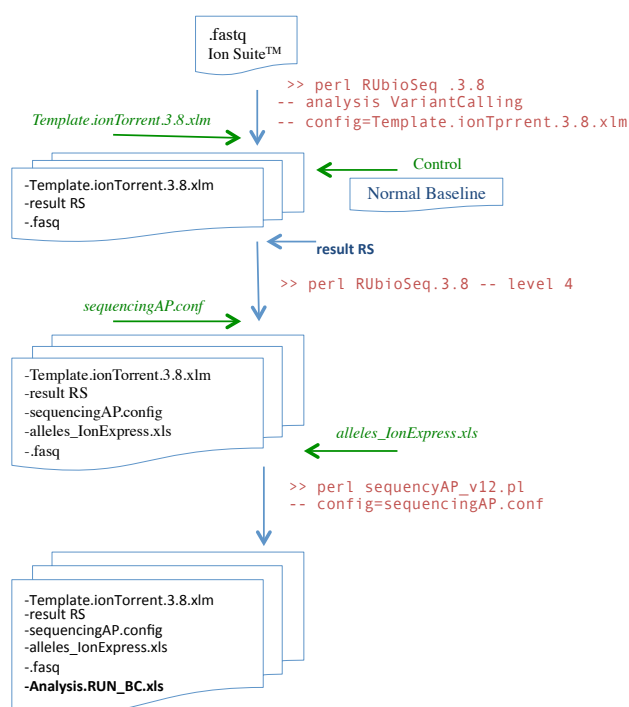


Figura 11. Esquema del Flujo de Procesamiento de Archivos

Partiendo de una carpeta que contiene el archivo en formato *.fastq* y el *Template.ionTorrent.3.8.xml* (Anexo 2) previamente editado para cada muestra, se ejecuta RUBioSeq. Se genera un fichero *.resultsRS*, al que se asocia un fichero que contiene las secuencias del pool control, denominado Normal Baseline, y se ejecuta de nuevo RUBioSeq desde el nivel 4. A continuación se ejecuta el programa *variant effect predictor* incluido en el programa *sequencingAP* que incluye a su vez el módulo *MuTect* y que requiere el fichero *.sequencingAP.conf* (Anexo 3) y el fichero *alleles_IonExpress.xls*.

3.4.3.1. ALGORITMOS DE PREDICIÓN DE IMPACTO FUNCIONAL

El uso de algoritmos computacionales capaces de predecir *in silico* si un cambio de un nucleótido afecta a la estructura o la función de una proteína se incluye a día de hoy en todos los estudios genómicos. Estos algoritmos usan aproximaciones estadísticas, tales como modelos de Markov, machine learning (neural networks), y el principio de máxima entropía, para predecir si una variante tiene impacto o no en la secuencia, estructura o función de la proteína. Los algoritmos más comunes solo se aplican a variantes SNVs del tipo missense⁽¹¹⁾, ver tabla 6.

3.4.3.2. BASES DE DATOS

Existen un amplio número de bases de datos relacionadas con información originada de las nuevas tecnologías de secuenciación, ya sea a nivel de ADN, ARN o proteína.

En la tabla 7 se muestran las bases de datos más relevantes a nivel internacional para la interpretación de variantes somáticas en cáncer, que incluyen bases de datos poblacionales útiles para la exclusión de polimorfismos, bases de datos específicas de cáncer, repositorios de datos de secuenciación y otras bases útiles relativas a mutaciones.⁽¹¹⁾

	Herramienta	Enlace web
Missense SNV	PolyPhen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	SIFT	http://sift.jcvi.org
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org
	MutationTaster	http://www.mutationtaster.org
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php
	Condel	http://bg.upf.edu/blog/2012/12/condel-forprioritization-of-variants-involvedinhereditarydiseases-and-transfic-for-cancer
	CoVEC	https://sourceforge.net/projects/covec/files
	CADD	http://cadd.gs.washington.edu
	GERPffl	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html
	PhyloP & PhastCons	http://compgen.bscb.cornell.edu/phast

Tabla 6. Algoritmos Computacionales de Predicción del Impacto Funcional Debido a Variantes Genómicas. Herramientas, que contienen distintos algoritmos computacionales, utilizadas para el estudio de predicción funcional de variantes alélicas detectadas en la secuencia genómica. Último acceso para todas las web sites septiembre 2017.

Tipo BD	BD	Enlace web
BD poblaciones (exclusión polimorfismos)	1000 Genomes Project	http://browser.1000genomes.org
	Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS
	dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
	dbVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
	ExAC	http://exac.broadinstitute.org
BD con variantes específicas de cáncer	dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
	dbVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
	ExAC	http://exac.broadinstitute.org
	Catalog of Somatic Mutations in Cancer	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	My Cancer Genome	http://www.mycancergenome.org
	Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center	https://pct.mdanderson.org
	cBioPortal	http://www.cbioportal.org
	Integrative Onco Genomics	https://www.intogen.org/search
	ClinicalTrials.gov	https://clinicaltrials.gov
	IARC (WHO) TP53 mutation database	http://p53.iarc.fr
Pediatric Cancer Genome Project	http://explorepcgp.org	
International Cancer Genome Consortium	https://dcc.icgc.org	
Repositorios de secuencias y servidores de datos	NCBI Genome	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
	RefSeqGene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg
	Locus Reference Genomic	http://www.lrg-sequence.org
	UCSC table browser	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables
	Ensemble BioMart	http://useast.ensembl.org/biomart/martview
Otras BD mutaciones o patologías útiles para la interpretación de variantes genómicas en cáncer	ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.org
	Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl
	dbNSFP	https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
	Ensemble Variant Effect Predictor	http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html

Tabla 7. Bases de Datos Relevantes Para la Interpretación de Variantes Somáticas.

BD, base de datos; dbSNP, The Database of Short Variation; ExAC, Exome Aggregation Consortium; IARC, International Agency for Research on Cancer; NCBI, National Center for Biotechnology Information; UCSC, University of California, Santa Cruz; WHO, World Health Organization.

Último acceso para todas las websites septiembre 2017.

3.5. NUEVO MÉTODO DE EVALUACIÓN DE EMR EN LMA

3.5.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN TÉCNICA

Se ha diseñado y optimizado una nueva metodología basada en secuenciación de última generación y de alta profundidad, para la detección y cuantificación de variantes a una frecuencia alélica muy baja, tales como las que se presentan en enfermedad mínima residual, EMR. Se trata de un nuevo método capaz de evaluar, potencialmente, cualquier alteración genética en muestras de seguimiento de pacientes con LMA.

La puesta a punto de esta metodología implicó un alto número de experimentos adicionales. Como primer enfoque, se siguieron las mismas condiciones del protocolo de diagnóstico (*Ion AmpliSeq DNA & RNA Library Preparation*), usando 10-30 ng de ADN_g de partida y los primers comerciales de Ampliseq, y con una cobertura estimada de 500000 secuencias. En un segundo enfoque, se aumentó la concentración inicial de ADN (30-50 ng), se emplearon primers de mayor especificidad y calidad (TIB MOLBIOL, Roche Diagnostics, SL), así como una polimerasa de mayor fidelidad y rendimiento (Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen[™]) siguiendo el protocolo Prepare Amplicon Libraries without Fragmentation Using the Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.), y alcanzando una cobertura estimada de 1000000 de secuencias.

Las condiciones óptimas del protocolo final del método, figura 12, incluye 3 bloques experimentales:

- **amplificación del ADN.** Se utilizaron la misma secuencia de primers, ver tabla 8, utilizadas en el estudio al diagnóstico para amplificar 0,5-1 µg de ADN_g de las muestras en RC (3 µg para los experimentos relativos a las curvas de calibración) mediante PCR convencional, utilizando *Platinum[™] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen[™]) bajo las siguientes condiciones:
 - desnaturalización inicial: 60 segundos a 94 °C
 - amplificación (35 ciclos): 15 segundos a 94 °C para la desnaturalización, 30 segundos a 58 °C para el *annealing* y 30 segundos a 68 °C para la extensión.
 El volumen final fue de 100 µL (79,6 µL DNA-H₂O, 10 µL 10X High Fidelity PCR Buffer, 4 µL de MgSO₄ (50 nM), 2 µL 10 mM dNTP Mix (10 mM, NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal), 0,4 µL ADN polimerasa (5U/µL) y 2 µL (10 µM) de cada primer.
- **preparación de las librerías.** Las librerías se construyeron usando *NEBNext[®] Fast DNA Prep Set para Ion Torrent[™]* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EE.UU). El control de calidad, especificidad, y la cuantificación del producto final, tanto para el ADN amplificado como para las librerías amplificadas, se llevó a cabo mediante el equipo *Agilent Bioanalyser 2100* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU).

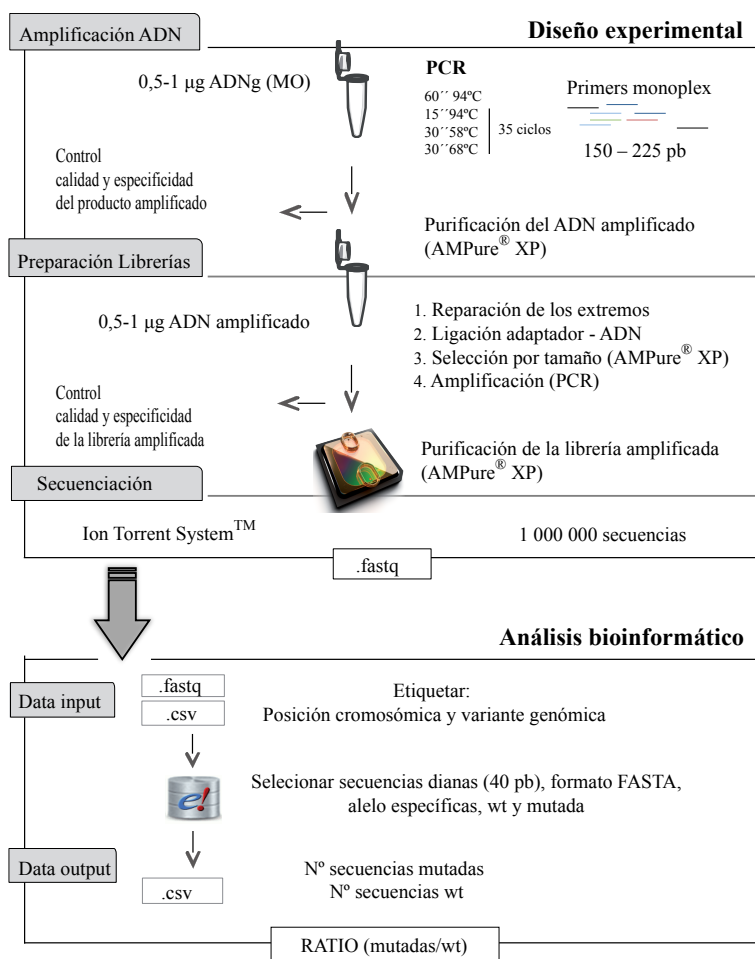


Figura 12. Flujo de Trabajo del Método de Detección y Cuantificación de EMR.

La parte experimental del método compone la amplificación del ADNg con primers específicos, la preparación de librerías que incorpora 4 pasos (reparación de extremos, ligación del adaptador, selección por tamaño y amplificación por PCR) y la secuenciación de las mismas. Un pipeline bioinformático de diseño personalizado analiza las secuencias obtenidas. Los resultados son expresados como ratio de las secuencias alineadas las mutadas entre secuencias alineadas no mutadas (wt, wild type).

Gene	Primers sequence
IDH1	Fw, 5'-AAGAATAAACACATACAAGTTGGAAATTTCT-3'
	Rv, 5'-GAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCC-3'
IDH2	Fw, 5'-ACAAAGTCTGTGGCCTGTACTG-3'
	Rv, 5'-CTGGACCAAGCCCATCACCAT-3'
NPM1	Fw, 5'-GTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAAAAATAGA-3'
	Rv, 5'-GATATCAACTGTTACAGAAATGAAATAAGACG-3'
FLT3	Fw, 5'- TTGAAACTCCCATTGAGATCATATTCAT-3'
	Rv, 5'-TCTATCTGCAGAACTGCCTATTCCTAA -3'
DNMT3A	Fw, 5'-GATGACTGGCAGCTCCAT-3'
	Rv, 5'-GCTGTGTGGTTAGACGGCTTC-3'

Tabla 8. Secuencia de Primers Para el Estudio de EMR

Secuencias específicas de las parejas de primers (TIB MOLBIOL, Roche Diagnostics, SL) tomando como referencia la secuencia de primers que amplifican las regiones concretas del estudio de EMR, e incluidos en el panel de genes usado en el estudio al diagnóstico (Ion AmpliSeq™, Thermo Fisher Scientific, Inc) para el caso de *IDH1*, *IDH2*, *FLT3* y *DNMT3A* (este último solo para la optimización del método). O, en el caso de *NPM1*, la secuencia específica del primers incluida en el panel comercial (Ion AmpliSeq™ LMA Panel). Fw= forward, Rv=reverse.

- **secuenciación.** Finalmente las librerías son secuenciadas mediante *Ion Proton System*, con una cobertura estimada superior al millón de secuencias, contenidas en un fichero *.fastq*, los cuales son analizados bioinformáticamente mediante un *pipeline* personalizado programado en PERL.

El análisis bioinformático parte de un fichero *.csv* que contiene información sobre el identificador de la muestra, la carrera y el barcode; así como la posición cromosómica y la variante alélica que fue detectada al diagnóstico y que será la alteración genómica diana a evaluar en las muestras de seguimiento. Mediante la aplicación *Ensembl perl API*,⁽¹⁰²⁾ se identifica la secuencia en formato FASTA acotada 20 pb por la derecha y 20 pb por la izquierda, cubriendo una región total de 40 pb. Finalmente, se obtiene un fichero de salida *.csv* que contiene el resultado final expresado en valores absolutos como ratio de las secuencias alineadas mutadas entre las secuencias alineadas no mutadas.

3.5.1.1. PCR DIGITAL

La PCR digital (dPCR) es una técnica directa para la cuantificación de ácidos nucleicos de manera precisa y en valores absolutos, puesto que no necesita el uso de estándar conocido. Una técnica que se ajusta a la estadística de Poisson: distribución de probabilidad discreta que expresa, a partir de una frecuencia promedio, la probabilidad de que ocurra un determinado número de eventos en un período de tiempo concreto, enfocándose en la probabilidad de ocurrencia de sucesos con probabilidades muy pequeñas.^(103, 104)

La dPCR se fundamenta en fraccionar una reacción de PCR en múltiples reacciones de tal manera que una sola molécula de ADN puede ser aislada y contenida en una gota, la cual ocupa un pocillo de un chip donde ocurre la amplificación de PCR de manera clonal, y finalmente se detecta mediante fluorescencia, ver figura 13. Consiguiendo aumentar significativamente la especificidad por encima de PCR convencional y ofreciendo una sensibilidad en torno a 10^{-4} . Y aunque el mayor atractivo de esta técnica radica en que los resultados pueden obtenerse en el mismo día, la principal desventaja es que requiere un diseño alelo específico para cada marcador y además solo un conjunto reducido de marcadores puede ser evaluados simultáneamente.⁽⁵⁸⁾

Los ensayos de dPCR se realizaron utilizando *QuantStudio™ 3D Digital PCR System* mediante el ensayo *FAM™/VIC® TaqMan® Assay* con sondas tipo ROX® (*TaqMan® SNP Genotyping Assay*, Applied Biosystems™, Thermo Fisher, CA,USA) para el estudio de las mutaciones en:

- ◆ NPM1: Assay ID: AHLJ06N, variante:863_864insTCTG
- ◆ IDH1: Assay ID: C_167891676_10; variante c.394C/T
- ◆ IDH2: Assay ID: C_163475619_10; variante c.515G/A

Un volumen final de 14,5 µL (7,5 µL de PCR Master Mix 2X, 0,75 µL *TaqMan® Assay 20X* y 6,75 µL de ADNg a 50 ng/µL) fue cargado en un *QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip v2*, y amplificado por PCR convencional usando el sistema *GeneAmp® 9700 (Thermo Fisher)*, bajo las siguientes

condiciones: 10 minutos a 96 °C para la desnaturalización inicial, 2 minutos a 56-60 °C seguidos de 30 segundos a 98 °C (39 ciclos y un paso final de 2 minutos a 60 °C

Después de la PCR, cada chip se interpreta individualmente utilizando *QuantStudio™ 3D Digital PCR*, de donde se genera un archivo (.eds) que contiene los datos de imagen procesados que luego son interpretados con *QuantStudio™ 3D Analysis Suite Software* (Thermo Fisher Scientific, Inc). Los resultados finales son expresados como concentración (copias mutadas/ μ L en copias no mutadas/ μ L).

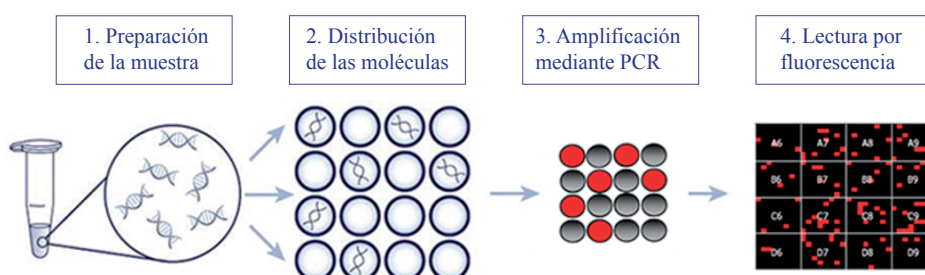


Figura 13. Proceso Técnico de la PCR Digital.

A la muestra se le añade la sonda alelo específica y se divide en múltiples particiones. Cada pocillo del chip recibe una sola molécula y se amplifica mediante PCR estándar. Finalmente las moléculas diana, que contienen la secuencia mutada o secuencia diana emitirán una fluorescencia (representado en rojo), y las restantes emitirán otra fluorescencia (representado en negro). Los resultados se cualifican en valores absolutos, expresados en copias de secuencias por μ L.

3.5.2. NPM1 EN LA MONITORIZACIÓN DE EMR

La detección y cuantificación de transcritos de *NPM1* mutados se realizó mediante qPCR alelo específica de acuerdo con el procedimiento descrito por Gorello.⁽¹⁰⁵⁾ La amplificación parte de muestras de ARN en un volumen final de 10 μ L:

- 1,5 μ L de H₂O + 2 μ L de cADN.
- 0,5 μ L de cProbe-LNA (5'- 6FAM-ACCAAGAGGCT+A+T+TC+A+A- -BBQ -3', 4 μ M Isogen Life Science
- 0,5 μ L cNPM-F, 5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3', 10 μ M, Isogen Life Science
- 0,5 μ L cNPM-mutA-R: 5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3', 10 μ M, Isogen Life Science.
- 5 μ L de Taq Man fast advanced master mix (Applied Biosystems)

Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50°C para la activación enzimática, 20 segundos a 95 °C para la activación inicial de la enzima, seguido de 40 ciclos de 60 segundos a 95 °C para la desnaturalización más 20 segundos a 60 °C para el alineamiento. Se usó ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems), para la amplificación y el procesamiento analítico.

La normalización de la expresión de *NPM1* se estableció mediante la expresión de β -*GUS* (β -glucuronidasa) como gen control. El punto de corte más comúnmente aceptado bibliográficamente se estableció en 0,001% (10⁻⁴) para discriminar entre el estado EMR-positivo (copias *NPM1*>0,001%) vs. estado EMR-negativo (copias *NPM1* <0,001%).⁽⁵⁹⁾

3.5.3. CMF EN LA MONITORIZACIÓN DE EMR

Para el estudio de alteraciones inmunofenotípicas mediante citometría multiparamétrica de flujo (CMF), tanto en el diagnóstico como en el seguimiento, se analizaron muestras de médula ósea tras previo lisado de eritrocitos, utilizando un panel de anticuerpos monoclonales (4/8 colores, según los criterios del centro) y siguiendo las recomendaciones establecidas por el consorcio europeo *EuroFlow*.⁽¹⁰⁶⁾ El estado de EMR positivo por CMF se estableció si la presencia de células que presentan inmunofenotipo característico de LMA era superior al 0,1% (10^{-3}) en las muestras post-tratamiento.⁽⁵⁹⁾

3.6. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

Los ensayos funcionales *ex vivo* se llevaron a cabo mediante la plataforma basada en citometría de flujo denominada *PharmaFlow^{PM}*,^(71, 72) y desarrollada por la empresa biotecnológica ©VIVIABIOTECH S.L.

Una plataforma de cribado que incorpora CMF multicolor automatizada y que incluye además la preparación automática de la muestra. Incorpora un software analítico patentado y una estructura de base de datos orientada a la adquisición rápida de datos, análisis e informe de los resultados. La plataforma *PharmaFlow^{PM}* analiza tanto SP como MO, es capaz de medir hasta 2000 puntos por muestra y puede evaluar los efectos del fármaco selectivamente en la población de células tumorales. Su utilidad ha sido demostrada para la cuantificación de la actividad farmacológica de fármacos y en combinaciones de fármacos, así como para modelar su comportamiento farmacológico de las muestras. Los resultados de dosis-respuesta en miles de muestras de pacientes para enfermedades hematológicas permite generar una base de datos de referencia capaz de extrapolar las variaciones inter-individual y comparar compuestos farmacológicos en desarrollo respecto a los tratamientos estándar.⁽⁷²⁾

Este enfoque incorpora tres ventajas principales en comparación con los métodos estándar: 1) el uso de muestras completas de SP o MO que incorpora el microambiente tumoral, 2) selección con un sistema automatizado basado en CMF capaz de discriminar y cuantificar células tumorales vivas, y 3) análisis de datos que usa modelos de farmacocinética y farmacodinámica (PK/PD) junto con una base de datos de referencia de medicamentos desarrollada mediante el análisis de miles de muestras de pacientes. *PharmaFlow^{PM}* es capaz de analizar ensayos de depleción celular, proliferación e inmunomodulación.⁽⁷²⁾

El mecanismo de acción de diferentes compuestos produce diferentes efectos celulares, por lo cual es necesario ensayos específicos basados en anticuerpos monoclonales para capturar los efectos que producen ciertos mecanismos tales como apoptosis, necrosis, depleción del ciclo celular, proliferación, modulación de células inmunes y citotoxicidad celular.

En este sentido la CMF detecta los efectos producidos por una amplia gama de compuestos incluso de manera simultánea. En nuestro caso el efecto de respuesta se midió en términos de depleción: diferencia en el número de células vivas en un pocillo con fármaco vs. sin fármaco. El recuento absoluto de células vivas, es una mejor estimación del efecto real del fármaco.⁽⁷²⁾

Las muestras frescas de MO se reciben y procesan dentro de las 24 horas desde la extracción, figura 14. A día 1, se lleva a cabo el recuento celular inicial y estudios de viabilidad; la presencia de células patológicas vivas deben ser superior al 40%. A continuación la muestra se dispensa en una placa de 96 pocillos que contienen los fármacos, hasta una concentración final de 130-500 células patológicas/ μ L. Las placas se incuban durante 48 horas a 37 °C en 5% de CO₂.

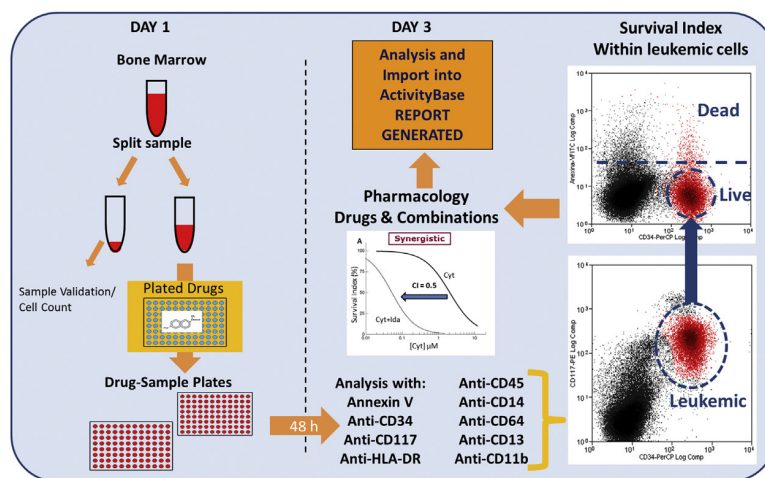


Figura 14. Esquema del Flujo de Trabajo de la Plataforma PharmaFlow^{PM}.

Cuando la muestra es recibida a día 1, parte se utiliza para el control de viabilidad y el recuento inicial, y el resto se dispensa en pocillos que contienen fármacos a varias concentraciones, tanto en monoterapia como en terapia combinada. La placa se incubó durante 48 horas y se analizaron los resultados mediante la plataforma automatizada que incorpora un citómetro de flujo CyAn (Beckman Coulter, Brea, CA). Modificado de *Bennet, T.A. et al, 2014*

Para cada muestra se testaron una serie de fármacos a 6-9 concentraciones secuenciales, ver tabla 9. Al tercer día, los glóbulos rojos se lisan y se añade Anexina-V FITC, detector células deplecionadas, y una combinación de diferentes anticuerpos monoclonales específicos recomendados por EuroFlow Consortium, para detectar células leucémicas acorde a un ratio FSC/SSC adecuado.⁽¹⁰⁶⁾

Para cada tratamiento de monoterapia, la estimación de los parámetros farmacodinámicos se llevó a cabo utilizando un enfoque de modelado poblacional y un análisis de regresión de efectos mixtos no lineales usando el software NONMEM.^(71, 107) Las curvas dosis-respuesta fueron calculadas y procesadas simultáneamente tomando en cuenta los errores residuales y la variabilidad inter-individual para determinar el perfil de población estándar para cada fármaco.

El modelo E_{max} sigmoidal se ajustó a los datos de respuesta (E) frente a concentración (C). Este modelo se basa en la ecuación de Hills, el cual asume que el efecto del fármaco (E) es directamente proporcional a la ocupación de su receptor y permite evaluar el comportamiento del fármaco según la estimación de 4 parámetros farmacológicos estandarizados:

- E_0 , representa el nivel basal, recuento de células leucémicas vivas después de la incubación sin ningún fármaco.
- E_{max} , representa la eficacia, máxima reducción de respuesta con respecto al valor basal que el fármaco es capaz de inducir.
- EC_{50} , representa la potencia, valor de concentración de fármaco que reduce a la mitad el valor de E_{max} .
- Y , es el parámetro que controla la pendiente de la curva sigmoidea dosis-respuesta.

En nuestro modelo se ha fijado la E_{max} en valores ranqueados a un valor máximo de 1, de tal manera que se fuerza al modelo a alcanzar siempre el máximo efecto, incluso aunque adquiera valores de concentraciones ideales no ensayos realmente. Esta estrategia nos permite establecer las condiciones ideales valorando solo 3 parámetros (EC_{50} , E_{max} , Y), de tal manera que toda la variabilidad depende del valor de la EC_{50} . El modelo fijo es más restringido, y permite estandarización de los resultados facilitando su interpretación y comparación entre fármacos y/o condiciones experimentales.

Mecanismo de acción	Fármaco		N
Actividad hipometilante	5-Azacitidina	AZA	28
	Decitabina	DEC	23
Inhibidor de síntesis de ácidos nucleicos	Citarabina	CYT	74
	Fludarabina	FLU	73
	Clofarabina	CLO	54
	6-Tioguanina	TIO	24
Inhibidor de topoisomerasa	Idarubicina	IDA	74
	Daunorrubicina	DAU	48
	Mitoxantrona	MIT	49
	Etopósido	ETO	42
	Amsacrina	AMS	29
Inmunomodulador	Lenamidotida	LEN	15
Actividad alquilante	Busulfán	BUS	15
	Mafosfamida	MAF	15
	Melfalán	MEL	15
Inhibidor HDAC	Panobinostat	PAN	37
Inhibidor TK	Sorafenib	SOR	14
Inhibidor de la PLK I	Volasertib	VOL	9

Tabla 9. Fármacos Incluidos en los Ensayos en Monoterapia.

Listado de fármacos testados en los ensayos farmacológicos *ex vivo* agrupados según su principal mecanismo de acción. Se representa el acrónimo asociado y el número de muestras ensayadas al diagnóstico. HDAC, Histona deacetilasa; TK, tirosin linazas, PLK, kinasas tipo polo, (del inglés, Polo-Like Kinases.)

Adicionalmente se testaron 6 combinaciones de fármacos incluyendo siempre citarabina, ver tabla 10. La administración simultánea de medicamentos produce diferentes interacciones que pueden sumarse, potenciarse o inhibirse. La farmacodinámica de las interacciones entre 2 fármacos se calculó mediante el índice de combinación (CI) estándar establecido por Chou y Talalay,⁽⁶⁹⁾

Un parámetro que representa cuantitativamente el efecto dependiente de varias drogas, donde un valor de 1 indica aditividad, valores < 1 indica sinergismo entre los fármacos testados y valores > 1 representa antagonismo.

Fármaco A		Fármaco B		N
Citarabina	CIT	Amsacrina	AMS	15
Citarabina	CIT	Clofarabina	CLO	25
Citarabina	CIT	Daunorrubicina	DAU	28
Citarabina	CIT	Fludarabina	FLU	41
Citarabina	CIT	Idarubicina	IDA	41
Citarabina	CIT	Mitoxantrona	MIT	21

Tabla 10 . Fármacos Incluidos en los Ensayos en Combinación

Listado de fármacos testados en los ensayos farmacológicos *ex vivo*. Se representa el acrónimo asociado y el número de muestras ensayadas al diagnóstico.

3.6.1. CÁLCULO DEL ÁREA BAJO LA CURVA (AUC)

Para representar gráficamente los modelos obtenidos, el eje x muestra las dosis de fármaco ensayados en escala logarítmica y el eje y muestra el índice de supervivencia de células tumorales expresada en %, figura 7.

El área bajo la curva (AUC, del inglés Area Under the Curve) es un parámetro farmacológico adicional necesario para determinar diferencias relativas a la respuesta, sensibilidad o resistencia, de los pacientes a un fármaco dado y en un tiempo concreto e integra los 4 parámetros farmacodinámicos especificados anteriormente. En este trabajo se han establecido para cada fármaco los límites de integración del eje x en la concentración del fármaco que marca el percentil 20 como límite inferior y la concentración del fármaco que marca el percentil 80 como límite superior. Puesto que el modelo está fijado con una E_{max} de 1 los límites de integración del eje y se mantienen entre 0 (mínimo efecto) y 1 (máximo efecto), figura 15.

La acotación entre los percentiles 20-80 permite discriminar con mayor exactitud la respuesta farmacológicas de cada paciente. La AUC calculada para cada curva dosis-respuesta es normalizada respecto al área máxima obtenida para cada fármaco, permitiendo la comparativa entre todos los fármacos testados.

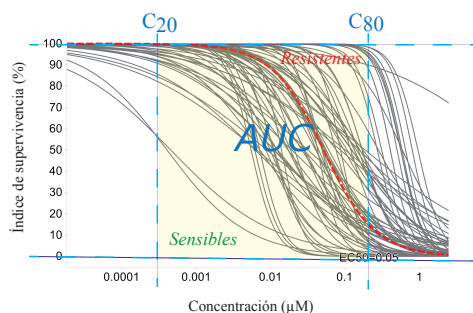


Figura 15. Prototipo del Cálculo de AUC Sobre Curva Dosis-Respuesta.

Los límites de integración del eje x comprende la concentración que marca el percentil 20 (C_{20}) y la concentración que marca el percentil 80 (C_{80}). Se representa dentro del cuadrante amarillo el AUC máximo que se puede alcanzar. El cálculo de la AUC discrimina en función de la respuesta farmacológica en pacientes sensibles y pacientes resistentes.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se han estudiado las asociaciones entre los distintos parámetros mediante test estadístico de Fisher para variables categóricas y test estadístico de Wilcoxon para variables continuas. Para el estudio de la normalidad se emplearon las pruebas de Kolmorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. En el caso de variables continuas se analizaron las diferencias entre grupos mediante la t de Student para variables con una distribución normal o la U de Mann-Whitney para las variables que no seguían dicha distribución. La homogeneidad de las varianzas para la t de Student se estudió mediante la prueba de Levene. Los análisis de correlación se analizó mediante test de Spearman o el test de Pearson según casos.

Las curvas de supervivencia se calcularon de acuerdo con el método de Kaplan-Meier, y la prueba de log-rank se utilizó para la estimación de la supervivencia y las diferencias entre los grupos. La supervivencia global fue definido como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico y la muerte, o en su ausencia hasta el último seguimiento. La supervivencia libre de enfermedad fue definido como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y una recaída o en su defecto hasta el último seguimiento.

Para la identificación de variables asociadas a SG y/o SLE se realizó análisis univariante y multivariante mediante modelo de regresión de Cox, usando test de Wald.

Las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) se emplearon para establecer el valor de corte que discrimina poblaciones bajo distintos criterios útil para la estimación de la supervivencia en el estudio de EMR y en los estudios de supervivencia del estudio ex vivo.. Para los datos relativos a EMR medidos por CMF o qPCR se tomaron puntos de cortes estandarizados.

Todos los análisis estadísticos se han realizado utilizando el software estadístico R y *Rstudio* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Todos los p valores de dos colas, con significación estadística fue definida con un valor $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. PERFIL MUTACIONAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LMA

4.1.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE

Se analizaron 190 pacientes diagnosticados de LMA no M3 en edad adulta, cuya mediana de edad fue 57 años (18-91), tratados según criterios de protocolos PETHEMA. El tiempo de seguimiento fue de 150 meses. Los principales datos clínicos se representan en la tabla 11.

	N° pacientes (190)	
Tipo de muestra	MO SP	173 (91 %) 17 (9%)
Sexo	Hombre Mujer	100 (53 %) 90 (47 %)
Edad al diagnóstico	Años, mediana (rango)	57 (18-91)
Blastos al diagnóstico	%, mediana (rango)	63 (4-99)
Leucocitos al diagnóstico	10 ⁹ /L, mediana (rango)	17 (1-300)
Tipo LMA	<i>de novo</i> Secundaria a SMD Secundaria a terapia	152 (80 %) 20 (11 %) 18 (9 %)
Cariotipo	Normal Alterado	101 (53 %) 89 (47 %)
Riesgo citogenético	Favorable Intermedio Adverso	25 (13%) 119 (63 %) 46 (24 %)
TPH	Autólogo Alogénico No realizado	45 (24 %) 32 (17 %) 113 (59 %)
Tipo de tto inducción	Idarubicina +ARA-C (3+7) Azacitidina Decitabina Esquema FLUGA Daunorubicina + ARA-C (3+7) Soporte	152 (80%) 2 (1%) 1 (0,5%) 26 (14%) 2 (1%) 7 (3,5%)
Respuesta al tto de inducción	RC Rp Resistencia Muerte	110 (58%) 30 (16 %) 19 (10 %) 31 (16 %)
Tiempo hasta 1ª RC	Días, mediana (rango)	39 (13-130)
Casos de recaída		60 (32%)
Tiempo hasta 1ª recaída	Meses, mediana (rango)	10 (1-150)
Casos de muerte		117 (62%)

Tabla 11. Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio al Diagnóstico.

MO= médula ósea, SP= sangre periférica, ARA-C= citarabina, RC= remisión completa, Rp= remisión parcial, TPH= trasplante hematopoyético; tto= tratamiento.

4.1.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA SERIE

4.1.2.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR CONVENCIONALES

Se realizó un estudio de la serie completa (n=190) para detectar alteraciones genéticas con valor pronóstico conocido y ya incluidas en laboratorios clínicos, como es el caso de *FLT3*-ITD mediante GeneScan y *NPM1* mediante qPCR. Las cuales estaban presentes en 30 (16%) y en 53 (28%) de los pacientes, respectivamente. Además en los casos mutados en *NPM1*, esta mutación co-existe con otras mutaciones en 49 pacientes, mientras que en los 4 pacientes restantes se presenta en exclusividad.

4.1.2.2. PERFIL MUTACIONAL DETERMINADO POR NGS

4.1.2.2.1. ANOTACIÓN, FILTRADO Y PRIORIZACIÓN DE VARIANTES

Una vez obtenidos los datos de secuenciación masiva, en formato *fastq* se llevaron a cabo una serie de procesos concatenados y de forma automatizada que incluyen:

- **anotación de variantes alélicas**, mediante la herramienta bioinformática *RUBioseq*. La cual incluye un filtrado a nivel técnico que descarta en primer lugar variantes con una profundidad de cobertura menor a 15 secuencias genómicas o lecturas y en segundo lugar descarta secuencias con valores de calidad menor a Q30. Q30 es el límite que admite una base nucleotídica errónea cada 1000 bases y que implica una exactitud del 99,9%. Como resultado se obtiene un fichero en formato *.xls* (ver Anexo 1), donde se registra 39 parámetros relativos a la información obtenida de cada variante alélica detectada.
- **filtrado y priorización de las variantes**, mediante un pipeline de diseño propio desarrollado en *R studio*. Partiendo de cada uno de los 190 ficheros anotados con las variantes correspondientes a cada uno de los 190 pacientes, cada variante anotada se etiqueta con un código identificativo del paciente (HUCN), así como los datos de la secuenciación (*RUN*, *BARCODE*); lo que nos permite unificar todos los archivos en un solo fichero, e incorporar un contador interno de concurrencias de la misma variante.

La priorización de variantes parte de un fichero único que contiene 3803 variantes no recurrentes, ver figura 16. El primer filtro aplicado selecciona aquellas variantes localizadas en los genes a estudio incluidos en nuestro panel. A continuación, se eliminaron aquellas variantes localizadas en el grupo de muestras control, potenciando la selección de variantes somáticas. El tercer criterio selecciona aquellas variantes que afectan a regiones codificantes en función del efecto de la variante a nivel de transcrito: *stop gained*, *frameshift variant*, *stop lost*, *start lost*, *inframe insertion*, *inframe deletion*, *missense variant*, *protein altering variant* y *coding sequence variant*.

En este punto se etiquetan las variantes del **nivel 1**, variantes descritas como patogénicas en la base de datos de *ClinVar* o en *COSMIC* (137 variantes no recurrentes); y las variantes del **nivel 2**, variantes identificadas en *COSMIC* con una prevalencia descrita de al menos 5 evidencias bibliográficas.

El resto de variantes siguen el flujo de filtrado, en el que se eliminan las variantes alternativas que no alcanzan una profundidad (*coverage*) mínima establecida en 50 lecturas, así como las variantes con una frecuencia alélica (VAF) menor del 1%, ya que es considerada como un artefacto de secuenciación que indica, en la mayoría de los casos, baja calidad de la muestra o errores en la secuenciación. Además, con el fin de discriminar polimorfismos se descartan aquellas variantes cuya frecuencia alélica en la población global (*GMAF*) es superior al 1%, o variantes descritas en las bases del Consorcio de Agregación de Exomas (*ExAC*) por encima del 1%.

A continuación, basándonos en 3 predictores de impacto funcional *in silico*: *SIFT*, *CONDEL* y *PolyPhen*, las variantes se clasifican en variantes deletéreas (según criterios de *SIFT* o *CONDEL*) o en variantes dañinas (según criterios de *PolyPhen*). En este punto se etiquetan las variantes del **nivel 3**, variantes con predicción adversa en 2-3 de los 3 predictores; y las variantes del **nivel 4**, variantes con predicción adversa en alguno de los predictores.

El resto de variantes, en su gran mayoría InDels, siguen el flujo de filtrado donde se eliminan las variantes alternativas que no alcanzan una profundidad de lectura mínima de 100, se eliminan las variantes descritas como benignas según criterios de *PolyPhen*, y se seleccionan aquellas con un *vs.core* mayor de 0,5. Este *vs.core* es un sistema de puntuación propio de *RUBioSeq* basado en relevancia de la variante siendo 1 el valor máximo y 0 el valor mínimo. Las variantes obtenidas tras este filtrado se agrupan en el **nivel 5**.

Por último, *RUBioSeq* tiene en cuenta un fichero de anotación derivado de la secuenciación que contiene variantes identificadas por el propio secuenciador. Las variantes anotadas dentro de este fichero sirven de validación y criterio para agrupar las variantes del **nivel 6**.

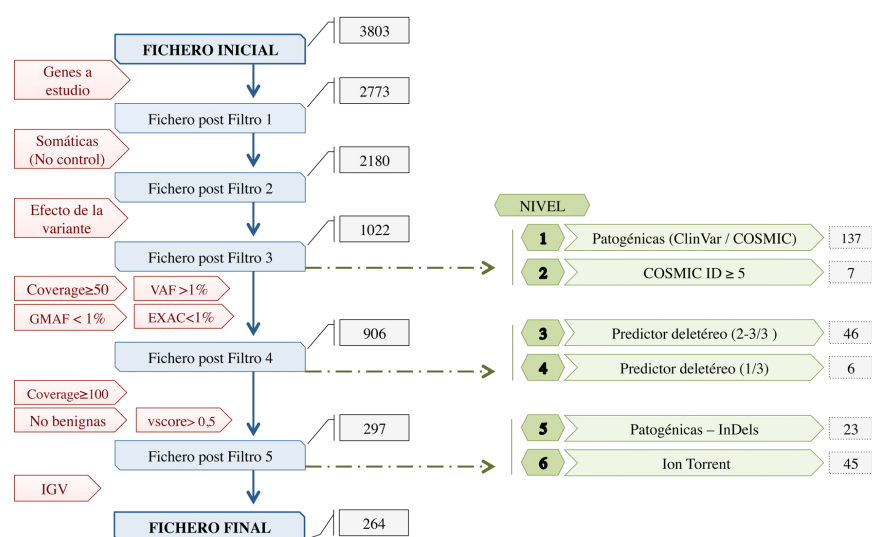


Figura 16. Flujo de Filtrado y Priorización de las Variantes del Pipeline Desarrollado

Se representa el tipo de fichero de entrada y salida (casillas en azul), el criterio de filtrado utilizado (casillas en rojo) y el número de variantes distintas seleccionadas (casillas en gris) en cada paso. Se estableció 6 niveles jerarquizados (casillas verdes) que identifica las alteraciones genómicas relevantes según contexto clínico y biológico.

Tras el filtrado automatizado informáticamente se realizó un cribaje manual de las variantes mediante visualización de las mismas en el software *The Integrative Genomics Viewer* (IGV).⁽¹⁰⁸⁾

Como resultado obtenemos un fichero que contiene 264 variantes no recurrentes, descritas en el Anexo 4, distribuidas en 164 de los 190 pacientes evaluados (86,3%). 48 de los pacientes presentan una única variante, 60 pacientes presentan 2 variantes, 29 pacientes presentan 3 variantes, y 27 pacientes presentan 4 o más variantes. La mediana de cobertura fue de 845 lecturas por posición nucleotídica.

De las 264 variables detectadas el 80 % son SNVs. (n=211) y el resto pequeños InDels, 17 % inserciones (n=46) y 3% deleciones (n=7), figura 17. En cuanto al impacto funcional, el 72 % eran variantes *missense* (n=190), el 18 % variantes *frameshift* (n=48) y el 10% restante variantes *inframe* (n=4), *start lost* (n=1) o *stop gained* (n=21). Ninguna variante fue detectada en 26 de los pacientes.

4.1.2.2.2. PERFIL MUTACIONAL AL DIAGNÓSTICO

En nuestra cohorte, las variantes detectadas por NGS con mayor frecuencia poblacional se localizan en los genes: *DNMT3A* (26%), *TET2* (21%), *NRAS* (19%), *IDH2* (14%), *TP53* (14%), *FLT3-SNV* (13%), *KIT* (11%), *KRAS* (11%), *RUNX1* (9%), *KMT2A* (7%), *IDH1* (7%), *EPOR* (6%), *EZH2* (6%), *ASXL1* (5%), *CBL* (5%), *SF3B1* (5%) y *U2AF1* (5%); el resto se presenta en porcentajes inferiores al 5% (*JAK2*, *PHF6*, *VHL*, *ZRSR2*, *ETV6*, *KDM6A*, *PTEN*, *SF1*, *SRSF2*, *MPL*, *CALR*, *PRPF40B* y *SF3A1*), o no se presentan en ningún paciente (*HRAS* y *SH2B3*), ver figura 18. Hay que tener presente que *NPM1* se presentaba mutado en un 28% de los pacientes, estableciéndose entonces como el gen más recurrentemente mutado de esta cohorte; y *FLT3-ITD* se detectaba en un 16% de la población. Ambos genes no estaban incluidos en el panel de NGS. Además si valoramos en conjunto la frecuencia hallada en *FLT3-SNV* y la frecuencia de *FLT3-ITD*, vemos que *FLT3* alcanza una frecuencia poblacional del 25% ya que se presenta mutado en 48 de los 190 pacientes. Incluso 6 de los pacientes presenta mutaciones del ambos tipos, *FLT3-SNV* y *FLT3-ITD*, simultáneamente.

La carga alélica de las variantes muestra una mediana del 33%, cuya distribución por genes se representa en la tabla 12. En algunos casos se localizó más de una variante en el mismo gen y en el mismo paciente, concretamente en los genes *KIT*, *KMT2A* y *VHL*.

Si realizamos un análisis más exhaustivo de la distribución de las variantes en la secuencia aminoacídica de los distintos genes estudiados, podemos observar si estas se agrupan en regiones colindantes dando lugar a un *hot spot*, o conocer si la alteración afecta a dominios funcionales o estructurales, ver figura 19 y anexo 5.

4.1.2.3.VÍAS FUNCIONALES

Basándonos en datos bibliográficos y herramientas de enriquecimiento funcional,⁽¹⁰⁹⁾ se agruparon los genes según vías de mecanismos de acción para poder facilitar su interpretación biológica y añadir valor estadístico al análisis de los datos. En este sentido, se han establecido 8 grupos:

- *CALR* (n=1)
- Vía de regulación transcripcional (n=24): *ASXL1*, *EZH2* y *PHF6*
- Vía de regulación epigenética (n=107): *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *KDM6A* y *KMT2A*
- *Splicing* (n=25): *SF1*, *SF3A1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *PRPF40B* y *ZRSR2*
- Vía de señalización de citoquinas y vía *JAK/STAT* (n=65): *SH2B3*, *EPOR*, *FLT3*, *JAK2*, *KIT*, *MPL* y *CBL*

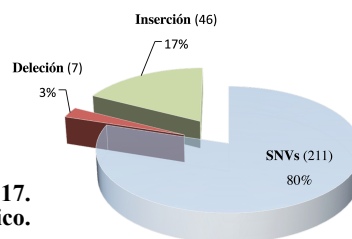


Figura 17.
Tipo de Variantes Alélicas Detectadas Al Diagnóstico.

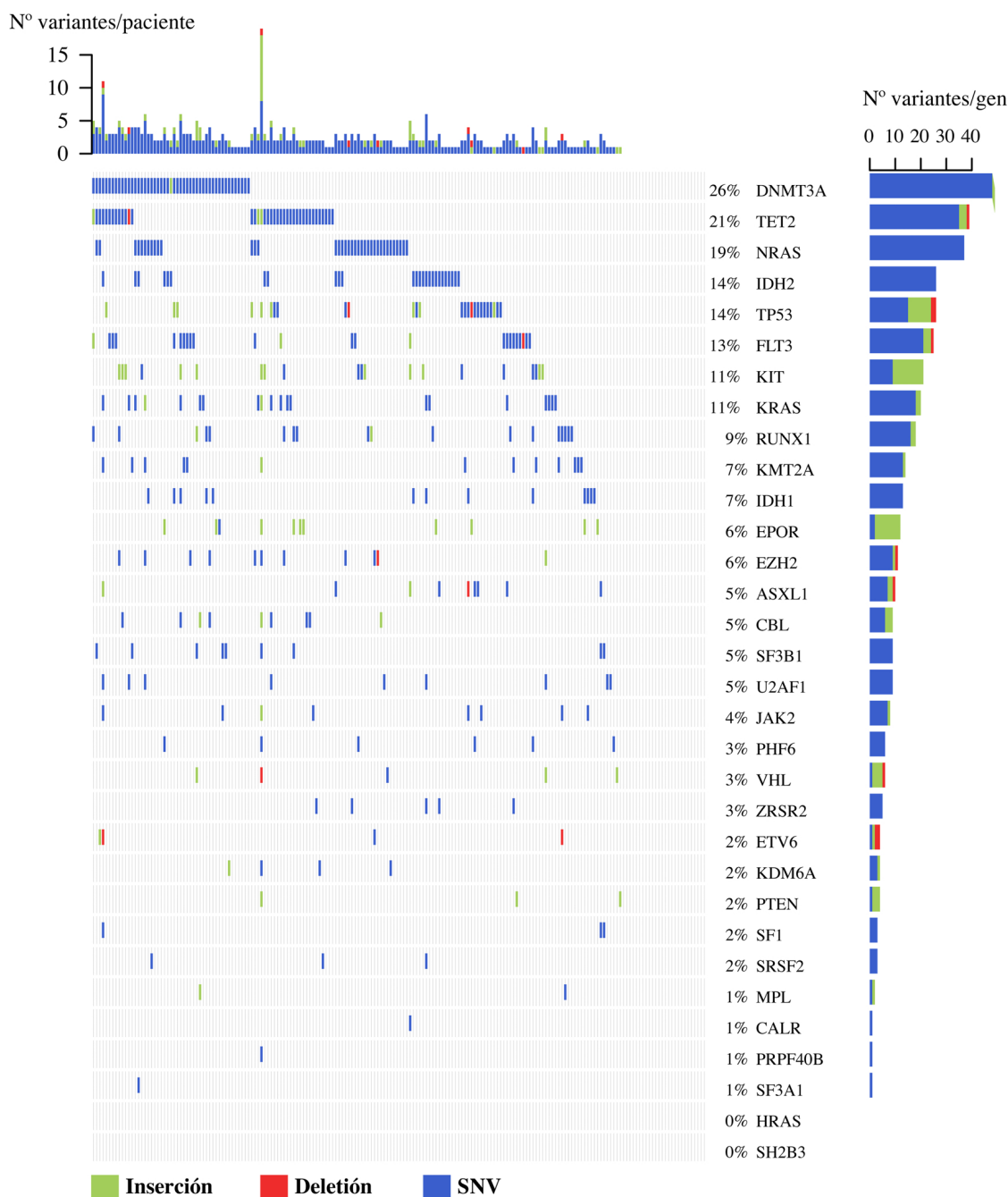


Figura 18. Frecuencia Poblacional de los Genes Estudiados por NGS

Cada columna representa un paciente y cada línea de color la presencia de variantes en el gen correspondiente. En la parte superior, se representa el número total de variantes (n=264) detectadas por paciente (n=190). Y a la derecha la frecuencia poblacional de los genes (n=32). En el gen *FLT3* solo se valoran las variantes tipo SNV. No se representa ni *NPM1* ni *CEBPA* al no estar incluidos en el panel de NGS.

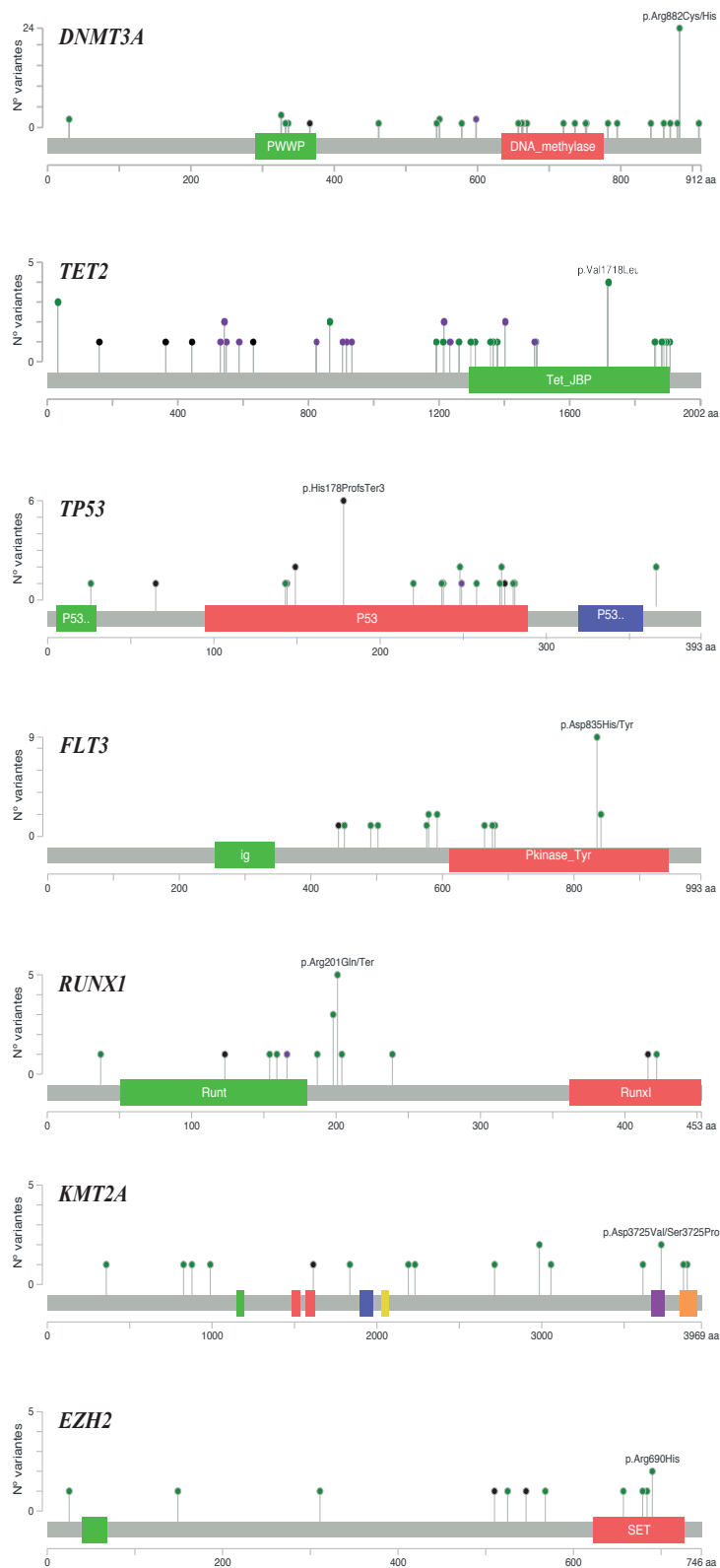


Figura 19. Distribución de las Variantes en los Genes

Se representa la distribución de las variantes en la secuencia aminoacídica de los más representativos: *DNMT3A*, *TET2*, *TP53*, *FLT3*, *RUNX1*, *KMT2A* y *EZH2*. Solo se anota la variante más recurrente. Las cajas de colores representan dominios funcionales. *EZH2* localiza sus variantes en el dominio SET, como se describe para esta patología en la cohorte TCGA. El tamaño de las barras verticales se asocia al número de pacientes en los que se identifica la variante y el color el tipo de variante (Missense Mutations; Truncating Mutations: Nonsense, Nonstop, Frameshift delección/inserción o sitio de splicing; Inframe Mutations: Inframe delección, Inframe inserción; Other Mutations).

Gen	Variantes detectadas	Pacientes afectados	Pacientes con 2 (*3; **4) variantes en el mismo gen	Mediana VAF % (rango)
DNMT3A	54	49	5	44 (4 - 72)
TET2	45	39	6	46,8 (2,3 - 82)
NRAS	43	37	6	16 (2,4 - 53)
IDH2	26	26	0	38,5 (2,7 - 55)
FLT3-SNV	26	24	2	18 (2,4 - 52)
TP53	27	26	1	27 (2,7 - 96)
KIT	24	20	3 *	9 (1 - 49)
KRAS	22	20	2	21 (0,6 - 48)
RUNX1	18	18	0	43,5 (2 - 88)
KMT2A	17	13	2 **	42 (3,4 - 51)
IDH1	13	13	0	41,5 (4,7 - 50)
EPOR	12	11	1	18,5 (3,8 - 52)
EZH2	12	11	1	39 (7 - 94)
ASXL1	10	9	1	47 (2,7 - 53,8)
CBL	10	9	1	22,5 (2,8 - 91)
SF3B1	9	9	0	36 (3,7 - 51)
U2AF1	9	9	0	42 (0,4 - 49,1)
JAK2	8	8	0	24,9 (4,5 - 51)
PHF6	6	6	0	8 (2,6 - 44)
VHL	7	5	1 *	29 (14 - 80)
ZRSR2	5	5	0	50,4 (4,6 - 92,2)
ETV6	4	4	0	32 (15 - 41,5)
KDM6A	5	4	1	17 (8,1 - 46,4)
PTEN	4	3	1	15,5 (6,2 - 32)
SF1	4	3	1	29,5 (5 - 50,4)
SRSF2	3	3	0	41 (35 - 47)
MPL	2	2	0	33 (15 - 51)
CALR	1	1	0	7,3
PRPF40B	1	1	0	7,4
SF3A1	1	1	0	40
HRAS	0	-	-	-
SH2B3	0	-	-	-

Tabla 12. Frecuencia Alélica de las Variantes (VAF) Detectadas

Se representa el gen donde se localiza las variantes, el número de variantes detectadas, el número de pacientes donde se detecta, el número de pacientes que presenta más de una variante en el mismo gen (*= presenta 3 variantes; **= presenta 4 variantes), así como la mediana de VAF y el rango de las variantes por gen.

- Vía *RAS* (n=54): *HRAS*, *KRAS* y *NRAS*
- Factores de transcripción (n=21): *ETV6* y *RUNX1*
- Supresores de tumores (n=32): *VHL*, *TP53* y *PTEN*

4.1.2.4. ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS Y/O GENÉTICAS

El estudio de asociación, o co-existencia entre las variantes detectadas en los distintos genes con variables clínicas y/o variables genéticas relativas a los 190 pacientes desveló:

- asociación entre manifestar cariotipo normal y presentar variantes alélicas en el gen *NPM1* [p=3,97⁻⁵; Odds Ratio (OR)=4,35 (IC 95%: 2,03-9,92)], o en el gen *DNMT3A* [p=0,030; OR=2,2 (IC 95%:1,07-4,70)]. Por lo contrario manifestar cariotipo complejo se asocia a la presencia de variantes en *TP53* [p=0,005; OR=3,62 (IC 95%:1,36-10,77)].

- asociación de los casos que debutan con más del 60% de blastos al diagnóstico y presentar variantes en el gen *FLT3*-ITD [p=0,024; OR=3,02 (IC 95%:1,12-9,52)], o en el gen *NPM1* [p=0,03; OR=2,22 (IC 95%:1,06-4,86)], o en pacientes con ausencia en variantes en *KMT2A* [p=0,036; OR=3,75 (IC 95%:1,00-17,36)].
- asociación entre pertenecer al grupo de riesgo pronóstico adverso con mutaciones en *TP53* [p=7,7⁻⁵; OR=5,77 (IC 95%: 2,24-15,42)], o asociación entre el grupo de riesgo pronóstico favorable con presentar mutaciones en *NPM1* [p=0,0001; OR= 7,31 (IC 95%: 2,16-38,76)] o en *FLT3*-SNV [p=0,011; OR= 8,24 (IC 95%: 1,26-348)].
- correlación entre LMA secundaria a SMD y mutaciones en *JAK2* [p=0,009; OR=7,41 (IC 95%: 1,36-50,23)].
- asociación entre refractariedad primaria al tratamiento de inducción y presentar variantes en el gen *TP53* [p=0,009; OR=3,34 (IC 95%: 1,31-9,07)] o en el gen *U2AF1* [p=0,031; OR=5,63 (IC 95%: 1,03-57)]; y de forma contrapuesta asociación entre los pacientes que alcanzan RC y los pacientes que presentan mutaciones en *NPM1* [p=0,048; OR=2,02 (IC 95%:1,00-4,35)].
- respecto al número de mutaciones se ha visto que existe correlación entre presentar 4 o más variantes con la presencia de variantes en los genes *CBL* [p=0,004; OR=16,83 (IC 95%: 2,13-114,95)], *EZH2* [p=0,007; OR=12,61 (IC 95%: 1,67-79,74)], *KIT* [p=0,005; OR=10,12 (IC 95%: 1,72-60,02)], *KMT2A* [p=0,012; OR=10,03 (IC 95%: 1,37-60,88)], *KRAS* [p=1,57⁻⁵; OR=34,35 (IC 95%: 5,52-377,06)], *U2AF1* [p=0,0002; OR=33,01 (IC 95%: 4,78-242,11)] y *VHL* [p=0,015; OR=18,86 (IC 95%: 1,34-200)].

Se observa también asociaciones entre pares de genes con variantes:

- *FLT3*-ITD co-existe con *NPM1* [p=1,36⁻⁶; OR=7,58 (IC 95%: 3,05-20,04)] y co-existe con *DNMT3A* [p=0,007; OR=3,10 (IC 95%: 1,27-7,55)]. Además, es mutuamente excluyente de *N/KRAS* [p=0,049; OR=0,34 (IC 95%: 0,08-1)]
- *NPM1* co-existe con *DNMT3A* [p=2,3⁻⁶; OR=5,37 (IC 95%: 2,52-11,66)], co-existe con *FLT3*-SNV [p=0,059; OR=3,69 (IC 95%: 1,40-9,90)] y co-existe con *TET2* [p=0,026; OR=2,45 (IC 95%: 1,09-5,46)]
- *CBL* co-existe con *KRAS* [p=0,0081; OR=8,07 (IC 95%: 1,45-41,90)] y co-existe con *TET2* [p=0,019; OR=5,33 (IC 95%: 1,09-28,42)]
- *EZH2* co-existe con *N/KRAS* [p=0,013; OR=4,86 (IC 95%: 1,17-23,70)] y con la vía de factores de transcripción [p=0,020; OR=5,36 (IC 95%: 1,04-23,80)].
- *KIT* co-existe con *PHF6* [p=0,016; OR=9,59 (IC 95%: 1,19-77,37)] y con la vía de regulación epigenética [p=0,025; OR=3,58 (IC 95%: 1-11,58)]
- *KMT2A* co-existe con genes de la vía de splicing [p=0,016; OR=4,84 (IC 95%: 1,13-18,8)]
- *KRAS* co-existe con *U2AF1* [p=4,4⁻⁵; OR=22,90 (IC 95%: 4,36-157)] y con la vía de *splicing* [p=0,007; OR=4,49 (IC 95%: 1,34-14,14)]
- *U2AF1* co-existe con *N/KRAS* [p=0,002; OR=9,84 (IC 95%: 1,79-100)]

4.1.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

4.1.3.1. IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN LA SUPERVIVENCIA

La mediana de supervivencia global de la serie fue de 13,5 meses (0,1-150,7) y la mediana de supervivencia libre de enfermedad de 10,20 meses (0,1-150,7), figura 20.

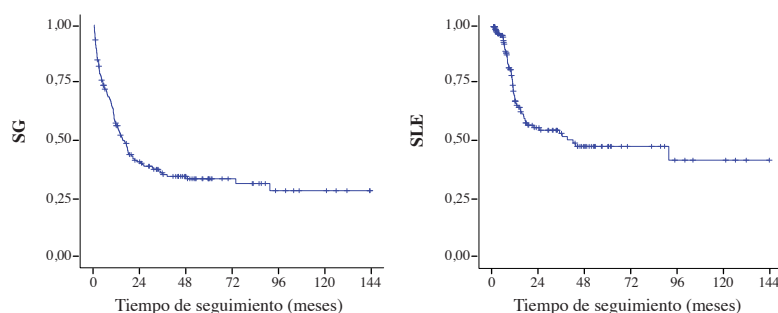


Figura 20. Curvas KM de SG y SLE de la Serie (N=185)

Se estimó el impacto en la supervivencia global (SG) y en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de las variables clínicas de mayor relevancia en esta patología: recuento de blastos y leucocitos al diagnóstico, género, edad al diagnóstico, clasificación según FAB, cariotipo, riesgo citogenético, origen de la LMA, refractariedad primaria al tratamiento de inducción, tipo de tratamiento de inducción, tipo de tratamiento de consolidación (transplante hematopoyético y tipo), así como mutaciones identificadas por biología molecular: *NPM1* y *FLT3-ITD*.

Se observó menor supervivencia en los pacientes con cariotipo alterado respecto al grupo de pacientes con cariotipo normal, tanto para SG ($p=0,031$) como para SLE ($p=0,022$), figura 21. Así como una menor supervivencia en los pacientes con riesgo pronóstico adverso (clasificación ELN 2010) que los pacientes con riesgo pronóstico intermedio y a su vez que el grupo de riesgo favorable, figura 22, aunque en este caso sin alcanzar significación estadística. La edad al diagnóstico también influye en la supervivencia, puesto que al aumentar la edad de los pacientes menor es su probabilidad de supervivencia global ($p<0,0001$) y su probabilidad de supervivencia libre de enfermedad ($p=0,006$), figura 23. Respecto al origen de la LMA, podemos observar que los pacientes con LMA secundarias tanto a SMD como LMA secundarias a otros tratamientos presentan menor supervivencia, SG ($p<0,0001$) y SLE ($p=0,05$), que las LMA *de novo*, figura 24.

Si analizamos el tipo de tratamiento de inducción, los pacientes que reciben esquema 3+7 tienen mayor supervivencia que los pacientes que reciben esquema FLUGA u otros tratamientos (azacitidina, fludarabina, decitabina), SG ($p=0,0001$) y SLE ($p=0,007$), figura 25. Los pacientes que presentan refractariedad primaria tienen una supervivencia acortada respecto a los pacientes que alcanzan remisión completa, SG ($p<0,0001$) y SLE ($p=0,005$), figura 26. Se ha podido observar que los pacientes que recibieron transplante hematopoyético alogénico o autólogo tienen

una probabilidad de supervivencia aumentada respecto a los pacientes que no recibieron trasplante durante el tratamiento de consolidación, SG ($p < 0,0001$) y SLE ($p = 0,022$), figura 27.

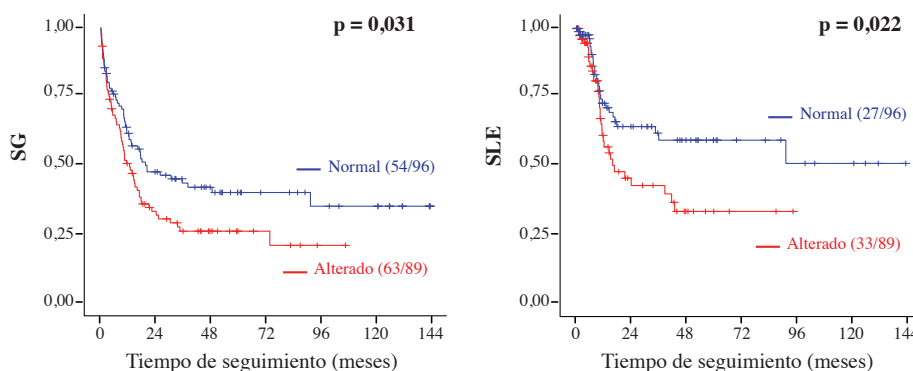


Figura 21. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Cariotipo al Diagnóstico.

Los pacientes con cariotipo alterado engloba pacientes con alteraciones citogenéticas relevantes y cariotipo complejos. La mediana de SG fue de 13,2 meses (cariotipo alterado) vs. 26,5 meses (cariotipo normal). La mediana de SLE de los pacientes fue de 17,3 meses (cariotipo alterado) vs. 43,5 meses (cariotipo normal). SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

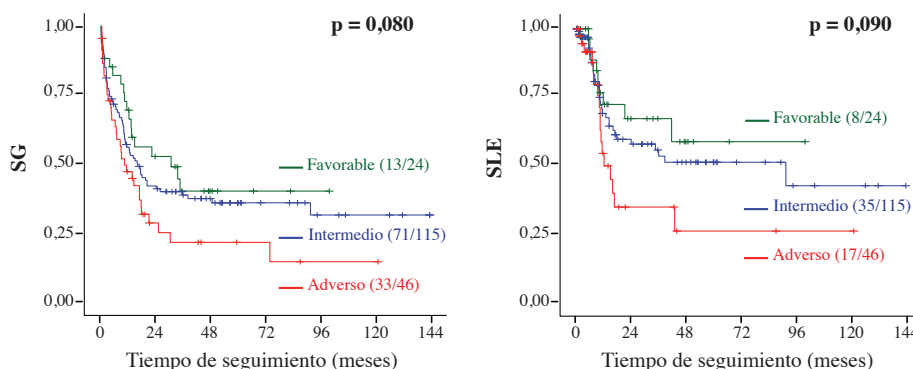


Figura 22. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Riesgo Pronóstico (ELN 2010)

La mediana de SG de los pacientes fue de 35,2 meses (riesgo favorable), 16,7 meses (riesgo intermedio) y 11,8 meses (riesgo adverso). La mediana de SLE de los pacientes fue de 95,8 meses (riesgo intermedio) y 15,5 meses (riesgo adverso). Para el grupo de riesgo favorable la mediana es no alcanzada. SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

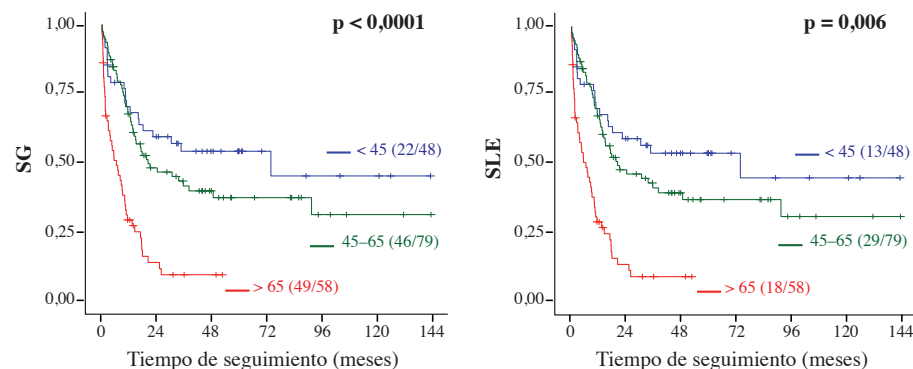


Figura 23. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Edad al Diagnóstico.

La mediana de SG de los pacientes fue de 77,4 meses (< 45 años), 21,2 meses (45-65 años) y 6,7 meses (> 65 años). La mediana de SLE de los pacientes fue de 43,5 meses (< 45 años) y 12,6 meses (45-65 años). Para el grupo de pacientes mayores de 65 años la mediana es no alcanzada. SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

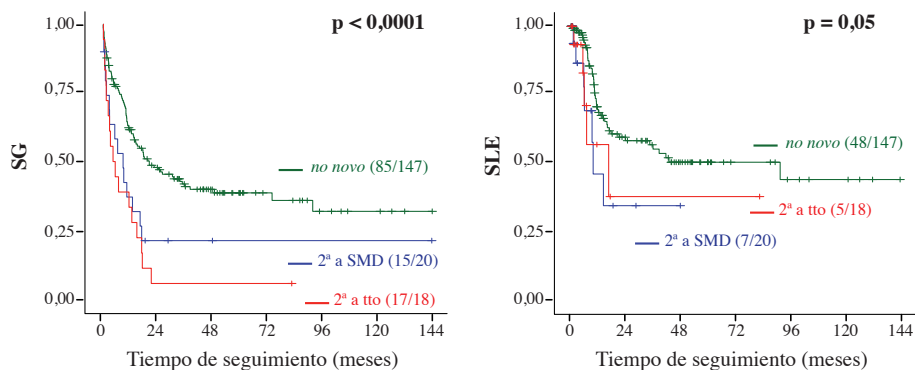


Figura 24. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Origen de LMA al Diagnóstico.

La mediana de SG de los pacientes fue de 21,2 meses (LMA *de novo*), 9,2 meses (LMA secundaria a SMD) y 5,1 meses (LMA secundaria a quimioterapia previa). La mediana de SLE de los pacientes fue de 95,8 meses (LMA *de novo*), 10,2 meses (LMA secundaria a SMD) y 17,3 meses (LMA secundaria a quimioterapia previa). SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad; tto= tratamiento; SMD= síndrome mielodisplásico. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

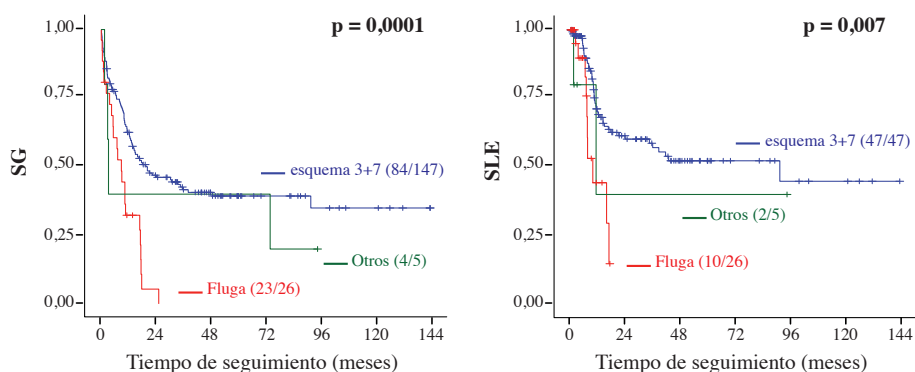


Figura 25. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Tratamiento de Inducción.

La mediana de SG de los pacientes fue de 21,2 meses (esquema 3+7 con cita-ida), 9,3 meses (esquema Fluga) y 3,4 meses (otros). La mediana de SLE de los pacientes fue de 95,8 meses (esquema 3+7 con cita-ida), 10,2 meses (esquema Fluga) y 11,7 meses (otros). SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total. Del grupo de otros tratamientos, 2 pacientes recibieron azacitidina, un paciente recibió decitabina y otros dos daunorubicina+cita.

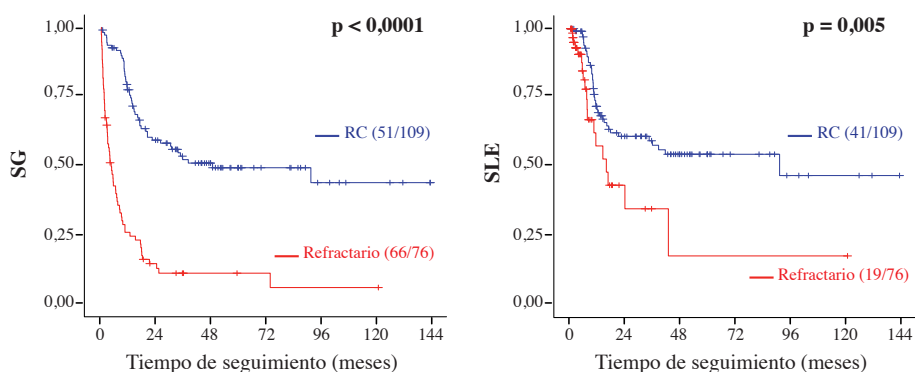


Figura 26. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Respuesta a la Inducción.

La mediana de SG de los pacientes fue de 51 meses (RC) y 4,6 meses (refractario). La mediana de SLE de los pacientes fue de 95,8 meses (RC) y 16,8 meses (refractariedad primaria). SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total; RC= remisión completa.

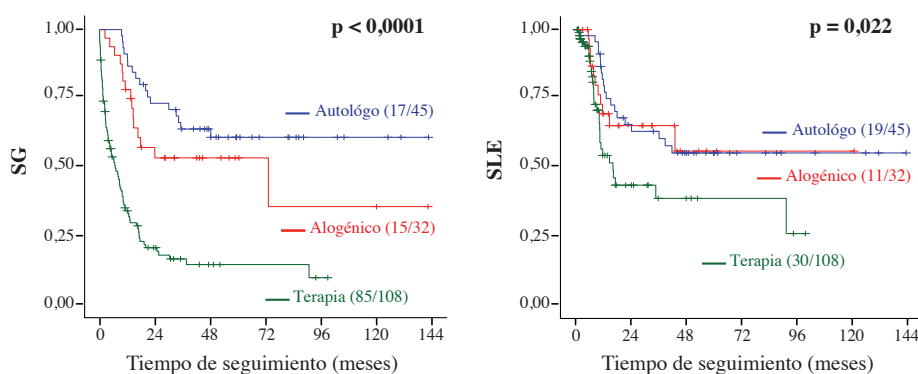


Figura 27. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Tratamiento de Consolidación.

La mediana de SG de los pacientes fue de 77,4 meses (trasplante alogénico) y 7,3 meses (terapia). Para el grupo de pacientes que recibieron trasplante autólogo la mediana es no alcanzada. La mediana de SLE de los pacientes fue de 16,5 meses (terapia). Para el grupo de pacientes que recibieron trasplante la mediana es no alcanzada SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

4.1.3.2. IMPACTO DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN LA SUPERVIVENCIA

El estudio del impacto de las variantes alélicas respecto a la supervivencia global revela que los pacientes con variantes en los genes *EZH2* (n=10, p=0,009), *KMT2A* (n=13; p=0,009), *TP53* (n=26; p<0,0001) o *U2AF1* (n=8; p=0,002) muestran menor supervivencia global que los pacientes sin variantes en los respectivos genes, figura 28. En relación a la supervivencia libre de enfermedad, el grupo de pacientes que presentan variantes en los genes *EZH2* (n=10, p=0,002), *SF3B1* (n=9; p=0,020), así como en genes supresores de tumores (*VHL*, *TP53* y *PTEN*; n=31, p=0,019) también confiere menor probabilidad de supervivencia que los pacientes no mutados en esos genes, figura 29.

Como se puede analizar en la figura 30, el aumento del número de genes mutados conlleva a una menor supervivencia. En el caso de supervivencia global se alcanza significación estadística cuando el paciente presenta 3 o más genes mutados (n=55; p=0,022) y en el caso de supervivencia libre de enfermedad cuando el paciente acumula al menos 4 genes mutados (n= 26; p=0,042).

Se hallaron resultados relevantes al realizar un análisis más exhaustivo en función de la coexistencia o la exclusividad de genes mutados, descartándose los hallazgos encontrados en grupos menores de 5 pacientes. En primer lugar, la supervivencia global de los pacientes mutados en *NPML* vs. los pacientes no mutados, no muestra diferencias significativas (n=53; p=0,16), sin embargo cuando estos se presentan en ausencia de *FLT3* (n=25; p=0,047), tanto SNV como ITD, en ausencia de *TET2* (n=36; p=0,015) o en ausencia de *TP53* (n=48; p=0,030), muestran mayor supervivencia global que los pacientes no mutados en *NPML*, figura 31.

Además, existen interacciones estadísticamente significativas entre parejas de genes, como en el caso de *CBL* que a priori no tiene valor pronóstico para supervivencia global (n=9; p=0,087) pero lo alcanza en ausencia de *FLT3*-ITD (n=7; p=0,014), en ausencia de *DNMT3A* (n=5; p=0,029) o en

ausencia de *KIT* (n=6; p=0,001), figura 32. También se observa que los pacientes mutados en *DNMT3A* (n=49; SG, p=0,266, SLE, p=0,074) presentan menor supervivencia si esta mutación co-existe con *IDH1* (n=5; SG, p<0,0001 y SLE, p=0,049; o si co-existe con *RUNX1* (SLE; n=5, p<0,0001), figura 33.

Cuando analizamos la supervivencia de los pacientes mutados en *DMNT3A* pero excluyendo aquellos pacientes con mutaciones en *JAK2* (n=47), en *KDM6A* (n=48) o en *EPOR* (n=46), vemos que la SLE es menor de este grupo de pacientes (p=0,045, p=0,046, p=0,039 y p=0,034, respectivamente), figura 34.

En el caso de *IDH1*(n=13; SLE, p=0,183), adquiere significación estadística cuando no presenta variantes en genes de la vía de señalización de citoquinas (n=7; p=0,006), figura 35.

Y el caso de *JAK2* (n=8; SG p=0,332), la diferencias de probabilidad de supervivencia global adquiere significación estadística entre grupos cuando no está mutado *NMP1* (n=5; p=0,005), figura 36.

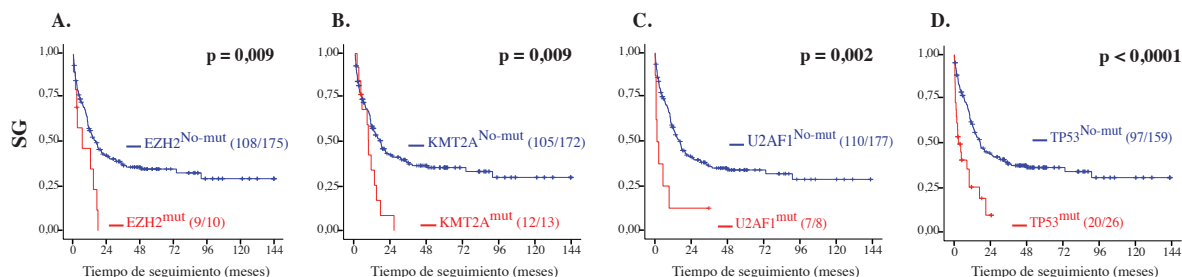


Figura 28. Curvas KM de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en los Genes *EZH2* (A), *KMT2A* (B), *U2AF1* (C), y *TP53* (D).

La mediana de SG de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 6,7 meses vs. 17 meses para *EZH2*, 9,3 meses vs.18 meses para *KMT2A*, 2 vs. 17,7 meses para *U2AF1* y 2,9 vs. 18,3 meses para *TP53*. SG= supervivencia global. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

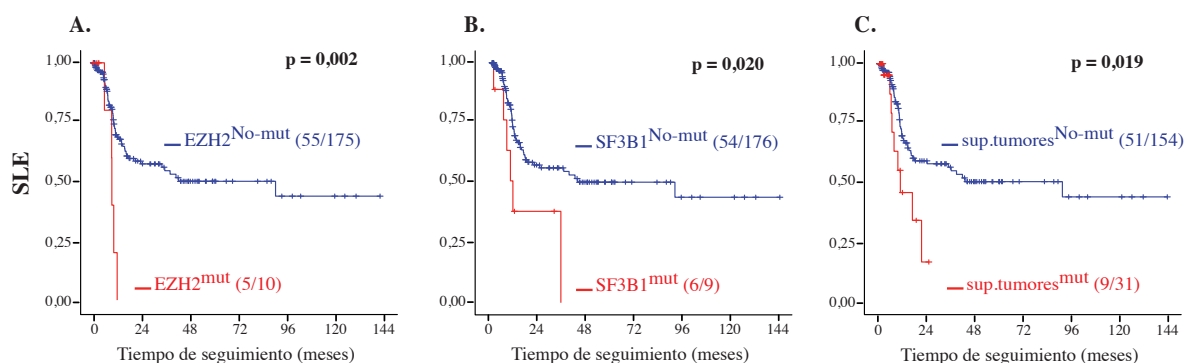


Figura 29. Curvas KM de SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en los Genes *EZH2* (A), *SF3B1* (B) y Grupo Supresor de Tumores (C; *VHL*, *TP53* y *PTEN*).

La mediana de SLE de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 9,8 meses vs. 95,8 meses para *EZH2*, 11 meses vs.95,8 meses para *SF3B1*, 11 vs. 95,8 meses para *VHL/TP53/PTEN*. SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

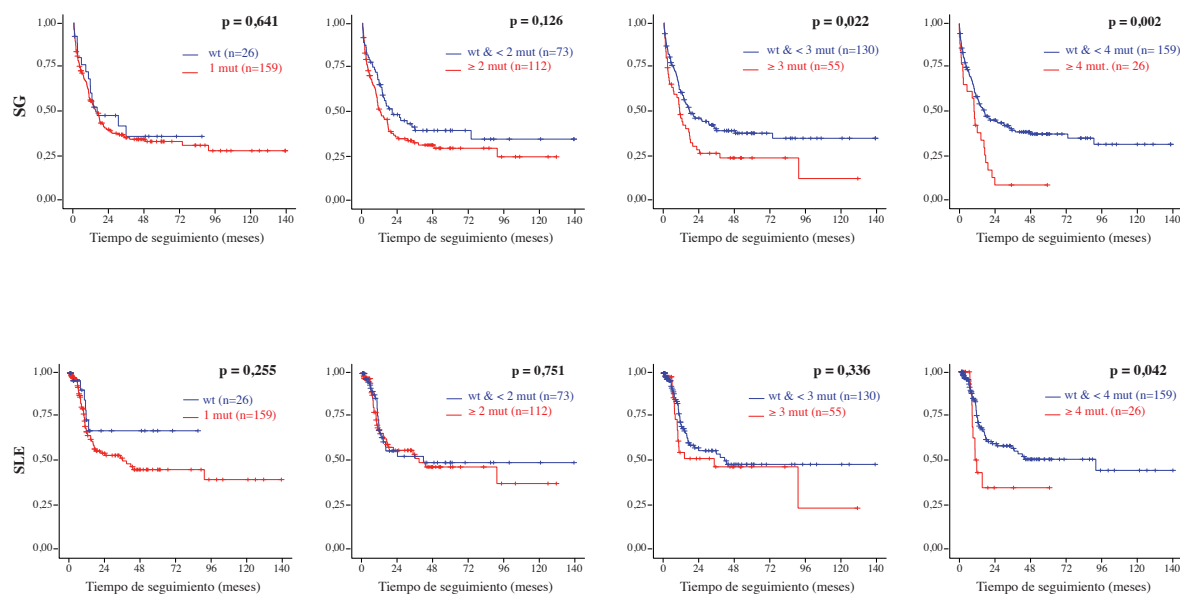


Figura 30. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Número Genes Mutados.
 SG= supervivencia global; SLE= supervivencia libre de enfermedad; wt= pacientes no mutados. En paréntesis se indica el número de casos total.

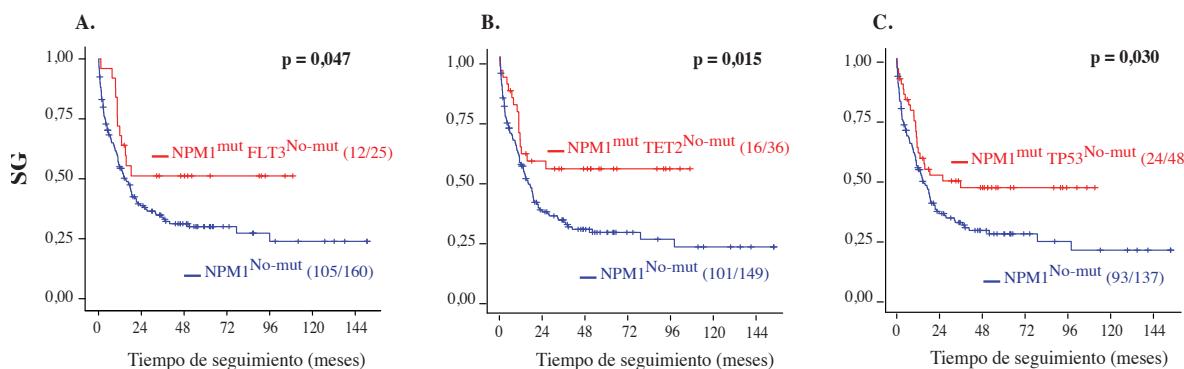


Figura 31. Curvas KM de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en *NPM1*, en Ausencia de Variantes en *FLT3* (A), o en *TET2* (B) o en *TP53* (C).
 La mediana de SG de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 6,7 meses vs. 17 meses para el caso A, de 6,7 meses vs. 17 meses para el caso B y de 6,7 vs. 17 meses para el caso C. SG= supervivencia global. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

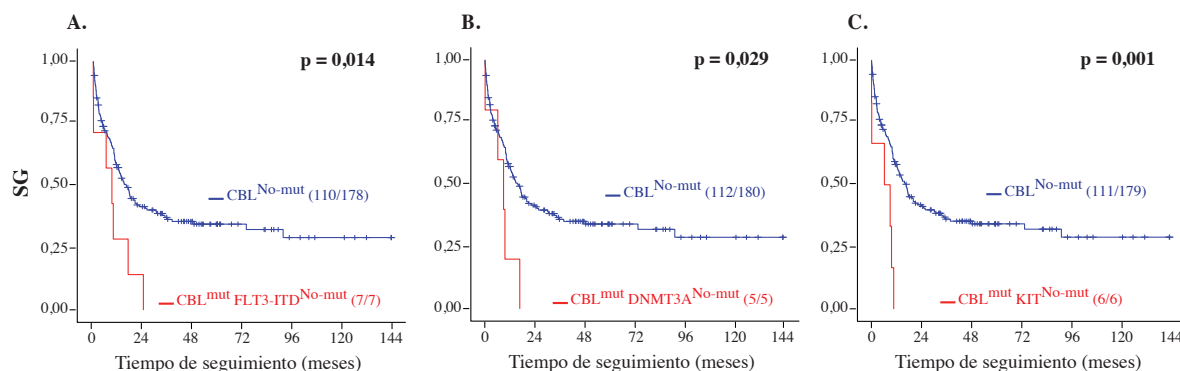


Figura 32. Curvas KM de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en *CBL*, en Ausencia de Variantes en *FLT3-ITD* (A), o en *DNMT3A* (B) o en *KIT* (C).
 La mediana de SG de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 9,5 meses vs. 16,7 meses para el caso A, de 9,5 meses vs. 16,7 meses para el caso B y de 8,05 vs. 17,7 meses para el caso C. SG= supervivencia global. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

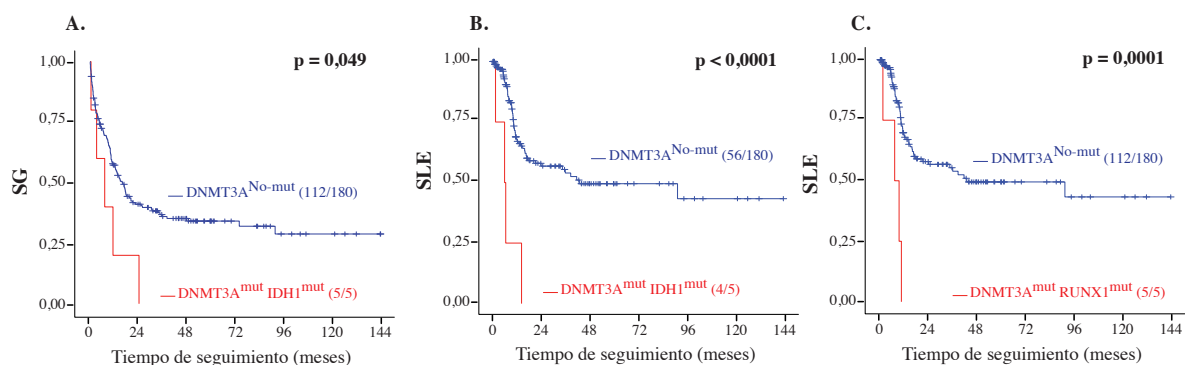


Figura 33. Curvas KM de SG y SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en *DNMT3A*, en Co-Existencia con Variantes en *IDH1* (A, B) o *RUNX1* (C).

La mediana de supervivencia de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 7,6 meses vs. 16,7 meses para el caso A, de 6,4 meses vs. 44,9 meses para el caso B y de 10,9 vs. 16,7 meses para el caso C. SG= supervivencia global. SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

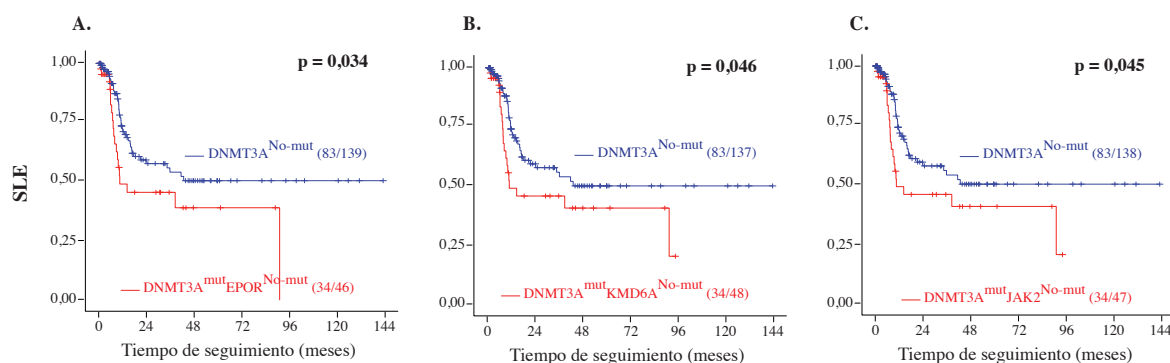


Figura 34. Curvas KM de SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Muta) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en el Gen *DNMT3A*, en Ausencia de Variantes en *EPOR* (A), *KDM6A* (B) y *JAK2* (C).

La mediana de SLE de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 11,2 meses vs. 18,2 meses para el caso A, de 11,3 meses vs. 18 meses para el caso B y de 11,9 vs. 18 meses para el caso C. SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

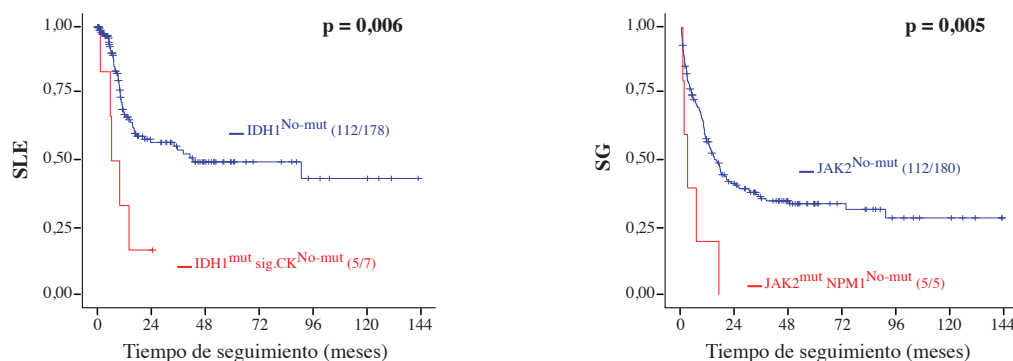


Figura 35. Curva de SLE de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No Mut) de Variantes en *IDH1* en Ausencia de Variantes en Genes de la Vía de Señalización de Citoquinas.

La mediana de SLE de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 7,6 meses vs. 16,7 meses SLE= supervivencia libre de enfermedad. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

Figura 36. Curva de SG de Grupos Categorizados Según Presencia (Mut) o Ausencia (No-Mut) de Variantes en *JAK2* en Ausencia de Variantes en *NPM1*.

La mediana de SG de los pacientes mutados respecto a los pacientes no mutados fue de 3 meses vs. 16,7 meses. SG= supervivencia global. En paréntesis se indica el número de eventos respecto al número de casos total.

4.1.4. RIESGO PRONÓSTICO

Con el fin de identificar factores independientes clínicos o/y genéticos con valor pronóstico en relación a la supervivencia de los pacientes, se realizó un test de regresión de *Cox*, descartando aquellos pacientes que recibieron tratamiento de soporte (n=7).

El test univariante desveló que el riesgo de muerte fue significativamente mayor en pacientes de edad avanzada (p<0,001), pacientes con LMA secundaria a SMD (p=0,019) u otras terapias (p<0,001), pacientes refractarios al tratamiento de inducción (p<0,001), pacientes que recibieron trasplante hematopoyético (p<0,001), pacientes del grupo de riesgo adverso (p=0,045), pacientes tratados con FLUGA (p<0,001), pacientes que presentan mutaciones en los genes *KMT2A* (p=0,003), *TET2* (p=0,045), *TP53* (p=<0,001) o *U2AF1* (p=0,002), o en pacientes con 4 o más genes mutados, (p=0,007), ver tabla 13. Respecto al análisis de riesgo de recaída, los resultados del test univariable confirman que el riesgo de recaída fue significativamente mayor en pacientes de edad avanzada (p=0,005), pacientes con LMA secundaria a SMD (p=0,046), pacientes refractarios al tratamiento de inducción (p=0,005) y pacientes tratados con FLUGA (p=0,003).

VARIABLES	Riesgo de Muerte			Riesgo de Recaída		
	HR (IC 95%)	p value		HR (IC 95%)	p value	
Edad (Años)	1,04 (1,02-1,05)	<0,001	***	1,03 (1,01-1,05)	0,005	**
Recuento Leucocitos (10 ⁹ /L)	1,00(1,00-1,00)	0,051		1,00(1,00-1,00)	0,078	
Respuesta inducción: Refractariedad vs. RC	4,68 (3,18-6,90)	<0,001	***	2,22 (1,27-3,87)	0,005	**
Tipo LMA: 2º-SMD vs. <i>de novo</i>	1,98 (1,12-3,51)	0,019	***	2,26 (1,01-5,03)	0,046	*
Tipo LMA: LMA+ vs. <i>de novo</i>	2,92 (1,72-4,97)	<0,001	***	2,04 (0,81-5,16)	0,132	
Riesgo citogenético: Adverso vs. Favorable	1,98 (1,02-3,84)	0,045	*	1,79 (0,77-4,15)	0,177	.
Cariotipo: Alterado vs. Normal	1,44 (0,99-2,09)	0,057	.	1,84 (1,10-3,09)	0,021	*
Trasplante: Autólogo vs. Terapia	0,20 (0,12-1,34)	<0,001	***	0,53 (0,26-1,07)	0,076	
Trasplante: Alogénico vs. Terapia	0,31 (0,18-0,54)	<0,001	***	0,53 (0,2-1,07)	0,076	.
Tipo tto: Fluga vs. 3+7	2,64 (1,64-4,24)	<0,001	***	2,92 (1,44-5,91)	0,003	**
TP53 Mut. vs. No mut.	2,99 (1,80-4,96)	<0,001	***	1,79 (0,71-4,52)	0,22	
U2AF1 Mut. vs. No mut.	3,43 (1,59-7,43)	0,002	**	1,06 (0,15-7,67)	0,955	
EZH2 Mut. vs. No mut.	2,04 (0,94-4,42)	0,07	.	4,04 (1,58-10,34)	0,004	**
TET2 Mut. vs. No mut.	1,55 (1,01-2,38)	0,045	*	1,36 (0,73-2,53)	0,328	
KMT2A Mut. vs. No mut.	2,60 (1,37-4,92)	0,003	**	2,19 (0,77-6,20)	0,14	
PTEN Mut. vs. No mut.	0,67 (0,16-2,74)	0,583		3,53 (1,10-11,36)	0,034	*
SF3B1 Mut. vs. No mut.	1,33 (0,62-2,86)	0,47		2,65 (1,13-6,20)	0,025	*
VHL Mut. vs. No mut.	1,61 (0,59-4,39)	0,35		3,45 (1,06-11,23)	0,04	*
Nº mutaciones panel: <=4 vs 0-3	1,93 (1,19-3,11)	0,007	*	2,03 (1,02-4,05)	0,043	*

Tabla 13. Análisis Univariante de los Factores Pronóstico

Se representan solo las variables con valor pronóstico para SG, SLE o para ambas supervivencias. Las variables incluidas en el análisis fueron: edad al diagnóstico, cariotipo al diagnóstico, riesgo citogenético, sexo, recuento de leucocitos al diagnóstico, recuento de blastos al diagnóstico, origen de la LMA, refractariedad primaria al tratamiento de inducción, tipo de tratamiento de inducción, presencia de variantes en los genes estudiados y número de mutaciones en el panel de NGS.

Así como en pacientes con mutaciones en *EZH2* ($p=0,004$), en *SF3B1* ($p=0,025$), o en *VHL* ($p=0,04$), así como la presencia de 4 o más genes mutados ($p=0,024$), tabla 13.

El conjunto de variables que fija el mejor modelo multivariable (selección hacia atrás) incluye: la edad del paciente al diagnóstico, recuento del número de blastos, tipo de LMA según origen de la misma (*de novo*, secundaria a SMD o secundaria a tratamientos quimioterápicos previos), cariotipo del pacientes en el diagnóstico, tratamiento de consolidación (trasplante hematopoyético), número de mutaciones detectadas mediante el panel de NGS; así como presencia de variantes alélicas en los genes *EZH2*, *ETV6*, *U2AFB1*, *EPOR*, *KMT2A*, *ZRSR2* y *TP53*.

VARIABLES	RIESGO DE MUERTE			RIESGO DE RECAÍDA		
	HR (IC 95%)	p value		HR (IC 95%)	p value	
Edad (años)	1,02 (1,00-1,03)	0,048	*	1,01 (0,99-1,04)	0,235	
Trasplante: Si vs. No	0,24 (0,14-0,39)	<0,001	***	0,37 (0,19-0,72)	0,003	**
Cariotipo: Alterado vs. Normal	1,52 (1,00-2,30)	0,05	.	2,21 (1,26-3,88)	0,006	**
Tipo LMA 2ª SMD vs. <i>de novo</i>	2,2 (1,16-4,14)	0,015	*	2,51 (1,00-6,32)	0,051	.
Tipo LMA 2ª tto vs. <i>de novo</i>	2,01 (1,12-3,59)	0,019	*	2,39 (0,88-6,49)	0,088	.
Recuento blastos (%)	1,01 (1,00-1,02)	0,032	*	1,01 (1,00-1,03)	0,037	*
TP53 Mut. vs.No mut.	2,79 (1,61-4,81)	<0,001	***	1,18 (0,41-3,43)	0,762	
U2AF1 Mut. vs.No mut.	2,98 (1,3-6,82)	0,009	***	0,77 (0,10-5,71)	0,794	
KMT2A Mut. vs.No mut.	2,24 (1,08-4,62)	0,029	*	1,06 (0,31-3,61)	0,931	
ZRSR2 Mut. vs.No mut.	0,2 (0,05-0,87)	0,033	*	0,28 (0,03-2,21)	0,225	
EZH2 Mut. vs.No mut.	2,42 (1,02-5,76)	0,046	*	3,77 (1,27-11,17)	0,017	*
Nº mutaciones panel: 0-3 vs. <=4	1,68 (0,96-2,93)	0,068	.	1,85 (0,84-4,04)	0,125	
PHF6 Mut. vs.No mut.	0,22 (0,03-1,34)	0,102		0,77 (0,18-3,25)	0,762	
EPOR Mut. vs.No mut.	0,45 (0,16-1,26)	0,129		0,71 (0,25-1,97)	0,129	

Tabla 14. Análisis Multivariante de los Factores Pronóstico.

El conjunto de variables que fija el mejor modelo multivariable (selección hacia atrás) incluye: edad, recuento de blastos, tipo de LMA, cariotipo, tratamiento de consolidación (trasplante), número de mutaciones, mutaciones en los genes *EZH2*, *ETV6*, *U2AFB1*, *EPOR*, *KMT2A*, *ZRSR2* y *TP53*.

Los resultados del modelo multivariable, tabla 14, afirman que los parámetros con valor pronóstico independiente de mayor riesgo de muerte son: edad avanzada (HR= 1,02), presentar cariotipo alterado (HR=1,52), presentar LMA secundaria tanto a SMD (HR=2,2) como a tratamientos previos (HR=2,01) y el aumento en el recuento de blastos (HR=1,01). Respecto a las variables estrictamente moleculares estudiadas por NGS vemos que la presencia de variantes con valor independiente de riesgo de muerte se da en los genes *TP53* (HR=2,79), *U2AF1* (HR=2,98), *KMT2A* (HR=2,24) y *EZH2* (HR=2,42), así como la presencia de 4 o más genes mutados (HR=1,68). Mientras que los parámetros que confieren menor riesgo de muerte son , la recibir trasplante hematopoyético (HR=0,24) tanto autólogo como alogénico y presentar mutaciones en el gen *ZRSR2* (HR=0,2).

Si se analiza el mismo modelo multivariable respecto al riesgo de recaída los parámetros con valor pronóstico independiente en este caso son: recibir trasplante hematopoyético (HR=0,24), el aumento de la edad al diagnóstico (HR=1,01), aumento en el número de blastos al diagnóstico (HR=1,01) , cariotipo alterado al diagnóstico (HR=2,22) y presencia de mutaciones en el gen *EZH2* (HR=3,77); tabla 14.

4.2. PERFIL MUTACIONAL EN EL FRACASO TERAPÉUTICO

Con el fin de conocer el papel que ejercen las mutaciones en los casos de refractariedad primaria al tratamiento de inducción, así como en los casos en los que la enfermedad resurge tras alcanzar remisión completa (RC), se llevó a cabo un estudio mediante NGS de la dinámica del perfil mutacional en los distintos estadios durante el transcurso de la enfermedad.

4.2.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE

Se seleccionaron de los 190 pacientes del estudio del perfil mutacional al diagnóstico detallado en el apartado previo, aquellos pacientes refractarios al tratamiento de inducción (n=10) y/o pacientes que sufrieron recaída tras alcanzar la RC (n=15). De los cuales dos pacientes presentaron tanto refractariedad primaria como recaída, y otros dos pacientes refractariedad secundaria al tratamiento de rescate tras la recaída. El tiempo de seguimiento fue de 127 meses. Los principales datos clínicos se contemplan en la tabla 15. Se analizaron un total de 96 muestras tomadas en distintos puntos de la evolución clínica de la enfermedad (diagnóstico, n=23; RC, n=31; Rp, n=4; refractariedad primaria, n=16; refractariedad secundaria, n=4; recaída, n=18).

	Nº pacientes (23)	
Sexo	Hombre	13 (57%)
	Mujer	10 (43%)
Edad al diagnóstico	Años, mediana (rango)	59 (24–77)
Blastos al diagnóstico	%, mediana (rango)	67 (7–94)
Leucocitos al diagnóstico	10 ⁹ /L, mediana (rango)	8,7 (1,2–145)
Tipo LMA	<i>De novo</i>	20 (87%)
	LMA-t	3 (13%)
Cariotipo	Normal	8 (35%)
	Alterado	15 (65%)
Riesgo citogenético	Favorable	3 (13%)
	Intermediario	12 (52%)
	Adverso	8 (35%)
TPH	Autólogo	10 (43%)
	Alogénico	3 (14%)
	No realizado	10 (43%)
Tipo tto inducción	Idarubicina +ARA-C (3+7)	20 (86%)
	Esquema FLUGA	2 (9%)
	Daunorubicina + ARA-C (3+7)	1 (5%)

Tabla 15. Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio de Fracaso Terapéutico.

ARA-C=citarabina, tto=tratamiento; TPH=trasplante hematopoyético; LMA-t= LMA secundaria a otras quimioterapias.

4.2.2. CASOS DE REFRACTARIEDAD PRIMARIA

Paciente 1

Mujer, 31 años. LMA *de novo* con cariotipo normal que presentaba translocación de *KMT2A* y *ETV6*. Recibió inducción con citarabina e idarubicina (esquema 3+7) resultando con persistencia de blastos. Recibió un segundo ciclo de inducción con citarabina a altas dosis y amsacrina resultando nuevamente con persistencia de blastos (muestra refractaria analizada, día 70).

Recibió un tercer ciclo de inducción con mitoxantrona, etopósido y gemtuzumab alcanzando la primera RC a los 4 meses desde el diagnóstico.

Al inicio de la enfermedad se detectaron variantes en *KIT* (p.Val950Met) y en *RUNXI* (p.Arg204Gln), en un 48% y 88% respectivamente. Variantes que se mantienen en la muestra de refractariedad en un 50% y 24%, además de presentar una nueva variante en *VHL* (p.Ile151TyrfsTer23); ver Paciente 1, figura 37.

Paciente 2

Mujer, 49 años, LMA secundaria a trombocitemia esencial con monosomía del cromosoma 7 y *FLT3*-ITD positivo. Recibió inducción con citarabina e idarubicina (esquema 3+7) resultando con persistencia de blastos (muestra refractaria analizada, día 104). Resistencia que mantuvo tras el primer tratamiento de rescate, compuesto por ARA-C a alta dosis y etopósido, y tras el segundo tratamiento con clofarabina.

Las variantes detectadas al diagnóstico se sitúan en *RUNXI* (p.Asp198Gly), *EZH2* (p.Cys528Arg) y *ETV6* (p.Asn405fs) (32%, 39%, 30%, respectivamente), y se mantuvieron presentes en la refractariedad (15%, 11%, 34%, respectivamente); mientras que la variante en *JAK2* (p.Val617Phe) detectada en un 7% no se manifiesta en la muestra de refractariedad; ver Paciente 2, figura 37. *FLT3*-ITD no se detectó en la muestra de refractariedad.

Paciente 3

Hombre, 69 años. Se trata de una LMA secundaria a SMPc, con hipodiploidía compleja (delección 5q, monosomía de los cromosomas 6, 8, 12, 13, 14 y 15). El paciente recibió tratamiento de inducción según esquema FLUGA dentro de la rama Azacitidina, al que mostró resistencia (muestra analizada, día 64).

Tres de las variantes detectadas al inicio de la enfermedad se mantuvieron en refractariedad: *ASXL1* (p.Glu1102Asp), *CALR* (p.Lys385fs) y *TP53* (c.839G>A), mientras que otra variante detectada también en *TP53* (c.841G>T, 2%) desapareció; ver Paciente 3 figura 37.

Paciente 4

Hombre, 77 años. LMA *de novo* con traslocación (8;21) y reordenamiento *RUNXI/RUNXITI*, así como *FLT3*-ITD mutado. Se le trató con esquema FLUGA (fludarabina y citarabina), siendo refractario a 2 ciclos de inducción (muestras estudiadas, día 34 y 101), finalmente recibió un tercer ciclo sin respuesta pero fallece sin alcanzar RC.

En el diagnóstico se detectó una variante en *KIT* (p.Asp419del) que se mantiene en ambos casos de refractariedad, ver Paciente 4, figura 37. Tanto el transcrito de fusión *RUNXI/RUNXITI* como la mutación en *FLT3*-ITD también se detecta en ambas muestras de refractariedad, aunque el ratio de ambas mutaciones va disminuyendo sucesivamente tras los ciclos administrados.

Paciente 5

Hombre, 62 años. LMA *de novo* con delección 5q y 17p. Comienza tratamiento de inducción según esquema 3+7 al que se manifiesta refractario (muestra secuenciada, día 43). A continuación, se le administra PleriFLAG como tratamiento de rescate al que también se mantiene refractario (muestra secuenciada, día 85), por lo que recibió azacitidina como alternativa terapéutica y pero mantiene la refractariedad (muestra secuenciada a día 146). Finalmente fallece sin alcanzar RC.

El paciente presenta variantes en *NRAS* (p.Gly13Cys) y en *TP53* (p.Cys275fs) en el diagnóstico, manteniendo ambas variantes en las todas las muestras de refractariedad analizadas, ver Paciente 5 figura 37.

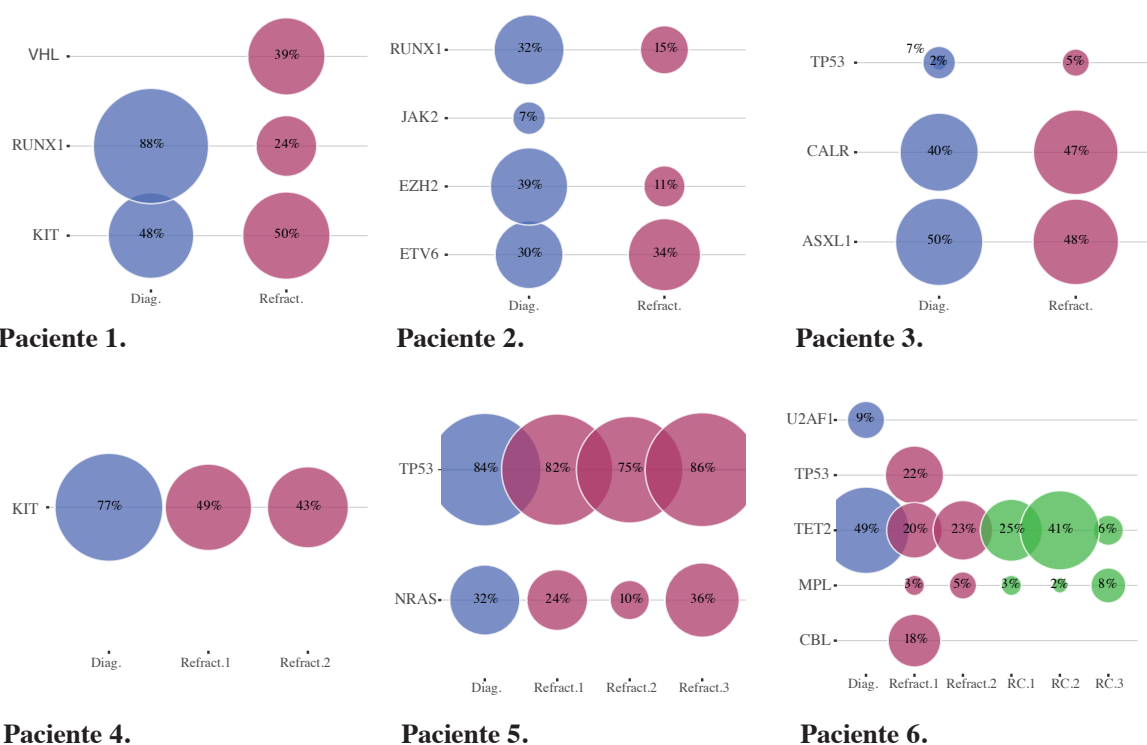


Figura 37. Dinámica del Perfil Mutacional en Casos de Refractoriedad Respecto al Diagnóstico.

Paciente 6

Hombre, 66 años. LMA *de novo* con trisomía del cromosoma 13 y monosomía del 21. Tras el primer ciclo con citarabina e idarubicina (esquema 3+7), se evaluaron dos muestras consecutivas que presentaron respuesta parcial (muestras secuenciadas, días 36 y 70). Se le administró un segundo ciclo con el mismo esquema de tratamiento tras el que alcanzó RC (muestras secuenciadas, días 119, 153, 165).

Se detectaron variantes en *U2AF1* (p.Gln157Arg) solo al diagnóstico, variantes en *TET2* (p.Tyr1182fs) en todas las muestras evaluadas; y variantes en *TP53* (p.His178ProfsTer3) y en *CBL* (p.Ser20LeufsTer61) únicamente en la primera muestra de refractariedad.

Además se detectó una variante en el gen *MPL* (p.Tyr591Asp) en todas las muestras salvo en la muestra de diagnóstico; ver Paciente 6 figura 37.

Paciente 7

Mujer, 35 años. LMA *de novo* con cariotipo alterado: trisomía 1q y monosomía del cromosoma 16. Tras el primer ciclo con citarabina e idarubicina (esquema 3+7), se estudiaron dos muestras consecutivas en las que el paciente se hallaba en respuesta parcial, por lo que se cambió el tratamiento a esquema FLAG-IDA (Fludarabina 60mg - 4 ciclos, Idarubicina 20mg -3 ciclos, Citarabina 4g - 4 ciclos). El paciente fallece al mes siguiente de la administración del tratamiento. El paciente no presenta variantes detectadas ni en el momento del diagnóstico ni en ninguna de las muestras evaluadas.

Paciente 8

Hombre, 24 años. LMA *de novo* que debuta con múltiples clones hiperdiploides de alta complejidad. Recibe tratamiento de inducción según esquema 3+7 con citarabina e idarubicina, pero se mantiene refractario (muestra estudiada, día 37). Recibe un segundo ciclo idéntico manteniéndose refractario (muestra secuenciada, día 64). Finalmente fallece antes de la siguiente evaluación.

El paciente no presenta variantes detectadas ni en el momento del diagnóstico ni en ninguna de las muestras evaluadas.

4.2.3. CASOS COMBINADOS DE REFRACTARIEDAD Y RECAÍDA

Paciente 9

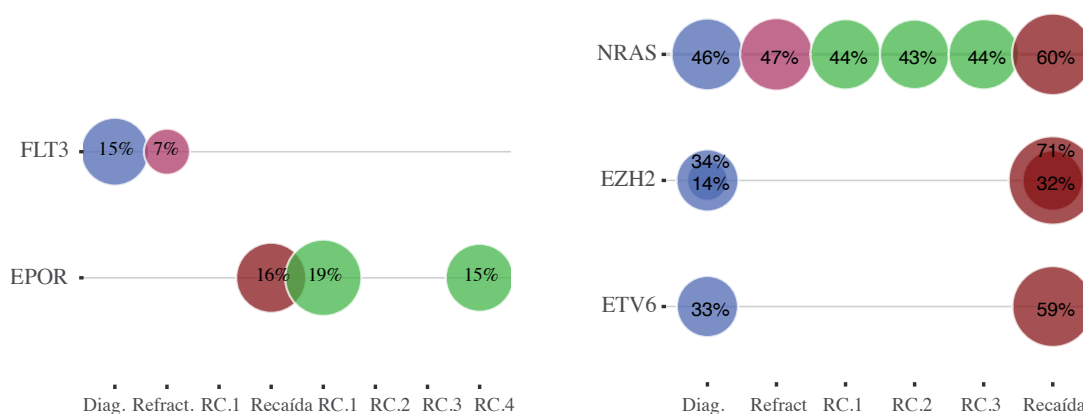
Hombre, 42 años. LMA *de novo*, con inversión del cromosoma 2(p25q12)(q21q22). Recibió citarabina y daunorubicina como primera línea de tratamiento de inducción, al que fue refractario (muestra secuenciada, día 25). Inició entonces un segundo ciclo de inducción idéntico tras el que alcanzó RC (muestra secuenciada, día 65), y 4 ciclos de consolidación (midostaurina y citarabina a 3g/m²). El paciente recae de forma precoz (muestra secuenciada, día 357), por lo que comenzó con tratamiento de rescate según esquema FLAG-Ida: fludarabina (60mg, 4 ciclos), Ida (20mg, 3 ciclos) y Cita (4g, 4 ciclos); el paciente vuelve a alcanzar remisión completa (muestra día 43 desde la recaída). Recibe un segundo ciclo de inducción con FLAG-Ida y mantiene RC (muestra día 101). Ante la respuesta completa recibe trasplante hematopoyético alogénico y se le evalúa nuevamente en RC (muestra secuenciada a mes 45 y mes 50 desde el trasplante).

En el momento del diagnóstico solo se le detectó variantes puntuales en *FLT3* (p.Asp835Tyr), que pasa de una VAF del 15% en el diagnóstico al 7% en la refractariedad, pero que luego no se manifiesta en ningún otro punto de evaluación. Sin embargo, cuando el paciente recae, adquiere una mutación en *EPOR* (p.Ala25GlyfsTer5), que mantiene en la primera evaluación de RC e incluso resurge en RC posterior al trasplante, 50 meses después; ver Paciente 9 figura 38.

Paciente 10

Mujer, 61 años. LMA *de novo*, presenta cariotipo complejo con hiperdiploidía de 70 cromosomas. Se le administró un primer ciclo de inducción según esquema 3+7 con citarabina e idarubicina, tras el que mantuvo persistencia de blastos en MO (muestra secuenciada, día 37), por lo que recibió un segundo ciclo bajo el mismo protocolo alcanzando RC (muestra secuenciada, día 85). Recibió consolidación con ARA-C a altas dosis manteniendo RC (muestra secuenciada, día 156) y trasplante autólogo manteniendo RC (muestra secuenciada a día 79 desde el trasplante). Sin embargo el paciente recae nuevamente (muestra secuenciada a día 152 desde el trasplante).

En el diagnóstico el paciente presenta una variante en *NRAS* (p.Gly12Asp) que manifiesta en todas las muestras evaluadas. Y variantes en *EZH2* (p.Tyr311Asn, p.Arg684Cys) y en *ETV6* (p.Tyr401Asp) que se detectan tanto en el diagnóstico como en la recaída 11 meses después y tras un trasplante autólogo; ver Paciente 10 figura 38.



Paciente 9.

Paciente 10.

Figura 38. Dinámica del Perfil Mutacional en Casos Combinados de Refractoriedad y Recaída Respecto al Diagnóstico.

4.2.4. CASOS DE RECAÍDA

Paciente 11.

Mujer, 61 años. LMA *de novo* con cariotipo normal. El paciente recibió un ciclo de inducción con idarubicina y citarabina (esquema 3+7), tras el que obtuvo respuesta. El tratamiento de consolidación consistió en dos ciclos idarubicina y citarabina (dosis intermedias) y un tercer ciclo con Ara-C a alta dosis, manteniendo RC hasta que recae 96 meses después (muestra evaluada).

Al inicio de la enfermedad se detectaron variantes en 4 genes: *KMT2A* (p.Glu502Lys), *FLT3* (p.Asn502Ile), *DNMT3A* (p.Asn879Asp) y *TET2* (p.Leu1212Ser), de los cuales los 3 primeros estaban presentes nuevamente en la recaída, mientras que *TET2* estaba ausente. Además surgieron nuevas variantes en *U2AF1* (p.Gln157Arg), *TP53* (p.Val173Met) e *IDH2* (p.Arg140Trp); ver Paciente 11 figura 39.

Paciente 12.

Hombre, 28 años. LMA *de novo* con inversión del 16 (p13;q22) y *CBF/MYH11* positivo. El paciente recibió ciclo de inducción según esquema de 3+7 estándar, logrando RC, después recibió un segundo ciclo idéntico y un tercer ciclo con ARA-C a alta dosis (1 g/m²) e Ida, manteniendo RC en todos los casos.

Se detecto enfermedad mínima residual durante el seguimiento y se le administró un único ciclo de rescate con amsacrina y ARA-C (3 g/m²), alcanzando nuevamente RC. El paciente recibió trasplante autólogo y pero sufre una recaída (muestra secuenciada a día 22 post trasplante). Se inicia entonces tratamiento de segunda línea según esquema Flag-IDA-GO (Mylotarg) compuesto por Fluda, Ida, Ara-C a altas dosis y Mylotarg, tras el cual alcanzó RC.

Se detectaron variantes en *FLT3* (p.Asn841Ile) y en *ZRSR2* (p.Gly438_Ser439insSerArg), tanto en el diagnóstico como en la recaída en porcentajes similares. Mientras que la variante presente en *PTEN* (p.Tyr161IlefsTer28) en el diagnóstico desaparece en la recaída y surge una nueva variante en *SF3B1* (p.Ser685Asn); ver Paciente 12 figura 39.

Paciente 13.

Mujer, 28 años. LMA *de novo* con trisomía del 13. Recibe tratamiento de inducción según esquema 3+7, responde de forma parcial, por lo que se le administra un segundo ciclo idéntico de inducción, entrando finalmente en primera RC. Recibe tratamiento de consolidación estándar con ARA-C a altas dosis, y trasplante autólogo, manteniendo RC. La enfermedad vuelve a aparecer y el paciente recae (muestra secuenciada a mes 33 tras el trasplante), por lo que se le administra como terapia de rescate FLAG-IDA, alcanzado nuevamente RC (muestra secuenciada a mes 35 tras el trasplante).

Todas las variantes detectadas en el diagnóstico, (*KMT2A*, p.Ser1325Asn; *IDH2*, p.Arg172Lys; *FLT3*, p.Ser446Leu; *DNMT3A*, p.Arg366fs) se detectan en la muestra de recaída pero no en la muestra de RC; ver Paciente 13 figura 39.

Paciente 14.

Mujer, 59 años. LMA *de novo*, con cariotipo normal. Se le administró un primer ciclo de inducción según esquema 3+7 con Cita e Ida, alcanzando RC, seguido de un ciclo de consolidación con mismo esquema, un segundo ciclo de consolidación con ARA-C a altas dosis y transplante autólogo, manteniendo siempre RC (muestra secuenciada a día 52 tras trasplante). Después sufrió una recaída (muestra secuenciada a mes 10 tras trasplante).

Se identificaron variantes en *KMT2A* (p.Thr3466Ala) tanto al diagnóstico, en RC y en la recaída; y en *IDH2* (p.Arg140Gln), en el diagnóstico y en la recaída; ver Paciente 14 figura 39.

Paciente 15.

Hombre, 62 años. LMA secundaria a SMPc, con cariotipo normal. Se le administró dos ciclos de inducción 3+7 (Cita+Ida), alcanzando RC (muestra secuenciada a día 46). La enfermedad progresó

tempranamente (muestra secuenciada a día 183), recibió trasplante alogénico, y volvió a recaer tras el mismo (muestra secuenciada a día 76 tras trasplante).

El estudio molecular detecta variantes en *TET2* (p.Arg1261Cys), *SF3B1* (p.Lys700Glu) y *DNMT3A* (p.Arg882Cys) en el diagnóstico y en ambas recaídas. Además se detecta variantes en *NRAS* (p.Gly13Asp) y *DNMT3A* (p.Arg326Leu) solo en el diagnóstico. No se detecta variantes en ninguna de las muestras de RC; ver Paciente 15 figura .

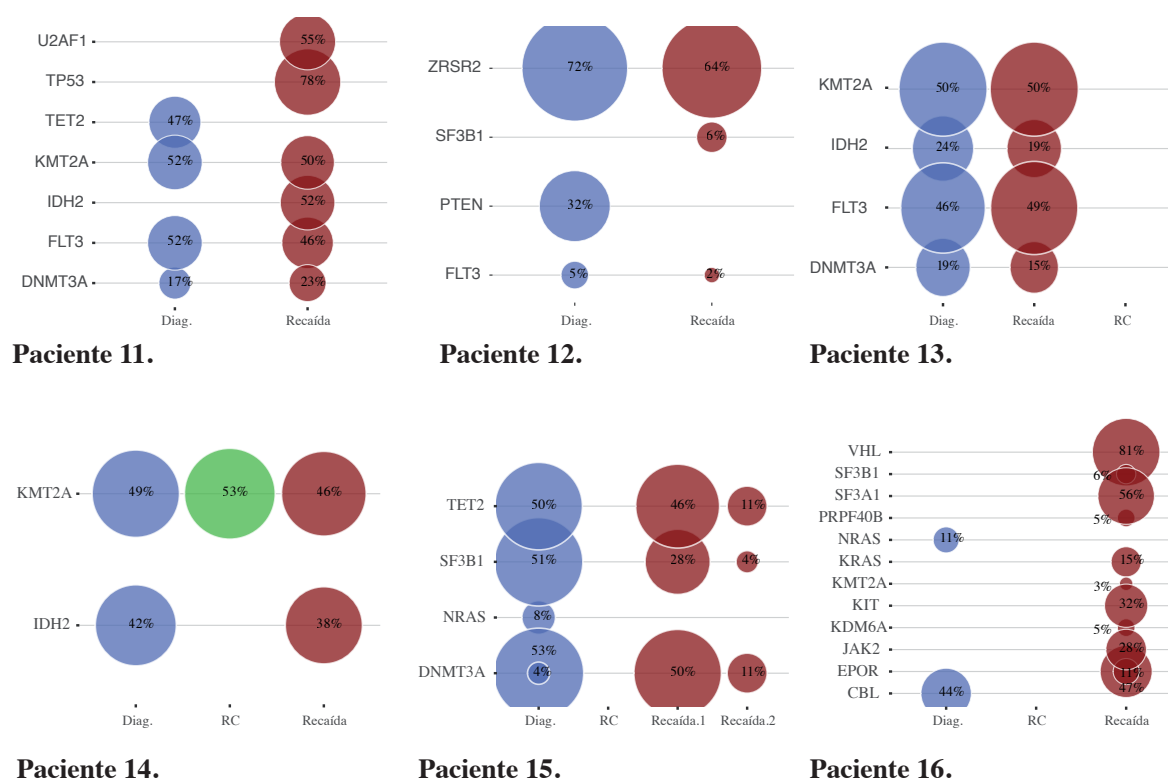


Figura 39. Dinámica del Perfil Mutacional en Casos de Recaídas Respecto al Diagnóstico (Pacientes 11-16).

Paciente 16.

Mujer, 34 años. LMA *de novo*, con delección del gen *KMT2A*. Se inició tratamiento de inducción estándar según esquema 3+7 (Ida+Cita), tras en que presentó respuesta parcial. Recibió entonces re-inducción según esquema 3+7 tras el que alcanzó RC; y un tercer ciclo de quimioterapia (consolidación con citarabina a alta dosis) manteniendo RC (muestra secuenciada a día 143). El paciente recibe trasplante autólogo pero recae (muestra a día 117 tras el trasplante) posteriormente recibiendo tratamiento de rescate según esquema FLAG-Ida (Ida, Fluda, Cita). Finalmente fallece tempranamente sin alcanzar RC.

En este caso solo se detectaron dos variantes: en *NRAS* (p.Gly13Asp) y en *CBL* (variante intrónica), las cuales no se manifiestan ni en la RC ni en la recaída. La muestra de la recaída acumula 11 variantes, distribuidas en: *SF3B1* (p.Phe466Ile, 6%), *PRPF40B* (p.Gly559Ala, 5%), *KMT2A* (p.Ile2714Met, 3%), *KDM6A* (p.Leu72Arg, 5%), *KRAS* (p.Asp132GlufsTer12, 15%),

EPOR (p.Thr448Asn, 11%; p.Leu17ArgfsTer13, 47%), *JAK2* (p.His770LeufsTer17, 28%), *KIT* (p.Leu862AlafsTer17, 32%), *SF3A1* (p.Ala663fs, 56%), y *VHL* (p.Ile151TyrfsTer23, 81%), ver Paciente 16 figura 39.

Paciente 17.

Hombre, 71 años. LMA *de novo*, con cariotipo normal y *NPM1* detectado por qPCR. Recibe primer ciclo de inducción con cita e ida (esquema 3+7) mostrando respuesta parcial, por lo que recibe un segundo ciclo idéntico tras el que alcanza RC. La consolidación se pauta con ARA-C a alta dosis; sin embargo, manifiesta recaída temprana (muestra secuenciada a día 204). Tras el tratamiento de rescate vuelve a alcanzar RC sin embargo recae tempranamente (muestra a día 35 post segunda RC), tras la que recibe tratamiento con azacitidina, pero fallece en corto plazo.

Se detectan variantes en los genes *TP53* (p.Ser366Ala), *JAK2* (p.Asn1108Ser), *IDH1* (p.Arg132Cys), *ASXL1* (p.Gly966del) y *KMT2A* (p.Arg736Met). El perfil de los 3 momentos analizados es similar ya que los genes están mutados en todos ellos, a excepción de *KMT2A* que está ausente en la segunda recaída; ver Paciente 17 figura 40.

Paciente 18.

Hombre, 51 años. LMA *de novo* con inversión del cromosoma 16 y expresión del transcrito *CBFB/MYH11* por qPCR. Recibe el primer ciclo de quimioterapia según esquema 3+7, alcanzando RC (muestra analizada a día 46). Recibió un nuevo ciclo 3+7 manteniendo RC (muestra secuenciada a día 79), el tratamiento de consolidación se estableció con ARA-C a altas dosis, acabando en trasplante autólogo. Mantuvo respuesta completa (muestra secuenciada a mes 12 desde el trasplante) durante años, sin embargo recae nuevamente (muestra secuenciada a 37 meses tras trasplante). Recibe FLAG-IDA como tratamiento de rescate, al que es refractario inicialmente pero alcanza RC posterior.

Se detecta variantes en *ASXL1* (p.Pro963Leu) al diagnóstico que se mantiene en las 3 muestras de RC así como en la de recaída, en torno al 50% de carga alélica, variantes en *NRAS* (p.Gln61His) exclusivamente en el diagnóstico y por último variantes en *SF3B1* (p.Ser685Asn) que surge *de novo* en la recaída; ver Paciente 18, figura 40.

Paciente 19.

Hombre, 71 años. LMA *de novo* con trisomía del 6 y traslocación (20;6)(p12;q13). Se le administró un primer ciclo de quimioterapia 3+7 (ida, cita). Tuvo una respuesta rápida, por lo que se le administra otros dos ciclos 3+7 como consolidación, manteniendo RC. Sin embargo recae (muestra secuenciada a mes 10), e inicia tratamiento de rescate con FLUGA (Fluda y Cita) pero sin alcanzar RC y fallece tempranamente.

Se identifican dos variantes tanto en la muestra de diagnóstico como en la recaída, una en *FLT3* (p.Ser446Leu) y otra en *DNMT3A* (p.Phe734LeufsTer6); ver Paciente 19, figura 40.

El paciente recae (muestra secuenciada, mes 11) y comienza tratamiento de segunda línea según ensayo clínico PERIFLAG, compuesto por un ciclo de inducción combinado de fludarabina, citarabina, idarubicina y plerixafor, alcanzando RC (muestra secuenciada a día 64 tras la recaída). A continuación recibe un primer ciclo de consolidación compuesto por ARA-C y plerixafor; y un segundo ciclo compuesto por citarabina, G-CSF y plerixafor, manteniendo RC (muestra secuenciada a día 186 tras recaída). El paciente sufre una segunda recaída, (muestra secuenciada a mes 9 de la primera recaída) pero no recibe ningún otro tratamiento alternativo ante la adversidad del cuadro clínico que cursa, falleciendo a los dos meses.

El paciente presenta variantes en *VHL* (p.Ile151TyrfsTer23) exclusivamente en el diagnóstico. Presenta variantes en *SF3B1* (p.Ser685Asn) tanto en el diagnóstico, como en 3 de las RC y en ambas recaídas. Presenta variantes en *RUNX1* (p.Phe416LeufsTer185) en el diagnóstico y en ambas recaídas. Además presenta variante en *IDH2* (p.Arg172Lys) de forma notoria en el diagnóstico y ambas recaídas, y de forma residual (1%) en RC intermedias; y presenta variantes en *DNMT3A* (p.Arg882Cys) detectadas en todas las muestras evaluadas. Por último se detecta una variante en *KRAS* (p.Gly12Ser) que aparece exclusivamente en la segunda recaída,; ver Paciente 21, figura 40.

Paciente 22.

Mujer, 64 años. LMA *de novo* con cariotipo normal. Se le administró tratamiento de inducción según esquema 3+7 entrando en RC (muestra secuenciada a día 31), continuó con el tratamiento de consolidación estándar, un ciclo idéntico al de inducción y un segundo ciclo de ARA-C a altas dosis (muestra secuenciada a 131), culminado en trasplante autólogo, tras el que muestra recuperación parcial (muestra secuenciada a día 66 tras el trasplante). Se le administra PLERIFLAG como tratamiento de rescate, presentando respuesta parcial al ciclo de inducción del mismo (muestra secuenciada a día 37), y refractariedad al final de la consolidación (muestra analizada a día 101).

Al inicio de la enfermedad se detecta variantes en *PHF6* (3%, p.Gly275Glu) que se mantiene en la recaída (83%), y en *CBL* que se mantiene en el mismo orden de carga alélica en todas las muestras evaluadas; ver Paciente 22, figura 40.

Paciente 23.

Mujer, 35 años. LMA *de novo* con alteraciones en el cariotipo, t(9;11) y fusión gen *MLL*. Se le administra tratamiento 3+7 estándar tras el cual entra en RC (3 muestras secuenciadas), recibe un ciclo de consolidación 3+7 y un ciclo de ARA-C a altas dosis seguido de trasplante autólogo. Finalmente, la enfermedad se manifiesta de nuevo once meses después del tratamiento (muestra secuenciada) y el paciente recibe tratamiento de rescate PERIFLAG. Sin embargo, el paciente muestra resistencia absoluta en las 3 evaluaciones posteriores (muestras secuenciadas a día 30, 63, 101).

En este paciente no se detecta ninguna variante alélica en ninguna de las 7 muestras estudiadas.

4.2.5. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA SERIE

En conjunto se detectaron 72 variantes distintas, ver Anexo 6, con una mediana de cobertura de 1044 (20-6123) lecturas por base nucleotídica y una mediana de carga alélica del 36 % (1%-95%). De las 72 variantes 51 (70%) eran SNV y 21 (30%) pequeñas inserciones (n=16) o deleciones (n=5). Respecto al efecto, se identificaron 50 variantes *missense*, una variante *stop gained*, una variante *inframe deletion*, 4 variantes *frameshift deletion*, una variante intrónica, 14 variantes *frameshift insertion* y una variante *nonframeshift insertion*.

De tal manera que en el momento del **diagnóstico** (n=23) se detectaron 58 variantes entre los 23 pacientes estudiados, de los cuales 3 no presentaron ninguna mutación ni al inicio de la enfermedad ni en ningún otro momento de evaluación, dos de los pacientes presentaron una variante, 9 de los pacientes presentaron 2 variantes, uno de los pacientes presentó 3 variantes, 5 pacientes presentaron 4 variantes y 3 pacientes presentaron 5 variantes; lo que supone una mediana por paciente de 2 variantes (0-5) en el momento inicial de la enfermedad.

En el momento de **refratariedad** se analizaron 20 muestras, de las cuales 5 no presentaron variantes, 7 muestras presentaron una variante, 4 muestras presentaron 2 variantes, 3 muestras presentaron 3 variantes y una sola muestra presentó 4 variantes. La mediana por muestra en el estado de refratariedad fue de 1 (0-4). En el momento de RC se analizaron 31 muestras, de las cuales 12 muestras no presentaron variantes, 12 muestras presentaron una variante, 5 muestras presentaron 2 variantes y 2 muestras presentaron 3 variantes. La mediana por muestra en el estado de RC fue de 1 (0-3).

En el momento de **recaída** se analizaron 18 muestras, de los cuales una muestra no presentó variantes, una muestra presentó una variante, 5 muestras presentaron 2 variantes, 3 muestras presentaron 3 variantes, 4 muestras presentaron 4 variantes, y otras tres muestras presentaron 5 o más variantes. La mediana por muestra en el estado de recaída fue de 3 (0-11).

Si analizamos la dinámica de las variantes de manera individualizada, ver tabla 16, y tomando cada caso de refratariedad y cada variante como una entidad independiente obtenemos un tamaño muestral de 33 eventos pareados **refratariedad vs. diagnóstico**. Los genes involucrados en los casos pareados diagnóstico-refratariedad, en orden de recurrencia son: *TP53* (n=6), *NRAS* (n=4), *KIT* (n=3), *RUNX1* (n=2), *TET2* (n=2), *MPL* (n=2), *U2AF1* (n=2), *JAK2* (n=1), *ASXL1* (n=1), *CALR* (n=1), *CBL* (n=1), *ETV6* (n=1), *EZH2* (n=1), *FLT3-SNV* (n=1) y *VHL* (n=1).

Además se observa que en 20 ocasiones las variantes al diagnóstico siguen presentes en la refratariedad, 7 de ellas desaparecen y 5 surgen *de novo*. El estudio de la frecuencia alélica de las variantes detectadas en refratariedad respecto al diagnóstico, determina una mediana de fluctuación de -20% [(-64%)-(+39%)], ver figura 41.

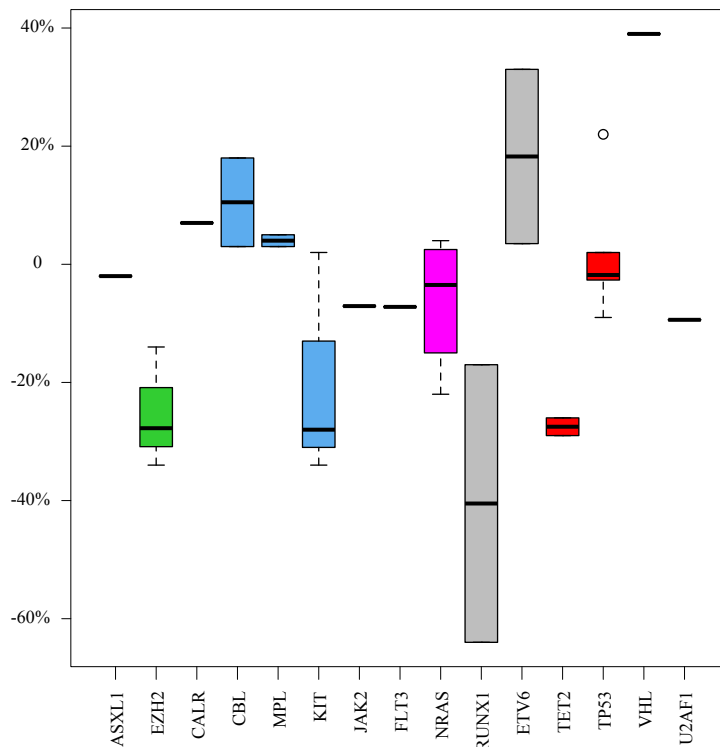


Figura 41. Fluctuación de la VAF en Refractoriedad Respecto a Diagnóstico

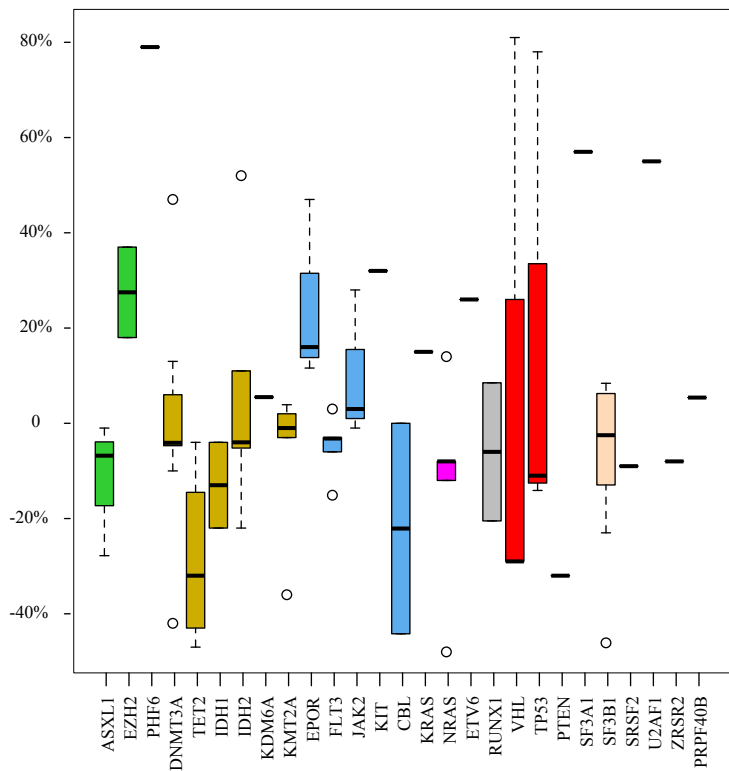


Figura 42. Fluctuación de la VAF en Recaida Respecto a Diagnóstico

Nuevamente, si analizamos la dinámica de las variantes de manera individualizada, ver tabla 16, tomando ahora cada caso de recaída y cada variante como una entidad independiente, obtenemos un tamaño muestral de 76 eventos pareados **recaída vs. diagnóstico** en los que los genes involucrados, en orden de recurrencia, son: *DNMT3A* (n=9), *SF3B1* (n=7), *KMT2A* (n=6), *TP53* (n=3), *IDH2* (n=5), *FLT3-SNV* (n=5), *TET2* (n=4), *ASXL1* (n=3), *EPOR* (n=3), *JAK2* (n=3), *VHL* (n=3), *RUNX1* (n=2), *EZH2* (n=2), *IDH1* (n=2), *KRAS* (n=2), *CBL* (n=2), *NRAS* (n=5), *ETV6* (n=1), *KDM6A* (n=1), *KIT* (n=1), *PHF6* (n=1), *PRPF40B* (n=1), *SF3A1* (n=1), *SRSF2* (n=1), *U2AF1* (n=1), *PTEN* (n=1) y *ZRSR2* (n=1).

En este sentido observamos que en 46 eventos las variantes al diagnóstico siguen presentes en la recaída, 13 de ellas desaparecen y 17 surgen *de novo*. El estudio de la frecuencia alélica de las variantes detectadas en recaída respecto al diagnóstico, determina una mediada de fluctuación de -30% [(-48%) - (+81%)], ver figura 42.

Respecto a las muestras estudiadas en RC, se evaluaron 77 eventos pareados **diagnóstico vs. RC**, de los cuales se ha visto que 51 de los eventos desaparecen en la muestra de RC, 21 siguen presentes y 7 surgen *de novo*, ver tabla 16. Las variantes que desaparecen en RC respecto al diagnóstico se localizan en los genes: *IDH2* (n=7/7), *NRAS* (n=5/8), *DNMT3A* (n=3/8), *TET2* (n=4/7), *EZH2* (n=6/6), *RUNX1* (n=5/5), *VHL* (n=5/5), *FLT3* (n=5/5), *ETV6* (n=3/3), *U2AF1* (n=3/3), *CBL* (n=1/3), *PHF6* (n=2/2), *KMT2A* (n=1/2) y *SF3B1* (n=1/1). Además las variantes que se detectan en el diagnóstico y se mantienen en RC se localizan en los genes *TET2* (n=3/7), *NRAS* (n=3/8), *KMT2A* (n=1/2), *CBL* (n=2/3), *DNMT3A* (n=5/8), *ASXL1* (n=4/4) y *SRSF2* (n=3/3).

Excepcionalmente, las variantes que aparecen *de novo* en RC y que no estaban presentes en las respectivas muestras al diagnóstico involucra a dos genes: *MPL* (n=3/3) y *EPOR* (n=2/2). En los 3 casos de *MPL* la mutación también se detectan en dos de las muestras de refractariedad previas (paciente 6, figura 37), y los 2 de los casos de *EPOR* las mutaciones también se identifican previamente como *de novo* en una muestra de recaída evaluada anterior a las muestras en RC (paciente 9, figura 38).

Para conocer el impacto que pueda ejercer la dinámica clonal en los pacientes con LMA se hizo un estudio comparativo de la VAF mediana detectada en los distintos genes en el momento del diagnóstico respecto a la VAF mediana detectada en las muestras en refractariedad, respecto a la VAF mediana detectada en las muestras en RC o respecto a la VAF mediana detectada en las muestras en recaída.

El análisis de los niveles de frecuencia alélica denotan dinámica clonal. Si se agrupan las variantes detectadas en los distintos genes y en los distintos momentos de evaluación establecidos, podemos observar la frecuencia que presentan:

- **ASXL1**: $VAF_{dx} = 0,5$; $VAF_{Refrac.} = 0,48$; $VAF_{RC} = 0,52$; $VAF_{Recaída} = 0,47$
- **CALR**: $VAF_{dx} = 0,4$; $VAF_{Refrac.} = 0,47$
- **CBL**: $VAF_{dx} = 0,47$; $VAF_{Refrac.} = 0,36$; $VAF_{RC} = 0,51$; $VAF_{Recaída} = 0,5$
- **DNMT3A**: $VAF_{dx} = 0,27$; $VAF_{RC} = 0,13$; $VAF_{Recaída} = 0,25$
- **EPOR**: $VAF_{RC} = 0,19$; $VAF_{Recaída} = 0,16$
- **ETV6**: $VAF_{dx} = 0,32$; $VAF_{Refrac.} = 0,34$; $VAF_{Recaída} = 0,59$
- **EZH2**: $VAF_{dx} = 0,34$; $VAF_{Refrac.} = 0,11$; $VAF_{Recaída} = 0,52$
- **FLT3**: $VAF_{dx} = 0,46$; $VAF_{Refrac.} = 0,08$; $VAF_{Recaída} = 0,47$
- **IDH1**: $VAF_{dx} = 0,47$; $VAF_{Recaída} = 0,34$
- **IDH2**: $VAF_{dx} = 0,3$; $VAF_{RC} = 0,01$; $VAF_{Recaída} = 0,38$
- **JAK2**: $VAF_{dx} = 0,29$; $VAF_{Recaída} = 0,5$
- **KDM6A**: $VAF_{Recaída} = 0,06$
- **KIT**: $VAF_{dx} = 0,63$; $VAF_{Refrac.} = 0,49$; $VAF_{Recaída} = 0,32$
- **KMT2A**: $VAF_{dx} = 0,5$; $VAF_{Recaída} = 0,46$
- **KRAS**: $VAF_{Recaída} = 0,15$
- **MPL**: $VAF_{Refrac.} = 0,04$; $VAF_{RC} = 0,03$
- **NRAS**: $VAF_{dx} = 0,32$; $VAF_{Refrac.} = 0,3$; $VAF_{RC} = 0,44$; $VAF_{Recaída} = 0,6$
- **PHF6**: $VAF_{dx} = 0,04$; $VAF_{Recaída} = 0,83$
- **PTEN**: $VAF_{dx} = 0,32$
- **PRPF40B**: $VAF_{Recaída} = 0,054$
- **RUNX1**: $VAF_{dx} = 0,32$; $VAF_{Refrac.} = 0,20$; $VAF_{Recaída} = 0,22$
- **SF3A1**: $VAF_{Recaída} = 0,57$
- **SF3B1**: $VAF_{dx} = 0,29$; $VAF_{RC} = 0,06$; $VAF_{Recaída} = 0,06$
- **SRSF2**: $VAF_{dx} = 0,41$; $VAF_{RC} = 0,033$; $VAF_{Recaída} = 0,32$
- **TET2**: $VAF_{dx} = 0,48$; $VAF_{Refrac.} = 0,22$; $VAF_{RC} = 0,25$; $VAF_{Recaída} = 0,13$
- **TP53**: $VAF_{dx} = 0,32$; $VAF_{Refrac.} = 0,75$; $VAF_{Recaída} = 0,46$
- **U2AF1**: $VAF_{dx} = 0,09$; $VAF_{Recaída} = 0,55$
- **VHL**: $VAF_{dx} = 0,29$; $VAF_{Refrac.} = 0,39$; $VAF_{Recaída} = 0,81$
- **ZRSR2**: $VAF_{dx} = 0,72$; $VAF_{Recaída} = 0,64$

De tal manera que se ha visto diferencias entre el diagnóstico y la RC en los genes entre las mismas en la caso de: *DNMT3A*: (VAF_{dx} vs. VAF_{RC} ; $p=0,094$) y en el caso de *IDH2* (VAF_{dx} vs. VAF_{RC} ; $p=0,026$). También se observan diferencias entre el diagnóstico y la recaída en el gen *PRPF40B*: (VAF_{dx} vs. $VAF_{Recaída}$; $p=0,05$). Y diferencias entre el diagnóstico y la refractariedad en el gen *TET2* (VAF_{dx} vs. $VAF_{Refrac.}$; $p=0,001$).

	Refractariedad			RC			Recaída		
	Dx + Refrac.+	Dx + Refrac.-	Dx - Refrac.+	Dx + RC +	Dx + RC -	Dx - RC +	Dx + Recaída +	Dx+ Recaída-	Dx- Recaída+
ASXL1	1			4			3		
EZH2	1	2			6		2		
PHF6					2		1		
CALR	1								
DNMT3A				5	3		7	2	
TET2	2			3	4		3	1	
IDH1							2		
IDH2					7		4		1
KMD6A									1
KMT2A				1	1		4	1	1
SF3A1									1
SF3B1					1		4		3
SRSF2							1		
U2AF1		2			3				1
ZRSR2				3			1		
PRPF40B									1
MPL			2			3			
EPOR						2			3
FLT3-	1				5		4	1	
JAK2		1					2		1
KIT	3								1
CBL			2	2	1		1	1	
NRAS	4			3	5		1	4	
KRAS									2
ETV6	1	1			3		1		
RUNX1	2				5		2		
VHL			1		5		1	2	
TP53	4	1	1				2		1
PTEN								1	
N total	20	7	6	21	51	5	46	13	17

Tabla 16. Variantes Involucradas en los Casos de Seguimiento de la Enfermedad.

Se detalla el número de eventos en las distintas muestras pareadas: muestra al diagnóstico vs. refractariedad, RC ó recaída. **Dx +**, indica variantes detectadas en las muestras al diagnóstico; **Dx -**, indica variantes ausentes en las muestras al diagnóstico; **Refrac. +**; indica variantes detectadas en las muestras de refractariedad primaria; **Refrac. -**; indica variantes ausentes en las muestras de refractariedad primaria. **RC +**; indica variantes detectadas en las muestras de remisión completa; **RC -**; indica variantes ausentes en las muestras de remisión completa; **Recaída +**; indica variantes detectadas en las muestras de recaída; **Recaída -**; indica variantes ausentes en las muestras de recaída. N= número de eventos.

4.3. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

4.3.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE

Se analizaron 106 muestras de ADN_g tomadas en remisión completa, correspondiente a un total de 63 pacientes diagnosticados de LMA no M3 y tratados según protocolos PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología) o CETLAM (Grupo cooperativo de Estudio y Tratamiento de Leucemias Agudas y Mielodisplasias). Los principales datos clínicos se representan en la tabla 17.

Nº pacientes (63)		
Tipo de muestra	MO	58 (92%)
	SP	5 (8%)
Sexo	Hombre	21 (33%)
	Mujer	42 (67%)
Edad al diagnóstico	Años, mediana (rango)	54 (20–84)
Blastos al diagnóstico	%, mediana (rango)	69 (20–96)
Leucocitos al diagnóstico	10 ⁹ /L, mediana (rango)	15,7 (0,61–123)
Tipo LMA	De novo	59 (94%)
	Secundaria	4 (6%)
Cariotipo	Normal	58 (92%)
	Alterado	5 (8%)
FLT3-ITD	FLT3-ITD negativo	49 (78%)
	FLT3-ITD positivo	14 (22%)
Riesgo citogenético	Favorable	25 (40%)
	Intermediario	36 (57%)
	Adverso	2 (3%)
Transplante hematopoyético	Autólogo	7 (11%)
	Alogénico	14 (22%)
	No realizado	42 (67%)
Casos de recaída		21 (33%)
Tiempo hasta 1ª recaída	Meses, mediana (rango)	10 (1–150)
Casos de muerte		24 (38%)
Tiempo de seguimiento	Meses, mediana (rango)	21,8 (10,9–131,8)
Tipo de tto inducción	Esquema 3+7	50 (80%)
	Flugaza	8 (13%)
	Mylotarg	2 (3%)
	Panobidara	3 (4%)
Respuesta al tto de inducción	RC	105 (57%)
	Rp	30 (16%)
	Resistencia	19 (10%)
	Muerte	31 (17%)
Tiempo hasta 1ª RC	Días, mediana (rango)	35 (0–159)

Tabla 17. Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio de EMR.

MO, indica médula ósea ; SP, sangre periférica; y ITD, internal tandem duplications.

La mayoría de los pacientes (n=50) siguieron tratamiento según esquema 3+7: 1-2 ciclos de citarabina e idarubicina , y 2-3 ciclos de consolidación a altas dosis de citarabina seguido de transplante hematopoyético. El resto recibieron otros esquemas de tratamiento según ensayos clínicos: Fluga (n=8), Mylotarg (n=2), y Panobidara (n=3).

4.3.2. SECUENCIACION A ALTA PROFUNDIDAD

Se ha diseñado y validado, técnica y clínicamente, un nuevo método de alta profundidad mediante secuenciación masiva para la detección y cuantificación de niveles mínimos de mutación en el seguimiento de los pacientes con LMA.

Este método incluye un primer análisis de los pacientes al diagnóstico, mediante estudios genéticos por NGS (panel custom de 32 genes) y análisis de *NPM1* mediante qPCR. Y un segundo abordaje que conforma el estudio de EMR propiamente dicho. En el que las mutaciones específicas detectadas en el diagnóstico serán candidatas a estudio en los momentos de evaluación de EMR, post-inducción y post-consolidación.

4.3.2.1. APLICABILIDAD Y SENSIBILIDAD DE LA NGS EN EMR

El estudio inicial al diagnóstico detecta una variante en 52 pacientes (27%), 2 variantes distintas en 60 pacientes (32%) y 3 o más variantes en 55 pacientes (29%), siendo 23 (12%) pacientes los que no presentan alteraciones moleculares incluidas en el panel de diseño propio.

Por lo tanto, un total de 167 pacientes, lo que representa el 86 % de nuestra cohorte, portan una variante susceptible de ser evaluada en el transcurso de la enfermedad, confiriendo a la técnica una alta aplicabilidad. Aunque si se descartan mutaciones tipo CHIP la aplicabilidad en pacientes con LMA es del 82%.

Para establecer el límite de cuantificación (LOQ, *del inglés Limit of Quantification*) de la técnica, se utilizaron diluciones seriadas 1/10 de la muestra mutada en muestra no mutada para cada mutación específica. Se establecieron dos prototipos de estudio, el primero usando la línea celular OCI-AML3 como prototipo para evaluar InDels ya que presenta *NPM1* tipo A, c. 863_864insCCTG, mutado al 50%; y un segundo prototipo para evaluar SNVs, usando ADN_g de referencia mutado al 50% en *IDH1* (R132C), o al 50% en *IDH2* (R172K) o nuevamente usando la OCI-AML3 que también presenta *DNMT3A* (R882C) mutado al 50%.

De tal manera que, para todos los casos, partiendo de una frecuencia alélica del 50% y completando una serie de 6 diluciones se establecieron las distintas curvas de calibración, cubriendo un rango dinámico teórico entre 10^{-1} y 10^{-7} . El método cuantifica la frecuencia clonal en términos absolutos como el ratio de secuencias mutadas respecto al ratio de secuencias no mutadas, y como se muestra en la figura 43, es capaz de cuantificar una célula mutada entre 100 000 células presentes (LOQ 10^{-5}) para el caso de *NPM1* (InDel), y de cuantificar una célula entre 10 000 células presentes (LOQ 10^{-4}) en el caso de *IDH1*, *IDH2* y *DNMT3A* (SNV.), demostrando a su vez uniformidad para todos los SNV testados.

4.3.2.2. VALIDACIÓN TÉCNICA DE LA NGS EN EMR

El mismo procedimiento relativo a las curvas de calibración usada para determinar la sensibilidad mediante NGS se llevó a cabo para determinar la sensibilidad alcanzada usando PCR digital (dPCR). La frecuencia clonal, expresada en términos de concentración (copias mutadas/ μ L respecto a copias no mutadas/ μ L), disminuye en cada dilución hasta cuantificar inequívocamente una célula mutada entre 1000 células totales (LOQ 10^{-3}) para *NPM1* y para *IDH1* e *IDH2*, figura 44.

El método para cuantificar EMR basado en NGS es más sensible que la dPCR, ya que el LOQ relativo a SNV es un orden de magnitud mayor y de dos órdenes de magnitud en el caso de evaluar *NPM1*.

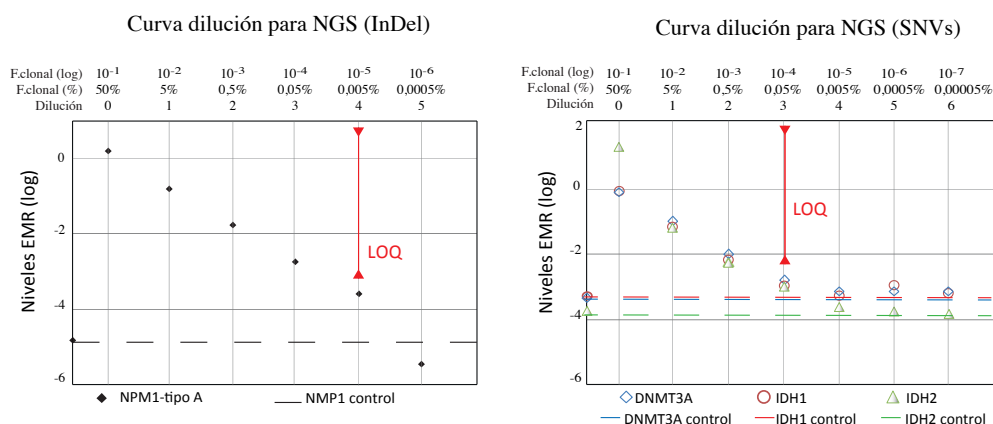


Figura 43. Curvas de Calibración Para Detectar EMR Mediante NGS

Curva de dilución 1/10 utilizada para el cálculo de sensibilidad del método basado en NGS en el caso de prototipo de InDel, (izquierda) empleando ADN-g procedente de OCI-AML3 con mutación *NPM1*-tipo A al 50%; ($r_{\text{pearson}}=0,99$); y en el caso de prototipo de SNVs (derecha), empleando ADN-g de OCI-LMA3 con mutación en *DNMT3A* (R882C) al 50%; y ADN-g de referencia con mutación en *IDH1* (R132C) & *IDH2* (R172K) ambas al 50% ($r_{\text{pearson}}=0,93$; $r_{\text{pearson}}=0,90$; $r_{\text{pearson}}=0,95$; respectivamente).

Las barras en rojo indican el LOQ acode a cada prototipo. F.= frecuencia

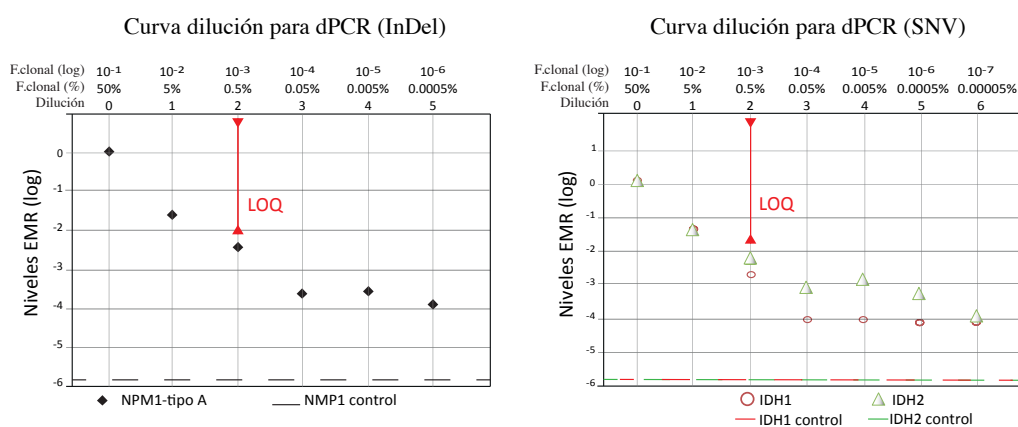


Figura 44. Curvas de Calibración Para Detectar EMR Mediante dPCR

Curva de dilución 1/10 utilizada para el cálculo de sensibilidad de dPCR en el caso de prototipo de InDel, (izquierda) empleando ADN-g procedente de OCI-AML3 con mutación *NPM1*-tipo A al 50%; ($r_{\text{pearson}}=0,89$); y en el caso de prototipo de SNVs (derecha), empleando ADN-g de referencia con mutación en *IDH1* (R132C) & *IDH2* (R172K) ambas al 50% ($r_{\text{pearson}}=0,94$; $r_{\text{pearson}}=0,85$; respectivamente).

Las barras en rojo indican el LOQ acode a cada prototipo. F.= frecuencia

4.3.3. VALIDACIÓN CLÍNICA DE LA NGS EN EMR

Una vez establecido la aplicabilidad del método en un alto porcentaje de los pacientes, y realizado las validaciones técnicas de la misma. Se llevó a cabo una validación clínica para comprobar si los valores establecidos mediante esta tecnología tienen valor predictivo en la supervivencia de pacientes con LMA.

Para ello, se evaluaron 106 muestras de seguimiento, tomadas en dos puntos del tratamiento (post-inducción y post-consolidación), y con presencia de mutaciones en *NPM1* (n=88), *IDH1* (n=9), *IDH2* (n=7) y/o *FLT3-SNV* (n=2) al diagnóstico.

La mediana de cobertura obtenida fue de 500 000 secuencias totales. Ninguna secuencia mutada fue hallada en 13 (12%) de las muestras, entre 1-5 secuencias mutadas se detectaron en 19 (18%) de las muestras y en el resto (n=74, 70%) se detectaron más de 10 secuencias mutadas.

El ratio de secuencias mutadas alineadas entre secuencias no mutadas alineadas define el valor de EMR. El nivel de EMR determinado por el método para cada una de las 106 muestras en relación a la probabilidad de supervivencia (SG y SLE) nos permite fijar un umbral de corte óptimo. Los puntos de corte óptimos se establecieron mediante curvas ROC, tabla 18 y figura 45, para cada momento del tratamiento evaluado, post-inducción (0,00094) y post-consolidación (0,00026), u ambos (0,00035). con el objetivo de clasificar adecuadamente a los pacientes en dos grupos:

- pacientes con EMR positiva (EMR⁺): pacientes con valores de EMR por encima del umbral
- pacientes con EMR negativa (EMR⁻): pacientes con valores de EMR por debajo del umbral

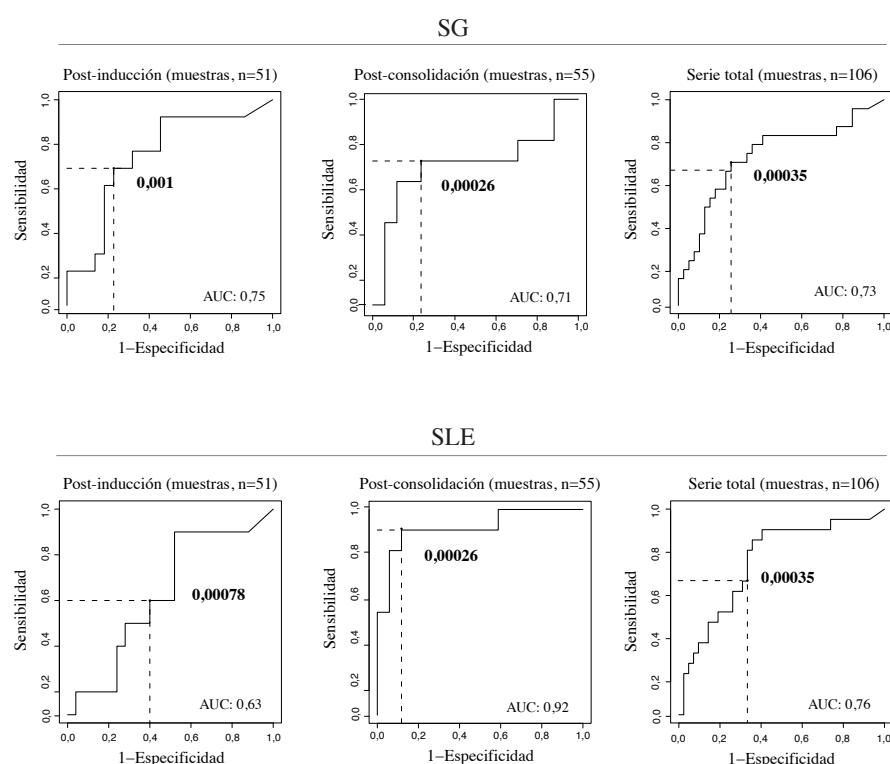


Figura 45. Curvas ROC Para Determinar el Mejor Punto de Corte.

Las gráficas muestran la sensibilidad en el eje X enfrentado a la inversa de la especificidad en el eje Y. Las curvas ROC determinan el punto de corte óptimo que potencia la máxima sensibilidad y especificidad simultáneamente para todas las muestras evaluadas (n=106) en cada punto de evaluación tanto para supervivencia global (SG) como SLE (supervivencia libre de evento). El área bajo la curva (AUC) está anotado.

	Punto de corte		Sensibilidad	Especificidad	AUC
Post-inducción n=51	0,001	SG SLE	0,69 0,60	0,77 0,60	0,75 (0,6-0,9) 0,63 (0,4-0,8)
Post-consolidación n=55	0,00026	SG SLE	0,73 0,91	0,76 0,89	0,71 (0,5-0,9) 0,92 (0,8-1,0)
Serie total n=106	0,00035	SG SLE	0,71 0,67	0,72 0,67	0,73 (0,6-0,9) 0,76 (0,6-0,9)

Tabla 18. Puntos de Corte Usados Para la Clasificación de Pacientes Según Niveles de EMR.

Puntos de corte y criterios de evaluación para los mismos, establecidos en los distintos puntos de tratamiento. Se seleccionaron los valores con mayor sensibilidad y especificidad en la predicción tanto para SG como SLE.

Según el análisis de supervivencia los pacientes evaluados en post-inducción (n=35) que presentan EMR positiva (niveles de EMR > 0,001) se asocian a un mayor riesgo de muerte (33% vs. 78%; HR: 3,5; 95% IC: 1,1-10,7; p=0,019) y a un mayor riesgo de recaída (58% vs. 78%; HR: 2,18; 95% IC: 0,63-7,5; p=0,208); figura 46, A-B.

Centrándonos esta vez en los pacientes evaluados en post-consolidación (n=28), observamos que el grupo que presenta EMR positiva (en este caso, niveles de EMR > 0,00026) se relaciona también con un mayor riesgo de muerte (33% vs. 81%; HR: 6,0; 95% IC: 1,3-28,7; p < 0,001) y a un mayor riesgo de recaída (17% vs. 94%; HR: 19,6; 95% IC: 2,5-155,6; p < 0,001); figura 46, C-D.

Un valor predictivo que se mantiene si se adicionan los 35 casos en post-inducción y los 28 casos en post-consolidación. De manera que los pacientes que presentan EMR positiva (en este caso, niveles de EMR > 0,00035) se asocian a un mayor riesgo de muerte (37% vs. 81%; HR: 4,2; 95% IC: 1,6-10,7; p < 0,001) y a un mayor riesgo de recaída (48% vs. 81%; HR: 3,4; 95% IC: 1,4-8,5; p=0,005); figura 46, E-F.

El estudio comparado con las técnicas usadas en la práctica clínica, CMF y qPCR, donde se han valorando todas las muestras evaluadas revela que existe correlación positiva cuando comparamos los niveles de EMR cuantificados por NGS con los niveles de EMR cuantificados por CMF ($r=0,47$; p=0,005; datos disponibles para n=75), y cuando comparamos los niveles de EMR medidos por NGS con los niveles de EMR medidos por qPCR ($r=0,62$; p < 0,001; datos disponibles para n=80) incorporando todas las muestras evaluadas.

Sin embargo, cuando analizamos el poder predictivo tanto de CMF y qPCR, observamos que existen diferencias entre el grupo de pacientes que presentan EMR positiva vs. EMR negativa, aunque no son estadísticamente significativas ni para SG (p=0,193) ni para SLE (p=0,117), figura 47. Resultados similares obtuvimos para los datos relativos a qPCR (NPMI), ya que vemos que el grupo de pacientes EMR positiva tiene menor supervivencia que el grupo EMR negativa, sin alcanzar tampoco la significación estadística ni para SG (p=0,212) ni para SLE (p=0,086).

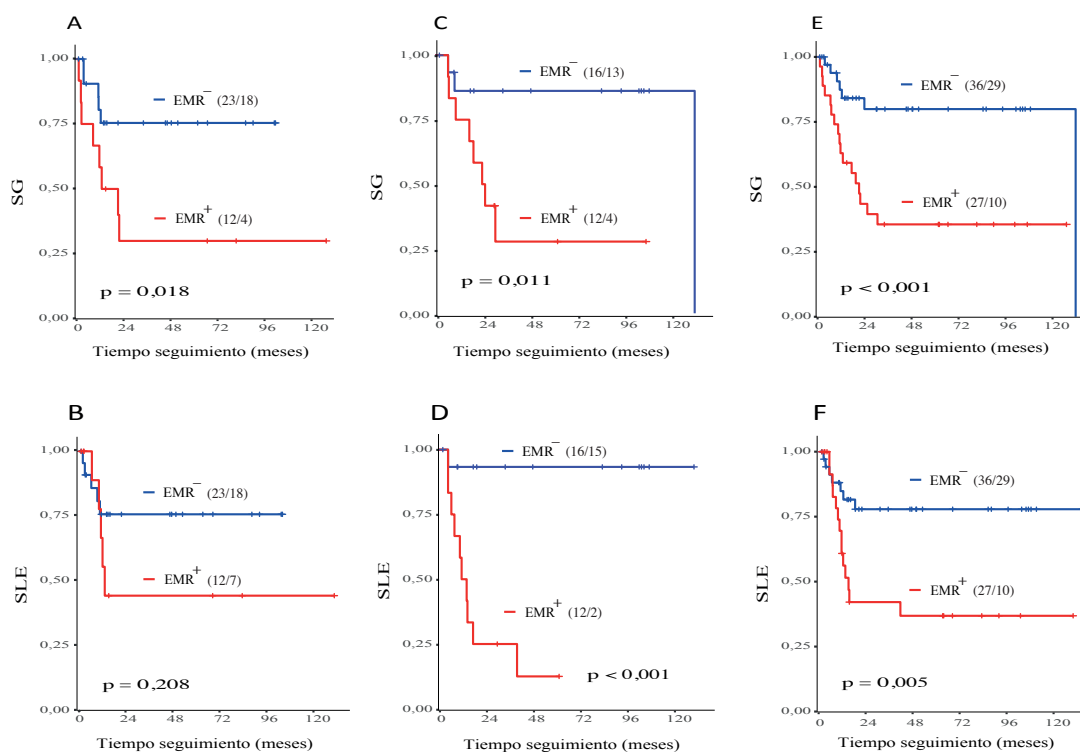


Figura 46. Análisis de SG y SLE en Pacientes Estratificados Según Niveles de EMR Detectados Mediante NGS. Análisis de SG relativo a los pacientes evaluados en post-inducción (A), en post-consolidación (C) o en ambos conjuntamente (E). Análisis de SLE relativo a los pacientes evaluados en post-inducción (B), en post-consolidación (D) o en ambos conjuntamente (F). El número de pacientes totales y el número de pacientes censurados está indicado. EMR⁻ indica pacientes con EMR negativa; EMR⁺ indica pacientes con EMR positiva.

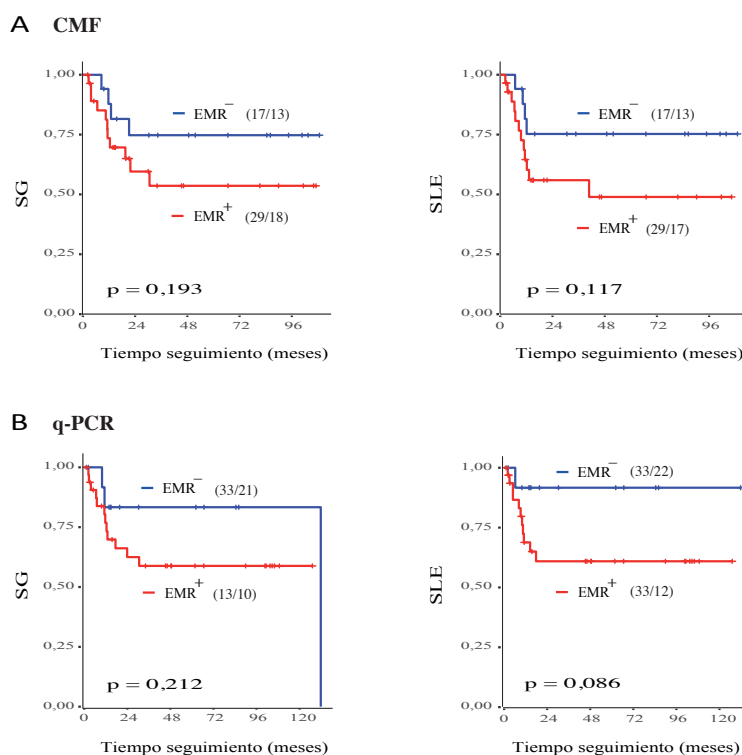


Figura 47. Análisis de la Probabilidad de SG y SLE en Pacientes con LMA Estratificados Según los Niveles de EMR Detectados Mediante CMF o qPCR.

Curvas de Kaplan-Meier relativo a SG y SLE respecto al análisis de los valores tomados por citometría de flujo paramédica (CMF; A), o relativo a SG y SLE respecto al análisis de los valores tomados por qPCR (B). El número de pacientes totales y pacientes censurados está indicado. EMR⁻ indica pacientes con EMR negativa; EMR⁺ indica pacientes con EMR positiva.

El análisis univariante mediante regresión de *Cox* (Tabla 19), revela que el riesgo de muerte está incrementado en pacientes con edad avanzada (HR: 1,04; 95% IC: 1,00-1,07; p=0,013), en pacientes con *FLT3*-ITD positivo al diagnóstico (HR: 3,45; 95% IC: 1,40-8,52; p=0,007) y en pacientes con EMR positiva testado mediante NGS (HR: 4,22; 95% IC: 1,66-10,71; p=0,002).

En cuanto al riesgo de recaída, este se ve incrementado en pacientes tan solo con la variable EMR positiva testado mediante NGS (HR: 3,41; 95% IC: 1,37-8,49; p=0,008).

	Nº pacientes (63)			
	Riesgo Muerte		Riesgo Recaída	
	HR (95%IC)	P valor	HR (95%IC)	P valor
Sexo (Hombre vs Mujer)	1,20 (0,50–2,83)	0,682	0,94 (0,37–2,44)	0,906
Edad (año)	1,04 (1,00–1,07)	0,013 *	1,03 (0,99–1,06)	0,69
Blastos dx (%)	1,00 (0,99–1,02)	0,667	1,01 (0,99–1,03)	0,532
Leucocitos dx	1,01 (0,99–1,01)	0,418	1,00 (0,99–1,01)	0,508
Favorable vs Adverso (Riesgo pronóstico ELN)	0,67 (0,08–5,43)	0,714	0,75 (0,09–6,00)	0,786
Intermedio vs Adverso (Riesgo pronóstico ELN)	1,03 (0,13–7,86)	0,976	1,02 (0,13–7,82)	0,988
<i>FLT3</i> -ITD Mutado	3,45 (1,40–8,52)	0,007 *	2,37 (0,86–6,51)	0,95
Alo-TPH vs Terapia	1,35 (0,40–4,57)	0,634	1,78 (0,41–7,78)	0,44
Alo-TPH vs Auto-TPH	0,29 (0,05–1,74)	0,176	0,64 (0,11–3,77)	0,629
EMR+ por CMF	2,10 (0,67–6,62)	0,203	2,40 (0,77–7,46)	0,130
EMR+ por qPCR	2,51 (0,56–11,2)	0,228	5,01 (0,64–38,8)	0,123
EMR+ por NGS	4,22 (1,66–10,7)	0,002 **	3,41 (1,37–8,48)	0,008 **

Tabla 19. Análisis Univariante en EMR.

HR= hazard ratio; dx= diagnóstico; EMR+= Enfermedad mínima residual positiva; CMF = citometría de flujo; Alo-TPH= trasplante hematopoyético alogénico; Auto-TPH= trasplante hematopoyético autólogo.

El análisis multivariable (tabla 20), revela que el riesgo de muerte incrementa nuevamente en pacientes con edad avanzada (HR: 1,05; 95% IC: 1,02-1,09; p=0,004), en pacientes con *FLT3*-ITD positivo al diagnóstico (HR: 8,87; 95% IC: 2,54-30,95; p=0,001) y en pacientes que presentan EMR positivo testado mediante NGS (HR: 4,54; 95% IC: 1,58-13,03; p=0,005). En cuanto al riesgo de recaída, este se ve incrementado en pacientes *FLT3*-ITD positivo al diagnóstico (HR: 4,18; 95% IC: 1,11-15,69; p=0,034) y en pacientes EMR positivo testado mediante NGS (HR: 3,76; 95% IC: 1,34-10,54; p=0,012).

	N° pacientes (63)			
	Riesgo Muerte		Riesgo Recaída	
	HR (95% IC)	P valor	HR (95% IC)	P valor
Sexo (Hombre vs Mujer)	0,84 (0,33–2,17)	0,720	1,25 (0,44–3,52)	0,671
Edad (año)	1,05 (1,02–1,09)	0,004 *	1,03 (0,99–1,07)	0,061
Leucocitos dx ($\times 10^9/L$)	1,01 (0,99–1,03)	0,219	1,07 (0,99–1,02)	0,481
Favorable vs Adverso (Riesgo pronóstico ELN)	13,75 (0,84–226,1)	0,067	7,09 (0,37–134,15)	0,192
Intermedio vs Adverso (Riesgo pronóstico ELN)	11,22 (0,82–154,2)	0,071	5,86 (0,39–86,84)	0,203
FLT3-ITD Mutado	8,87 (2,54–30,95)	0,001 **	4,18 (1,11–15,69)	0,034
EMR+ por NGS	4,54 (1,58–13,03)	0,005 **	3,76 (1,34–10,54)	0,012 *

Tabla 20. Análisis Multivariante en EMR.

HR= hazard ratio; dx= diagnóstico; EMR+= Enfermedad mínima residual positiva; CMF = citometría de flujo.

4.4. ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO

4.4.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE

Se analizaron exclusivamente muestras de MO en el momento del diagnóstico, y siempre antes de iniciar el tratamiento, de 74 pacientes con LMA no M3. El tiempo de seguimiento de esta serie fue de 70 meses. Los principales datos clínicos de la cohorte se representan en la tabla 21.

Nº pacientes (74)		
Sexo	Hombre	44 (60%)
	Mujer	30 (40%)
Edad al diagnóstico	Años, mediana (rango)	58 (19-91)
Blastos al diagnóstico	%, mediana (rango)	67 (20-99)
Leucocitos al diagnóstico	10 ⁹ /L, mediana (rango)	20,2 (1 -241,6)
Tipo LMA	De novo	62 (84%)
	Secundaria a SMD	8 (11%)
	t-LMA	4 (5%)
Cariotipo	Normal	35 (53%)
	Alterado	39 (47%)
Riesgo citogenético	Favorable	11 (15%)
	Intermediario	47 (63%)
	Adverso	16 (22%)
Transplante hematopoyético	Autólogo	15 (20%)
	Alogénico	15 (20%)
	No realizado	44 (60%)
Casos de recaída		24 (32%)
Tiempo hasta 1ª recaída	Meses, mediana (rango)	10 (0,4-69,9)
Casos de muerte		46 (62%)
Tiempo de seguimiento	Meses, mediana (rango)	12,4 (0,4-69,9)
Tipo de tto inducción	Esquema 3+7	57 (77%)
	Esquema FLUGA	17 (23%)
Respuesta al tto de inducción	RC	42 (57%)
	Rp	14 (19%)
	Resistencia	7 (9%)
	Muerte	11 (15%)
Tiempo hasta 1ª RC	Días, mediana (rango)	36 (19-87)

Tabla 21. Descripción Clínica de los Pacientes Incluidos en el Estudio Farmacológico.

La mayoría de los pacientes (n=57) siguieron tratamiento según esquema 3+7, el resto (n=17) recibieron esquema Fluga. SMD, indica Síndrome Mielodisplásico; t-LMA, LMA secundaria a tratamiento quimioterápico; tto, tratamiento; RC, Remisión completa; Rp, Remisión Parcial.

4.4.2. ENSAYOS EN MONOTERAPIA

4.4.2.1. RESPUESTA FARMACOLÓGICA

La representación gráfica de las curvas dosis-respuesta permite comparar los perfiles farmacológicos de los pacientes testados en cada uno de los ensayos. Cuanto menor es el valor de la EC₅₀, y en consecuencia menor es el valor de la AUC, el fármaco es más activo y por lo tanto la muestra testada tiene mayor sensibilidad asociada. Valorando la EC₅₀ y la AUC mediana de todas las muestras ensayadas en cada uno de los fármaco podemos analizar la actividad y el efecto de los mismos, figura 48 y Anexo 7.

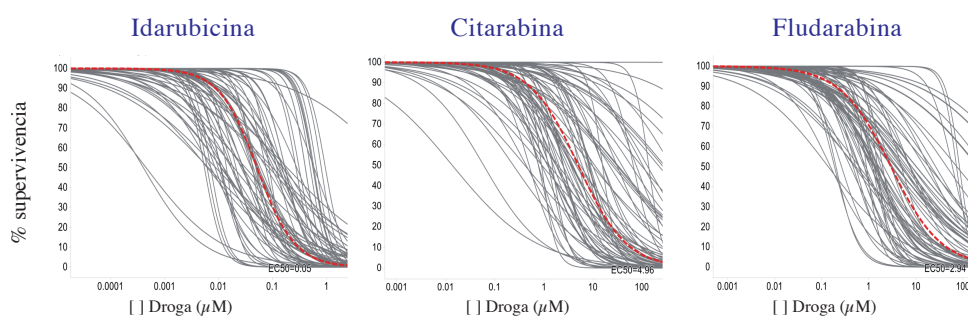


Figura 48. Curvas Dosis Respuesta de los Principales Fármacos Incluidos en Protocolos Clínicos.

Representación de la actividad de idarubicina (n=74), citarabina (n=74) y fludarabina (n=73) según curva dosis-respuesta. En el eje Y se representa el porcentaje de supervivencia de las células (células en depleción con presencia del fármaco vs ausencia de fármaco). El eje X representa el rango de concentraciones incluidas en el ensayo. Cada línea gris representa la respuesta de un paciente, la línea roja la mediana de toda la cohorte estudiada.

Si agrupamos los resultados de los fármacos según su mecanismo de acción (se expresa la mediana de los valores de AUC_{norm} y EC_{50}):

- **Actividad hipometilante:** dentro de este grupo el fármaco con mayor respuesta fue azacitidina ($AUC_{norm}= 24,92$; $EC_{50}=8,13$; n=28), seguido de decitabina ($AUC_{norm}= 50,58$; $EC_{50}=4693$; n=23).
- **Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos:** el fármaco con mayor respuesta de este grupo, e incluso del resto de grupos, fue **clofarabina** ($AUC_{norm}=14,85$; $EC_{50}=0,89$; n=54), seguido de citarabina ($AUC_{norm}=20,38$; $EC_{50}=4,96$; n=74), seguido de 6-tioguanina ($AUC_{norm}= 27,28$; $EC_{50}=119,5$; n=24), y por último el fármaco que presenta menor respuesta fue fludarabina ($AUC_{norm}=28,34$; $EC_{50}=2,94$; n=73),
- **Inhibidores de la enzima topoisomerasa:** dentro de este grupo el fármaco con mayor respuesta fue daunorubicina ($AUC_{norm}=31,82$; $EC_{50}=0,30$; n=48), seguido de etopósido ($AUC_{norm}=34,14$; $EC_{50}=9,77$; n=42), seguido de idarubicina ($AUC_{norm}=38,92$; $EC_{50}=0,05$; n=74), seguido de mitoxantrona ($AUC_{norm}=41,13$; $EC_{50}=0,32$; n=49) y por último amsacrina ($AUC_{norm}= 44,067$; $EC_{50}=0,81$; n=29).
- **Inmunomodulador:** el único fármaco testado en este grupo fue lenamidomida ($AUC_{norm}= 15,95$; $EC_{50}=177,16$; n=15).
- **Actividad alquilante:** dentro de este grupo el fármaco con mayor respuesta fue busulfán ($AUC_{norm}=16,32$; $EC_{50}=524,82$; n=15), seguido de melfalán ($AUC_{norm}=55,76$; $EC_{50}=11,03$; n=15) y seguido de **mafosfamida** ($AUC_{norm}=52,49$; $EC_{50}=43,65$; n=15), siendo este último es fármaco menos sensible de toda la serie.
- **Inhibidores de la enzima HDAC:** dentro de este grupo se encuentra panobinostat ($AUC_{norm}= 32,97$; $EC_{50}=0,03$; n=37).
- **Inhibidores de las enzimas tirosin kinasas:** cuyo único fármaco testado fue sorafenib ($AUC_{norm}= 4,73$; $EC_{50}=73,3$; n=14) .
- **Inhibidores de la enzima PLK1:** dentro del cual se ensayó volarsertib ($AUC_{norm}= 26,93$; $EC_{50}=5,90$; n=9).

Se ha observado una alta variabilidad en la respuesta a drogas tanto si se analiza a nivel individual de cada muestra frente a cada uno de los fármacos testados, como si se analiza a nivel de cada fármaco frente a las muestras testadas. No obstante, a pesar de esta alta variabilidad se observa un grupo de pacientes que muestran un patrón de sensibilidad a múltiples drogas, y en contraposición otro grupo de pacientes que muestran un patrón de resistencia a múltiples drogas, figura 49.

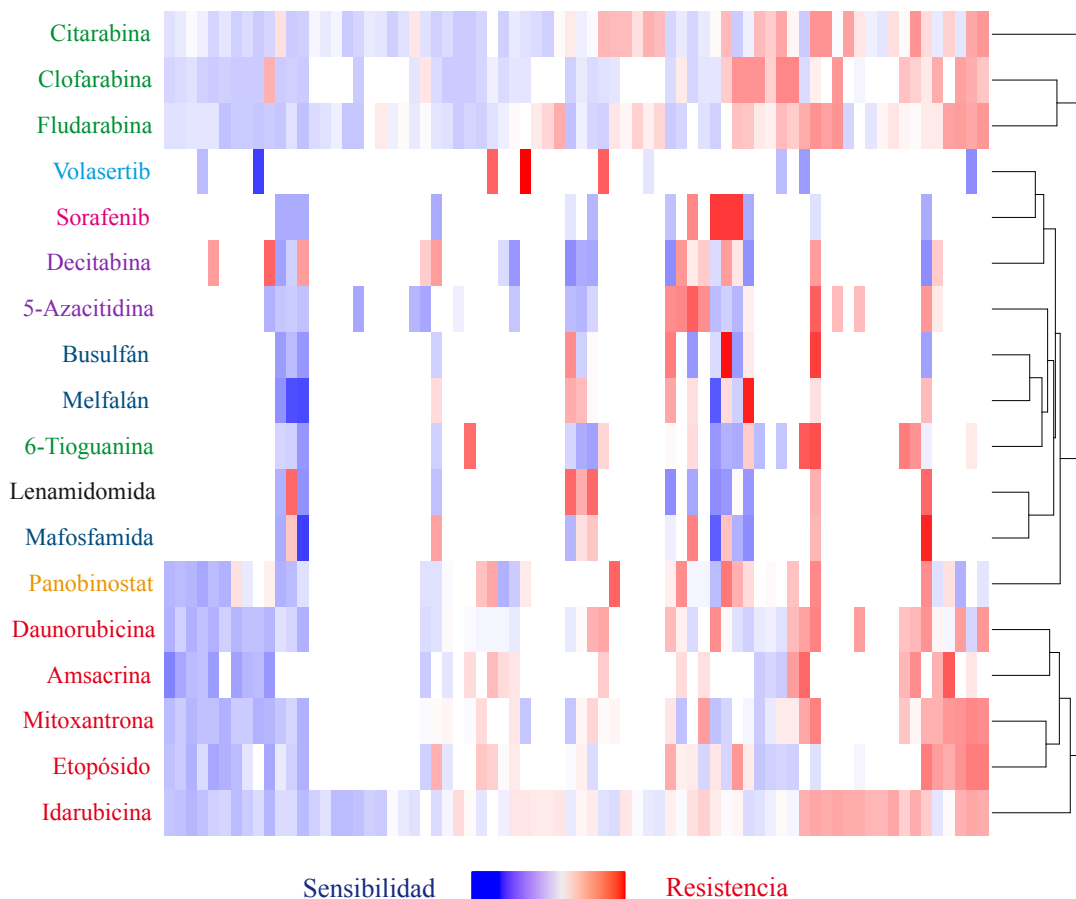


Figura 49. Mapa de Sensibilidad al Test Farmacológico.

Se representa la sensibilidad de cada paciente (columnas) y todas los ensayos testados (filas). La respuesta al fármaco se representa normalizada de 0 a 100 en una escala de color. Mayor intensidad de azul representa mayor sensibilidad al fármaco testado mientras que mayor intensidad de rojo representa menor sensibilidad o mayor resistencia.

Incluso, se observa correlación con significación estadística entre la respuesta a citarabina y la respuesta a clofarabina ($p=0,001$), la respuesta a citarabina y a fludarabina ($p=0,003$), así como correlación entre la respuesta a clofarabina y a fludarabina ($p\leq 0,001$).

Además se observa una alta correlación entre varios grupos de fármacos, como el citado triplete citarabina, clofarabina y fludarabina. También se da correlación entre otras parejas de fármacos en , ver tabla 22.

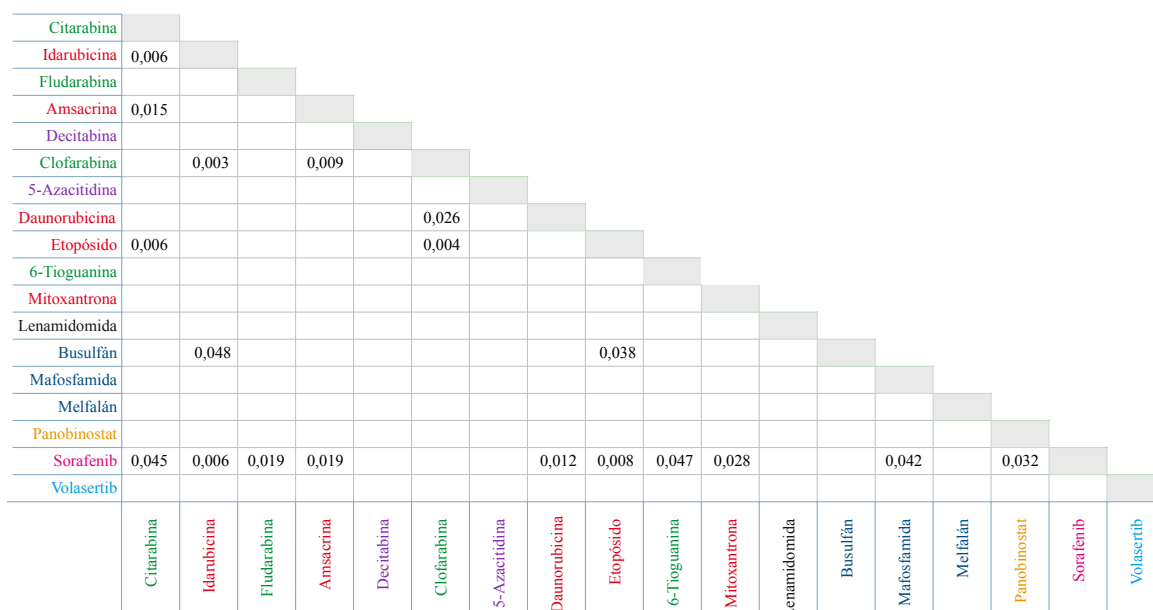


Tabla 22. Correlación Entre Fármacos Según su Actividad Farmacológica.

P valores de correlación entre la respuesta de dos fármaco, categorizados como respondedores o sensibles (percentil 20) y como no respondedores o resistentes (percentil 80) a los correspondientes fármacos. El grupo de pacientes que se hallan del percentil 20 al percentil 80 se consideran como muestras sin respuesta o respuesta neutra.

4.4.2.2. IMPACTO DEL PERFIL MUTACIONAL EN LA FARMACODINÁMICA

El análisis del test farmacológico ha revelado diferencias significativas en la respuesta *ex vivo* a fármacos entre grupos poblacionales categorizados según la presencia o ausencia de variantes alélicas en los distintos genes estudiados. Los pacientes con AUC normalizada (AUC_{norm}) < 20 se consideran buenos respondedores al fármaco. Los pacientes con AUC normalizada (AUC_{norm}) > 20 se consideran malos respondedores al fármaco.

De esta manera se han observado diferencias significativas entre los pacientes mutados en el gen *NPM1*, ya que muestran mayor sensibilidad a mitoxantrona ($p=0,029$) y a amsacrina ($p=0,031$) que los pacientes no mutados en *NPM1*, figura 50. Los pacientes con variantes detectadas en genes de la vía de splicing, en concreto en el gen *U2AF1*, muestran menor sensibilidad tanto a amsacrina ($p=0,032$) como a 6-tioguanina ($p=0,047$) que los pacientes no mutados en *U2AF1*, figura 51. Los pacientes con variantes detectadas en genes supresores de tumores, en concreto *TP53*, muestran menor sensibilidad tanto a fludarabina ($p=0,044$) como a mitoxantrona ($p=0,045$) que los pacientes no mutados en *TP53*, figura 52.

Respecto a la vía de señalización de citocinas, los pacientes con variantes detectadas en *FLT3* tipo ITD, muestran mayor sensibilidad tanto a panobinostat ($p=0,013$) y a daunorubicina ($p=0,007$) que los pacientes no mutados en *FLT3-ITD*, figura 54. Igualmente se observa mayor sensibilidad si presentan variantes en *FLT3* tipo SNV a los fármacos 6-tioguanina ($p=0,044$) y azacitidina ($p=0,012$), figura 53.

Mientras que los pacientes con mutaciones en *EPOR* muestran menor sensibilidad a citarabina que el grupo de pacientes que sin dicha mutación ($p=0,043$), figura 53.

Los pacientes con variantes detectadas en genes de la vía de regulación epigenética, en concreto en el gen *KMT2A*, muestran mayor resistencia tanto a idarubicina ($p=0,001$) como a fludarabina ($p=0,044$), figura 54. Los pacientes con variantes detectadas en gen *KRAS* también muestran mayor resistencia a sorafenib ($p=0,015$) y a mafosfamida ($p=0,021$), figura 55.

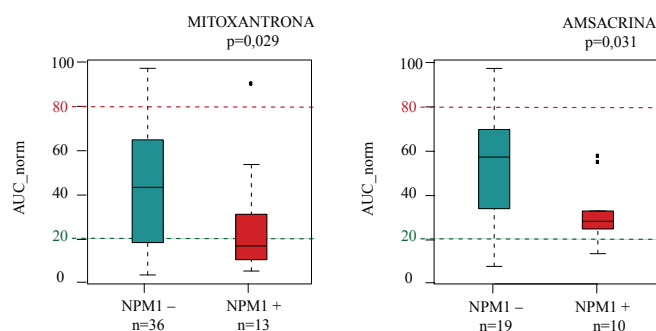


Figura 50. Impacto de Mutaciones en *NPM1* en la Respuesta Farmacológica.

Los pacientes mutados en *NPM1* (rojo) presentan mayor sensibilidad a mitoxantrona (izquierda) con una AUC_{norm} mediana de 42,58 vs. 14,29 ($p=0,029$; $n= 49$) y a amsacrina (derecha) con una AUC_{norm} mediana de 57,20 vs. 26,22 ($p=0,031$; $n=29$) respecto a los pacientes no mutados en *NPM1* (verde).

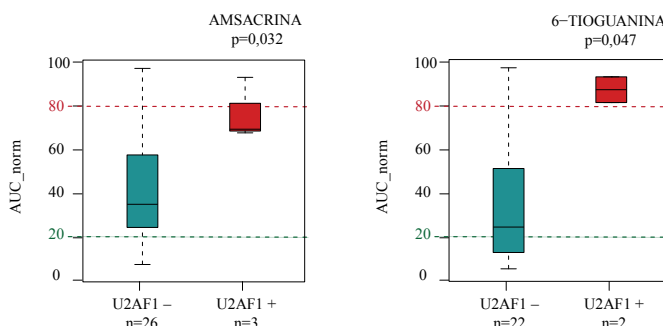


Figura 51. Impacto de Mutaciones en *U2AF1* en la Respuesta Farmacológica.

Los pacientes mutados en *U2AF1* (rojo) presentan menor sensibilidad a amsacrina (izquierda) con una AUC_{norm} mediana de 33,77 vs. 70,33 ($p=0,032$; $n= 29$) y a 6-tioguanina (derecha) con una AUC_{norm} mediana de 22,43 vs. 89,22 ($p=0,047$; $n=27$) respecto a los pacientes no mutados en *U2AF1* (verde).

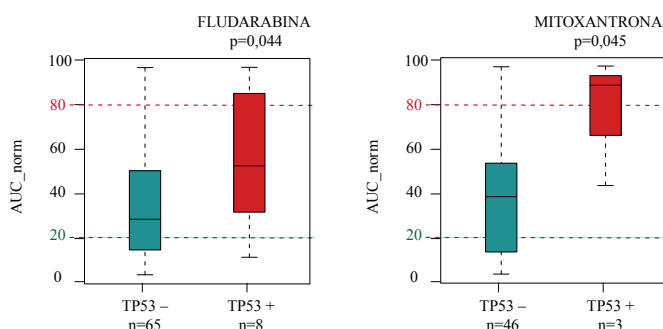


Figura 52. Impacto de Mutaciones en *TP53* en la Respuesta Farmacológica.

Los pacientes mutados en *TP53* (rojo) presentan menor sensibilidad a fludarabina (izquierda) con una AUC_{norm} mediana de 26,97 vs. 52,36; ($p=0,044$; $n= 73$) y a mitoxantrona (derecha) con una AUC_{norm} mediana de 37,43 vs. 90,83 ($p=0,045$; $n=49$) respecto a los pacientes no mutados en *TP53* (verde).

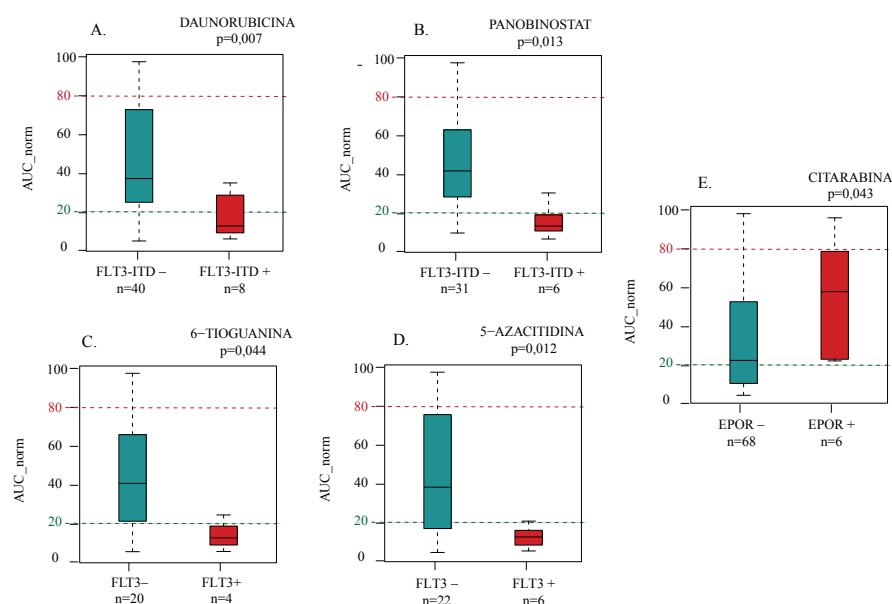


Figura 53. Impacto de Mutaciones en Genes de Señalización de Citocinas en la Respuesta Farmacológica. Los pacientes mutados (rojo) en *FLT3-ITD* presentan mayor sensibilidad a daunorubicina (A) con una AUC_{norm} mediana de 35,88 vs. 9,85 ($p=0,007$; $n= 48$) y a panobinostat (B) con una AUC_{norm} mediana de 40,66 vs. 10,44 ($p=0,013$; $n=37$) respecto a los pacientes no mutados (verde) en *FLT3-ITD*. Los pacientes mutados en *FLT3-SNV* presentan mayor sensibilidad a 6-tioguanina (C) con una AUC_{norm} mediana de 39,6 vs. 9,69 ($p=0,044$; $n= 24$) y a 5-azacitidina (D) con AUC_{norm} mediana de 36,88 vs. 9,57 ($p=0,012$; $n=28$) respecto a los pacientes no mutados en *FLT3-SNV*. Los pacientes mutados en *EPOR* presentan menor sensibilidad a citarabina (E) con una AUC_{norm} mediana de 19,48 vs. 57,20 ($p=0,043$; $n= 74$) respecto a los pacientes no mutados en *EPOR*.

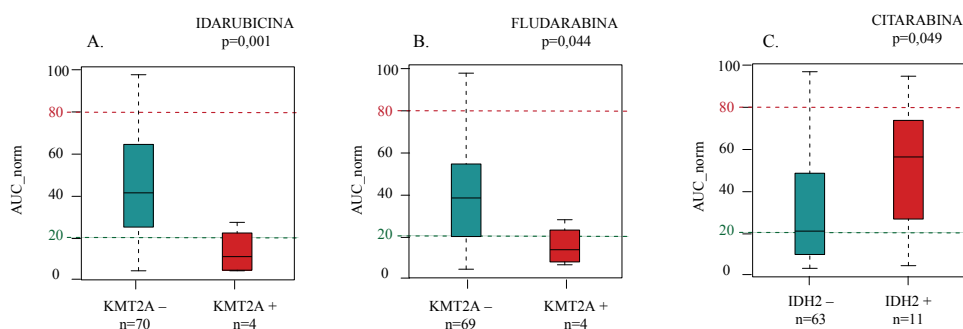


Figura 54. Impacto de Mutaciones en Genes de Regulación Epigenética en la Respuesta Farmacológica. Los pacientes mutados (rojo) en *KMT2A* presentan mayor sensibilidad a idarubicina (A) con una AUC_{norm} mediana de 40,12 vs. 7,78 ($p=0,001$; $n= 74$) y a fludarabina (B) con una AUC_{norm} mediana de 38,45 vs. 12,16 ($p=0,044$; $n=73$) respecto a los pacientes no mutados (verde) en *KMT2A*. Los pacientes mutados en *IDH2* presentan menor sensibilidad a citarabina (C) con AUC_{norm} mediana de 19,19 vs. 56,80 ($p=0,049$; $n=74$) respecto a los pacientes no mutados en *IDH2*.

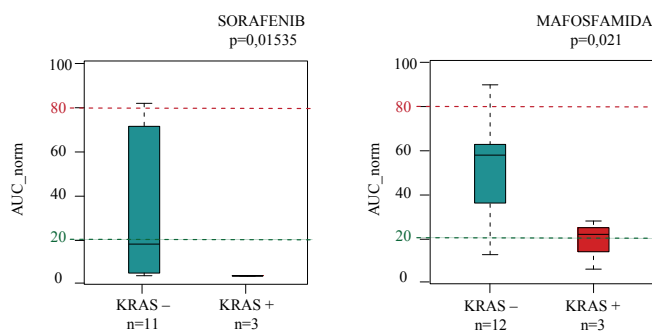


Figura 55. Impacto de Mutaciones en KRAS en la Respuesta Farmacológica. Los pacientes mutados en *KRAS* (rojo) tienen mayor sensibilidad a sorafenib (izquierda) con una AUC_{norm} mediana de 15,45 vs. 0,06 ($p=0,015$; $n= 14$) y a mafosfamida (derecha) con una AUC_{norm} mediana de 58,21 vs. 19,90 ($p=0,021$; $n=15$) respecto a los pacientes no mutados en *KRAS* (verde).

4.4.3. ENSAYOS EX VIVO CON TERAPIA COMBINADA

Al analizar la respuesta de los fármacos en ensayos con combinación por pares de fármacos se observaron también una alta diversidad de respuesta en los distintos pacientes y los distintas combinaciones testadas, figura 56. En este caso se clasificaron los pacientes en función del índice de combinación en sinergia alta, sinergia, aditividad, y antagonismo.

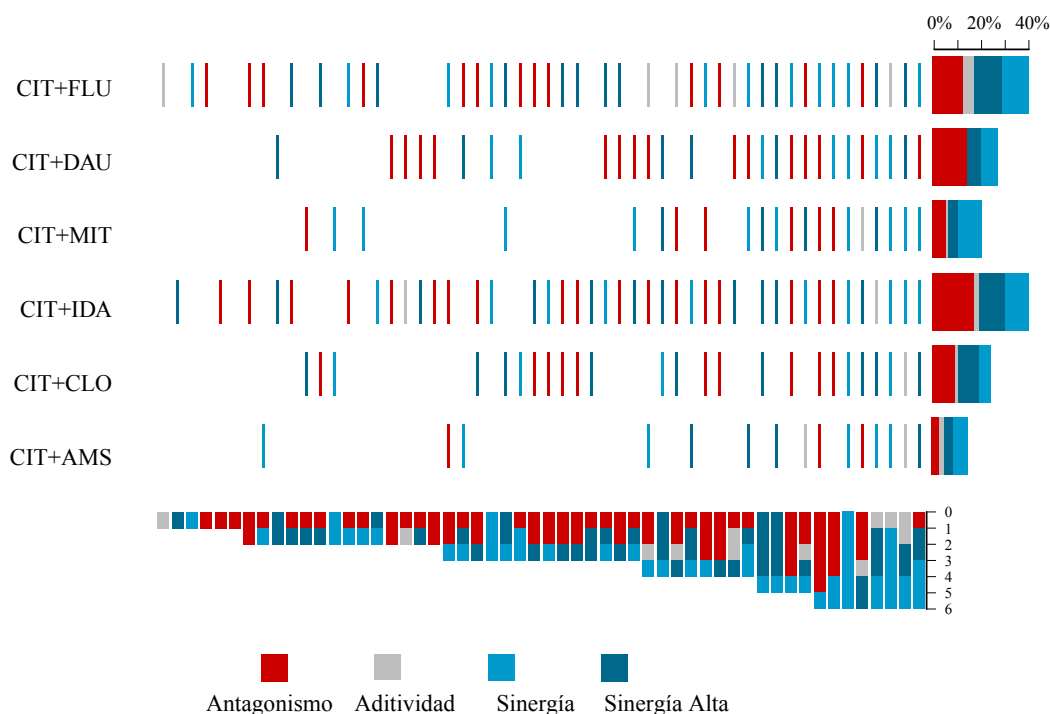


Figura 56. Mapa de Sensibilidad *Ex Vivo* a Drogas en Terapia Combinada.
 CIT=Citarabina, FLU=Fludarabina, DAU=Daunorubicina, MIT=Mitoxantrona, IDA=Idarubicina, CLO=clofarabina, AMS=Amsacrina.
 Categorización según el valor del índice de combinación (IC) entre los pares de drogas testadas, sinergia alta indica pacientes con IC<0,5; sinergia indica IC=0,5-0,9; aditividad indica IC=0,9-1,1; y antagonismo indica valores IC>1,1.

Se observa un alto número de pacientes con respuesta antagónica a tratamientos convencionales tales como 3+7 (Cit+Ida) donde 18 de los 41 pacientes la combinación de los mismos adquiere respuesta antagonista respecto a los 21 pacientes que muestran sinergia. O del esquema Fluga (Cit+Flu) donde 13 de los 41 testados presentan respuesta antagónica ante esta combinación respecto a los 23 que muestran sinergia.

Si analizamos la respuesta en función del perfil mutacional observamos que en los pacientes con mutaciones en el gen *NRAS* o *KRAS* la combinación de citarabina y clofarabina tiene un efecto antagónico mientras que en los pacientes sin alteraciones en la vía *RAS* el efecto es sinérgico ($p=0,008$). De la misma manera si analizamos los pacientes con mutaciones en el gen *DNMT3A* la combinación de citarabina y amsacrina tiene un efecto antagónico mientras que en los pacientes sin alteraciones en *DNMT3A* el efecto es sinérgico ($p=0,019$), ver figura 57.

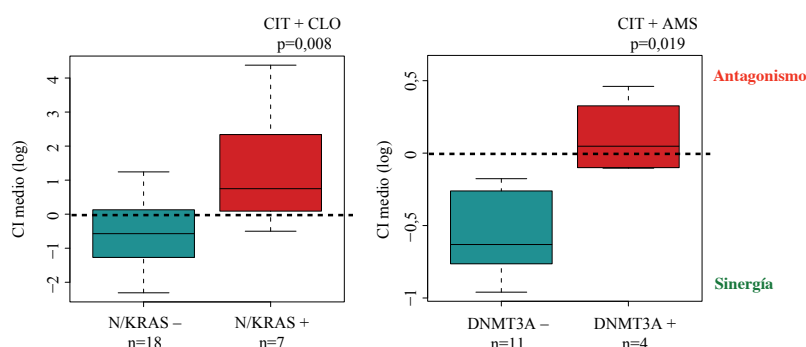


Figura 57. Impacto del Perfil Mutacional en la Respuesta Farmacológica en Ensayos de Terapia Combinada.

La combinación de CIT + CLO muestra efecto antagónico en pacientes mutados en N/KRAS (rojo), y efecto sinérgico en pacientes no mutados en N/RAS (verde). La combinación de CIT + AMS muestra efecto antagónico en pacientes mutados en DNMT3A (rojo), y efecto sinérgico en pacientes no mutados en DNMT3A (verde). Se representa la mediana del índice de combinación (CI) en escala logarítmica. CIT= citarabina; CLO= clofarabina; AMS= amsacrina.

4.4.4. CORRELACIÓN DE RESPUESTA EX VIVO Y RESPUESTA CLÍNICA

La mediana de SG fue de 12,4 meses con 46 eventos en los 74 pacientes evaluados. Y la mediana de SLE fue de 10 meses con 24 eventos en los 74 pacientes evaluados.

La SG fue significativamente menor en pacientes clasificados como malos respondedores o resistentes ($AUC_{norm} > 80$) que en pacientes clasificados como buenos respondedores o sensibles ($AUC_{norm} < 20$), en el ensayo testado con fludarabina ($p=0,027$) y amsacrina ($p=0,002$), figura 58. Los pacientes no clasificados en ninguno de los grupos son clasificados como pacientes con respuesta neutra.

Respecto al ensayo con citarabina y al ensayo con idarubicina, se observa que en ambos ensayos los pacientes clasificados como sensibles muestran mayor SG ($n=74$, $p=0,160$) y mayor SLE ($n=74$; $p=0,184$) que los pacientes clasificados como resistentes, aunque esta diferencia entre grupos no es estadísticamente significativa, figura 58.

De la misma manera usando un punto de corte que optimiza la especificidad y sensibilidad de la serie que discrimina buenos respondedores o sensibles (pacientes con niveles de AUC inferiores al umbral) de pacientes malos respondedores o resistentes (pacientes con niveles de AUC superiores del umbral) al fármaco testado, observamos que para los resultados del ensayo con citarabina los pacientes resistentes presentan menor SG tanto para la serie global ($n=74$; $p=0,058$; figura 59) como para la serie acotada a los pacientes que recibieron esquema 3+7 como tratamiento de inducción ($n=57$; $p=0,023$).

Además existe alta correlación (67%) entre la respuesta farmacológica *ex vivo* y la respuesta hematológica clínica. Debido a que 28/38 de los pacientes categorizados como sensibles a citarabina *ex vivo* alcanzan RC y el 22/36 de los pacientes categorizados como resistentes a citarabina *ex vivo* muestran resistencia clínica a este fármaco.

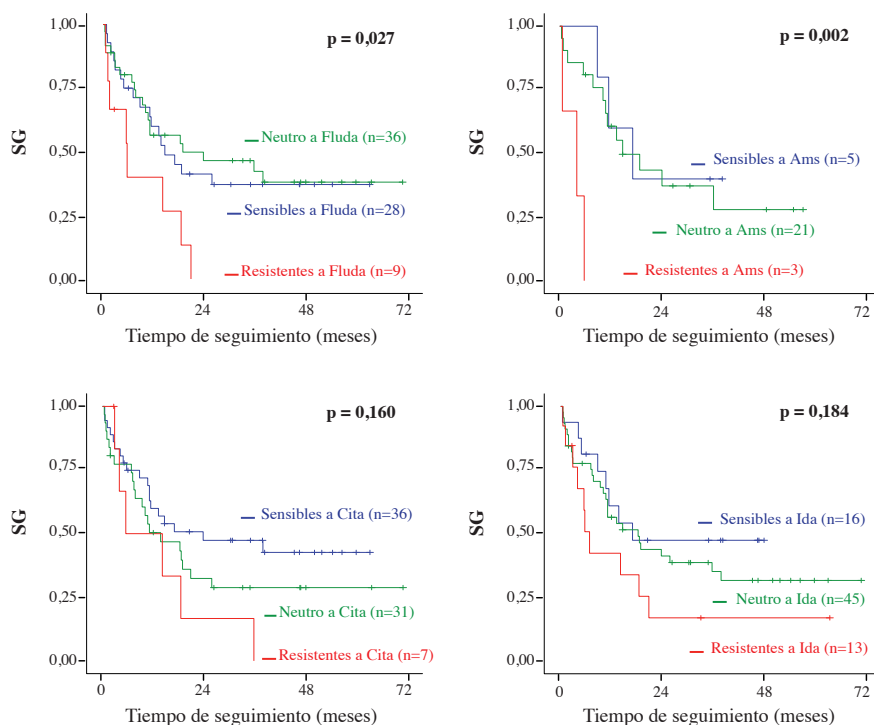


Figura 58. Curvas KM de SG en Pacientes Categorizados en Sensibles, Neutros o Resistentes . Probabilidad de supervivencia global (SG) según grupos categorizados en función de la respuesta al test farmacológico, en sensibles (AUCnorm<20), neutros (AUCnorm= 20-80) y resistentes (AUCnorm>80). Para los ensayos en fludarabina (Fluda, n= 73), amsacrina (Ams, n=29), citarabina (Cita, n= 74) e idarubicina (Ida, n= 74).

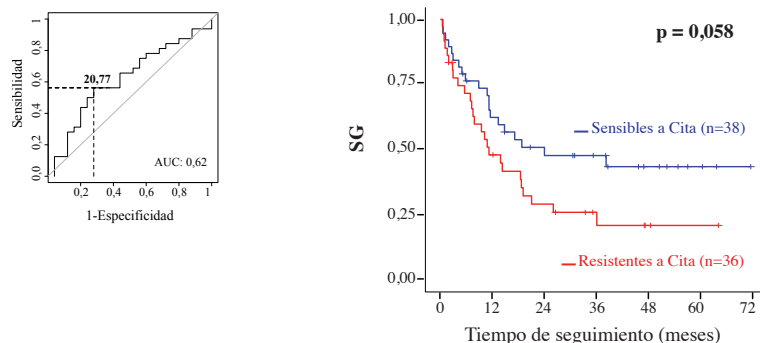


Figura 59. Curva KM de SG en Pacientes Categorizados en Sensibles y Resistentes a Citarabina. Probabilidad de supervivencia global (SG) según grupos categorizados en función de la respuesta al test farmacológico con citarabina (cita, n=74) mediante un umbral establecido por curvas ROC. Discrimina pacientes sensibles (AUCnorm<20,77) y pacientes resistentes (AUCnorm>20,77).

En el ensayo con idarubicina los pacientes resistentes también presentan menor SG tanto para la serie global (n=74; p=0,089) como para la serie acotada a los pacientes que recibieron esquema 3+7 como tratamiento de inducción (n=57; p=0,573).

Teniendo en cuenta que el test farmacológico manifiesta diferentes niveles de sensibilidad ante los distintos fármacos testados para un mismo paciente, es interesante como el grupo de pacientes que muestra un patrón de resistencia múltiple tienen menor SG que el resto de pacientes, con una mediana de 6,7 meses vs. 8,3 meses (p=0,015), figura 60.

El test multivariable confirma que la resistencia a múltiples fármacos es uno de los factores independientes de riesgo de muerte (HR:2,52; 95%IC: 1,01-6,29; $p=0,047$); junto con otros marcadores moleculares: *TP53* (HR: 12,22; 95%IC: 3,64-41,07 ; $p<0,001$), *TET2* (HR: 4,39; 95%IC: 1,2-15,75; $p=0,024$) y *KMT2A* (HR: 6,43; 95%IC: 1,18-35,2; $p=0,032$).

Seleccionando todos estos marcadores independientes de pronóstico adverso (resistencia múltiple, mutaciones en *TP53*, *TET2* y *KMT2A*), se ha validado un score que permite estratificar a los pacientes según su riesgo de menor a mayor en una escala de 0 a 2. La probabilidad de SG de los pacientes con mayor valor de score es menor que los pacientes con valores de score inferiores ($p<0,0001$), figura 61.

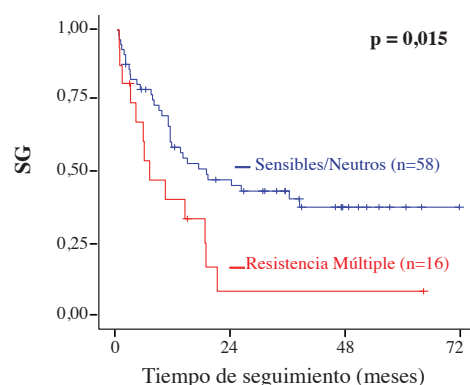


Figura 60. Curva KM de SG en Pacientes Categorizados Según Respuesta a Múltiples Fármacos.

Probabilidad de supervivencia global (SG) según grupos categorizados en función de la respuesta al test farmacológico de todos los ensayos testados ($n=18$). Discrimina pacientes con un patrón de resistencia a múltiples fármacos (resistencia mayor al 75% de los fármacos ensayos) frente a pacientes sensibles o neutros (resistencia menor al 75% de los fármacos ensayos).

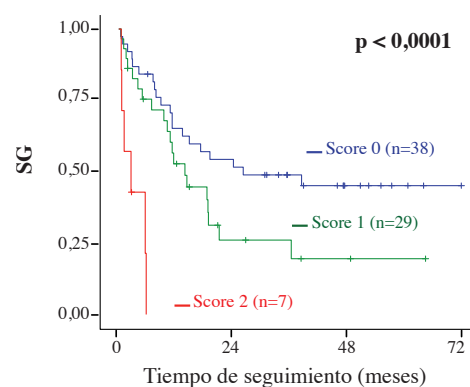


Figura 61. Curva KM de SG en Pacientes Categorizados en Según Score Farmacológico y Mutacional.

Probabilidad de supervivencia global (SG) según grupos categorizados en función de la respuesta al test farmacológico y al perfil mutacional presentado. Se puntúa positivamente y de manera equitativa a: presentar patrón de resistencia a múltiples fármacos, presentar mutaciones en el gen *TP53*, presentar mutaciones en el gen *KMT2A* Y presentar mutaciones en el gen *TET2*.

5. DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se recogen los resultados derivados del estudio de una cohorte de pacientes diagnosticados de LMA-no M3 en los distintos momentos de la evolución clínica de la enfermedad: diagnóstico del paciente (n=190 en el estudio mediante NGS, y n=74 en el estudio farmacológico ex-vivo), momento donde acontece fracaso terapéutico (n=23) y momentos durante el seguimiento y monitorización de la enfermedad mínima residual (n=63).

5.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO EN EL DIAGNÓSTICO DE LMA MEDIANTE NGS

La LMA es una patología con una alta variabilidad entre pacientes justificada en parte por la diversidad del perfil mutacional y los diversos mecanismos epigenéticos que pueden acontecerse.^(110, 111) El estudio citogenético ha sido el criterio convencional utilizado para la estratificación de los pacientes de LMA en los diversos grupos pronóstico antes de iniciar el tratamiento. Sin embargo, un alto porcentaje de los pacientes no presenta alteraciones citogenéticas, o estas no son detectables por técnicas convencionales. Lo cual dificulta la predicción de la evolución clínica y en consecuencia la elección adecuada del esquema terapéutico. E incluso, aunque el paciente sea clasificado en alguno de los grupos de riesgo pronóstico a veces la respuesta clínica esperada no se ajusta a la observada,⁽¹¹²⁾ lo que indica que la clasificación de los pacientes necesita ser optimizada.

En este trabajo se demuestra la utilidad del uso de la secuenciación masiva en la mejora de la caracterización genética de la LMA y su progresión clínica con el fin de evaluar el pronóstico de los pacientes de manera individualiza y precisa que permita ajustar el tratamiento a cada paciente, dando paso a la conocida medicina personalizada.

El uso de la tecnología de secuenciación masiva de ADN ha permitido optimizar la caracterización a nivel molecular de diversas patologías de origen genético; y su uso e interés en la implementación como técnica de rutina en laboratorios clínicos ha crecido exponencialmente en la última década debido a la capacidad que ofrece de evaluar simultáneamente múltiples regiones genómicas.⁽¹¹³⁾ La NGS genera mayor información genética de la enfermedad y lo hace con mayor eficiencia que la secuenciación por Sanger o que la detección de mutaciones específicas mediante PCR,⁽¹¹⁴⁾ estableciéndose como una técnica de fácil manejo y con un coste económico accesible.

Sin embargo, hoy en día el mayor reto asociado a esta tecnología no radica a nivel técnico de la misma ni tampoco en la detección de variantes alélicas, sino más bien en la interpretación y el posible impacto clínico de las mismas respecto a la supervivencia.⁽¹¹⁾

A pesar de ser un método con una alta capacidad de estandarización técnica,⁽¹¹⁵⁾ cada laboratorio debe canalizar los datos obtenidos para resaltar y simplificar la información generada de cada paciente. El empleo de categorías de variantes alélicas no solapantes, ya se ha utilizado en varios estudios^(57, 116) y las principales guías de estandarización respecto a la interpretación de variantes en cáncer detectadas mediante secuenciación ya incorporan criterios para la estratificación de las

mismas.⁽¹¹⁾ Las variantes más relevantes se localizan en regiones codificantes del genoma, principalmente de tipo somáticas y de diversa índole: inserción, delección, variación en el número de copias, reordenamientos cromosómicos y variantes de un solo nucleótido.^(117, 118)

Por ello en este trabajo se han desarrollado varios pipelines bio-informáticos concatenados y automatizados para el procesamiento de ficheros informáticos derivados de la NGS que seleccionan y priorizan secuencialmente variantes alélicas somáticas basándose en criterios técnicos establecidos por la comunidad científica, y en criterios clínico/biológicos siguiendo las últimas recomendaciones internacionales.^(6, 10) De esta manera se ha reducido el número de variantes a considerar de 3803 a 264, agrupadas de mayor a menor relevancia en 6 niveles: nivel 1 (n=137), nivel 2 (n=7), nivel 3 (n=46), nivel 4 (n=6), nivel 5 (n=23) y nivel 6 (n=45). Aunque se ha demostrado la importancia de la categorización de las variantes para el análisis del impacto en la clínica de los pacientes, en este trabajo se han considerado todas como un conjunto y atribuyendo el mismo valor a cada uno de los grupos con el fin de no sesgar información debido al reducido número de pacientes que conforman los grupos según genes mutados.

El genoma en pacientes con cáncer acumula entre 10^2 y 10^6 mutaciones puntuales de tipo somático, lo que representa 10^{-1} - 10^3 mutaciones/Mb.⁽¹¹⁹⁾ Además, las alteraciones genómicas se manifiestan en torno al 10% del genoma en pacientes oncológicos.⁽¹²⁰⁾ El primer genoma completo de un paciente con LMA fue publicado en 2008, y desde entonces muchos estudios se han llevado a cabo para la identificación de mutaciones somáticas recurrentes con relevancia biológica, pronóstica y terapéutica asociada a esta patología.⁽¹⁶⁾

Estudios del espectro genómico en LMA, tales como el liderado por *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) detectó una mediana de variantes por pacientes de 3,4⁽¹³⁾ y ha generado un catálogo de genes asociados a leucemia que ha ido en incremento gracias a la incorporación de resultados derivados de estudios posteriores. Recientemente, un estudio realizado en 1540 pacientes de LMA mediante secuenciación dirigida de 111 genes asociados a mutaciones *drivers* en cáncer, identifica una o más mutaciones en el 96% de los pacientes y dos o más mutaciones en el 86% de los pacientes, con una mediana de 5,2 variantes por paciente.⁽¹²¹⁾ En nuestro estudio detectamos mediante secuenciación dirigida de 32 genes asociados a patologías mieloides una mediana de 2 (0-15) variantes por paciente, donde el 86% (164/190) de los pacientes presentó al menos una variante y el 61% de los pacientes 2 o más variantes, un resultado que se ajusta en función del número de genes evaluados respecto a otros trabajos previos. Un estudio publicado en 2016 que incluye 664 pacientes con LMA en el que se analizaron 68 genes con implicación en patologías mieloides mediante secuenciación dirigida detectó una mediana de 4 variantes por paciente y al menos una mutación en el 97% de los pacientes.⁽¹⁴⁾ Y otro trabajo, también publicado en 2016 llevado a cabo en 271 pacientes de LMA donde se estudiaron mediante NGS 28 genes recurrentemente mutados en LMA detectó 2,7 mutaciones por paciente.⁽¹²²⁾

Nuestro análisis ha identificado 211 variantes de tipo *SNVs*. (80%) y 53 variantes de tipo *InDels* (20%). Agrupadas en alguna de las 7 vías funcionales establecidas: genes de regulación transcripcional (12,5%), genes de regulación epigenética (56%), genes de splicing (13%), genes de señalización de citoquinas y vía *JAK/STAT* (34%), genes de la vía RAS (28,5%), genes de factores de transcripción (11%) y genes supresores de tumores (19%).

Los genes mutados con mayor frecuencia poblacional reportada en la bibliografía se da en los genes *FLT3*, *NPM1* y *DNMT3A*, cada uno de los cuales se muestra con una frecuencia en torno al 20% o superior, seguidos de *NRAS*, *TET2*, *IDH2* y *RUNX1*, que se presentan en un 10-20% de los pacientes.^(121, 122) Datos que se reproducen en nuestra cohorte ya que la presencia de mutaciones en *NPM1* (detectado por qPCR) se da en el 28% de los pacientes, mutaciones en *DNMT3A* en el 26%, y mutaciones en *NRAS*, *TET2* o *IDH2* en el 21%, 19% y 14, respectivamente. Respecto a *FLT3*, en nuestra serie se ha detectado variantes tipo SNV mediante el panel de NGS en un 13% de los pacientes y variantes tipo ITD mediante análisis de fragmentos en un 16% de los pacientes, por lo que un 25% de los pacientes presenta alteraciones en este gen, liderando bajo esta circunstancia la lista de genes más recurrentes en nuestra cohorte.

La mediana de frecuencia alélica de las variantes (VAF) detectadas en los distintos genes podría indicar la implicación de las mutaciones en la enfermedad y el tiempo de aparición durante la evolución de los clones leucémicos. Nuestra serie muestra una mediana global de VAF en torno al 33%. Las mutaciones presentes en al menos 10 pacientes y con una VAF del 40-50% se localizaron en *DNMT3A*, *TET2*, *RUNX1*, *KMT2A* e *IDH1*. Mutaciones con 20-40% de VAF se localizaron en los genes *IDH2*, *TP53*, *KRAS*, y *EZH2*. Y mutaciones con VAF inferiores al 20% en los genes *NRAS*, *FLT3*-SNV, *KIT* y *EPOR*. Aunque las VAF detectadas en nuestra serie se ajustan a los datos publicados,⁽¹⁴⁾ no se ha valorado distinguir las bajo este criterio en el análisis de supervivencia puesto que tanto mutaciones clonales como sub-clonales podrían afectar de manera equivalente al pronóstico.⁽¹²³⁾

Tan solo tres marcadores moleculares, *FLT3*-ITD, *NPM1* y *CEBPA*, se han considerado para su estudio en el diagnóstico clínico según criterios establecidos por la ELN en 2010.⁽⁸⁾ No obstante el análisis de mutaciones en los genes *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53* también ha sido incorporado en la última revisión publicada por la misma organización en 2017.⁽⁹⁾ A pesar de los avances de los últimos años en la identificación de alteraciones moleculares y su utilidad como marcadores predictivos de evolución clínica en LMA sigue sin definirse de forma concluyente.

En nuestra serie observamos menor supervivencia en pacientes que presentan cariotipo con alteraciones, en pacientes con riesgo citogenético adverso, en pacientes con edad superior a 65 años, en LMA secundarias, en pacientes refractarios al tratamiento de inducción, en pacientes tratados con esquema FLUGA y en pacientes que recibieron trasplante como tratamiento de consolidación.

Respecto al perfil estrictamente molecular, los resultados del presente estudio establecen que la probabilidad de supervivencia global es inferior en el grupo de pacientes que portan mutaciones en los genes *EZH2*, *KMT2A*, *TP53* o *U2AF1* respecto al grupo de pacientes que no portan mutaciones en los respectivos genes. Además el test multivariable consolida estas variables como marcadores candidatos con de alto riesgo de muerte con valor independiente. De la misma manera, la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad es también inferior en el grupo de pacientes con mutaciones en los genes *SF3B1*, *EZH2* y en los genes supresores de tumores. Y nuevamente el test multivariable afirma que mutaciones en *EZH2* es el único marcador molecular con valor independiente de alto riesgo de recaída. El grupo supresor de tumores incluye los genes *VHL*, *PTEN* y *TP53*, por lo que cabría esperar que el poder estadístico fuera conferido por *TP53*. Sin embargo *TP53* no discrimina probabilidad de SLE de forma independiente ($p=0,22$) a diferencia de *VHL* ($p=0,027$; $n=4$) y *PTEN* ($p=0,024$; $n=3$), que lo hace con una frecuencia poblacional no representativa.

El número de mutaciones también es uno de los factores pronóstico adverso ya reportado en SMD y LMA.^(122, 123) En nuestro estudio este patrón se reproduce fielmente ya que al aumentar el número de mutaciones por paciente la probabilidad de supervivencia va disminuyendo.

La presencia de mutaciones en parejas concretas de genes de forma simultánea (co-existencia) tienen influencia en la supervivencia de los pacientes. Por ello es necesario conocer y valorar patrones de co-existencia y patrones de exclusividad de genes mutados. En nuestra cohorte, 53 pacientes debutan con *NPM1* mutado pero tan solo 4 lo presentan en exclusividad. Hemos observado que la presencia de *NPM1* se ve enriquecido en pacientes con cariotipo normal como justifican otros estudios.⁽²⁴⁾ Sin embargo en el 37% de los pacientes mutaciones en *NPM1* co-existe con otras alteraciones moleculares como *FLT3*-ITD, y con mutaciones en *DNMT3A*, *FLT3*-SNV o *TET2*; como también afirman otros autores.^(14, 16, 24, 122) A pesar de que los pacientes con *NPM1* mutado se correlacionan con alta tasa de RC tras el tratamiento de inducción, la presencia de mutaciones en este gen no discrimina patrones de supervivencia como han demostrado ya otras cohortes publicadas.^(122, 124) Sin embargo, cuando las mutaciones en *NPM1* se dan en ausencia de mutaciones en *FLT3*, en ausencia de mutaciones en *TET2*, o en ausencia de mutaciones en *TP53*, sí que observamos mayor supervivencia de estos grupos. Esta circunstancia apoya por un lado el valor pronóstico favorable de *NPM1* mutado y por otro lado el valor pronóstico adverso de *FLT3*, *TET2* y *TP53*, ambos observados en otras cohortes publicadas.^(14, 121) En el último caso, la exclusión de *TP53* también involucra a su vez la exclusión de pacientes con cariotipos complejos, ya que nuestra serie presentar cariotipos complejos se asocia a presencia de *TP53* mutado ($p=0,005$); y cuya correlación con pronóstico adverso ya está demostrada bibliográficamente.⁽¹²⁵⁾

DNMT3A es uno de los genes más recurrentemente mutado en LMA, entre 22%⁽³⁰⁾-35%⁽¹²⁶⁾ según la cohorte estudiada. Y ya es conocida la co-existencia de mutaciones en este gen con mutaciones

en *FLT3*, *N/KRAS* o *NPM1*.^(13, 121) Igualmente, en nuestra serie *DNMT3A* es uno de los genes más recurrentemente mutado (26%) y se asocia a pacientes clasificados dentro del grupo pronóstico intermedio así como a pacientes con cariotipo normal y muestra co-existencia con mutaciones en los genes *FLT3-ITD*, y como ya hemos mencionado antes co-existencia con mutaciones en *NPM1*. Además *DNMT3A* está ligado a peor supervivencia⁽³⁰⁾, que en nuestra cohorte se confirma en pacientes donde tanto *DNMT3A* como *IDH1* se co-expresan, apoyando la hipótesis de que ambos genes co-existen en LMA.⁽³⁰⁾ Y también se confirmó cuando mutaciones en *DNMT3A* ocurren en ausencia de mutaciones en *EPOR*, en ausencia de mutaciones en *FLT3-ITD*, en ausencia de mutaciones en *KMD6A* y en ausencia de mutaciones en *JAK2*. No obstante, y salvando que algunos estudios han demostrado que mutaciones en *DNMT3A* se asocia a pronóstico adverso, la mayoría de estudios reportan que carece de valor pronóstico independiente.^(30, 127, 128) Es interesante el estudio reportado donde se identificó *DNMT3A* y *RUNX1* como los marcadores moleculares con mayor valor pronóstico adverso,⁽¹⁴⁾ ya que en el presente trabajo se ha demostrado como adquiere significación para SLE tan solo cuando ambas mutaciones co-existen y no cuando se manifiestan independientemente.

No se hallaron diferencias en la supervivencia de los pacientes con *FLT3-ITD* probablemente justificado por la mayor representación de nuestra serie al riesgo pronóstico intermedio, y por las diferencias de pronóstico de otras mutaciones que se presenten simultáneamente.

Finalmente, los marcadores moleculares con valor pronóstico independiente adverso destacables en este trabajo son mutaciones en *TP53*, *EZH2*, *U2AF1* y/o *KMT2A*. De los cuales solo *EZH2* se manifiesta a su vez como marcador molecular con valor pronóstico independiente adverso de recaída. Mientras que la presencia de mutaciones en el gen *ZRSF2* se muestra como el único marcador molecular de menor riesgo de muerte.

5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO EN EL FRACASO TERAPÉUTICO DE LMA MEDIANTE NGS

La refractariedad primaria al tratamiento de inducción y la recaída después de alcanzar RC son las principales causas que implican fracaso terapéutico e impiden la cura en los pacientes con LMA. La SG de pacientes refractarios o en recaída es muy baja, estimada en no más del 10% a 3 años.^(20, 129) Ambas situaciones acontecen incluso en ausencia de marcadores indicadores de riesgo adverso, por lo que la identificación de los nuevos marcadores es crucial para predecir estos eventos incluso antes de comenzar el tratamiento.⁽¹³⁰⁾

La LMA es una enfermedad característicamente oligoclonal ya que en el inicio de la enfermedad el tumor presenta clones poblacionales de células tumorales con diversa identidad genética en mayor o menor representación dentro del mismo paciente. En la última década se ha avanzado mucho en

el conocimiento de la pureza del tumor y la carga de mutaciones clonales y sub-clonales; especialmente en el papel que ejercen los sub-clones en la arquitectura clonal.⁽¹³¹⁾ Estudios publicados sugieren que la arquitectura clonal no recae en un solo clon sino que en algunos casos más de un clon leucémico podría actuar como clon dominante.⁽¹³²⁾ O incluso, clones genéticamente distintos podrían segregarse, o combinarse aportando mayor diversidad tumoral.^(133, 134) Consecuentemente, el clon predominante en el diagnóstico no es idéntico al clon que se presenta en la recaída o en la refractariedad.⁽⁴⁹⁾

La hematopoyesis clonal implica presencia de células sanguíneas con una o más mutaciones somáticas, y aunque es cierto que la mayoría tienen un efecto neutral en individuos sanos, en ciertos casos podrían representar un antecedente de estado pre-leucémico.⁽²⁸⁾ Clones pre-leucémicos derivados de la hematopoyesis clonal pueden persistir en el tiempo debido a su resistencia a la terapia y expandirse en la remisión y causar recaída del paciente.^(50, 52) Los pacientes que presentan hematopoyesis clonal son más susceptibles de desarrollar tumores hematológicos a los 6 meses después de la evaluación de muestra y presentan menor supervivencia.⁽⁵⁵⁾

La NGS permite estimar la proporción de células tumorales basándose en el nivel de la VAF y por lo tanto inferir la arquitectura clonal del paciente. El análisis de los 23 pacientes estudiados mediante NGS en el presente trabajo, ha confirmado la alta heterogeneidad clonal asociada a esta patología, y la consecuente dinámica del perfil mutacional asociada a refractariedad y recaída. Una dinámica causada en parte por la adquisición de nuevas mutaciones, que genera nuevos clones y la evolución de estos incluso años después de finalizar el tratamiento.

Variantes cercanas al 50% son interpretadas como polimorfismos germinales en heterocigosis, y suelen asociarse a mutaciones típicas de hematopoyesis clonal. Además se relacionan a eventos tempranos en la leucemogénesis y según reporta la bibliografía mutaciones involucradas en clones previos a la leucemia se localizan en los genes *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2* e *IDH2*; y mutaciones involucradas en hematopoyesis leucémica en los genes *NPM1*, *PHF6*, *SRSF2*, *RUNX1* y *TP53*.^(14, 32, 56, 135-140) En nuestra serie las variantes presentes en muestras en estado de RC identificadas previamente en el diagnóstico involucra a los genes *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*; así como otros no asociados bibliográficamente: *KMT2A*, *ZRSR2*, *CBL* y *NRAS*.

Como reportan otros estudios pareados diagnóstico vs. recaída mutaciones en los genes *DNMT3A*, *IDH2*, *RUNX1* y *TET2* muestran estabilidad clonal; mientras que mutaciones *IDH1* tienden a manifestarse menos modificarse.⁽¹⁴¹⁾ Un resultado que se reproduce en nuestra serie, salvo en el caso de *IDH1* ya que también se muestra estable en muestras en recaída.

Es conocido que mutaciones en *DNMT3A* se identifica con alta VAF al diagnóstico y también en la recaída, lo que sugiere que es parte del clon fundador, mostrándose incluso presente en RC morfológica.⁽¹⁴¹⁾

En nuestra serie 7 de las 9 muestras en recaída valoradas conserva la mutación en *DNMT3A* con una mediana de variación de la VAF del 2%.

Mutaciones en los genes *FLT3* y *N/KRAS* presentan VAF más bajas y ambas se relacionan con eventos tardíos en la patogénesis de la enfermedad.⁽¹⁴⁾ Ambos asociados en *FLT3* y *N/KRAS* con la reaparición de la enfermedad en otros trabajos pareados diagnóstico vs. recaída.⁽¹³⁶⁾ Sin embargo, en nuestro estudio mutaciones en estos genes presentan una VAF equivalente a las reportadas solo en el caso de *KRAS*, mientras que *NRAS* y *FLT3* presentan VAF superiores al 30%. *FLT3* se mantiene estable en 1/1 de la refractariedad y en 4/5 y en 0/5 en las RC, con VAF cercanos al 50%. Y *KRAS* aparece *de novo* en la muestra de recaída en los dos eventos detectados, *NRAS* manifiesta un patrón versátil según el momento evaluado ya que se mantiene en 4/4 de los eventos en refractariedad, 2/5 de los eventos en RC y en 1/5 de los eventos en recaída.

Y aunque otros estudios afirman reducción de VAF sustancial para el gen *SF3B1* en la recaída respecto al diagnóstico,⁽⁵⁴⁾ en nuestro caso manifiesta alta dinámica clonal puesto que aparece *de novo* en 3/7 eventos detectados, mientras que en los 4/7 restantes sí vemos que la VAF disminuye 23%, 47%, 2% y 3%.

El número de mutaciones identificado en este proyecto no es suficiente para inferir con precisión patrones de arquitectura clonal. Al limitar el estudio a la región codificante de un número limitado de genes (n=32) podemos estar obviando otros potenciales marcadores de clonalidad que pudieran ser beneficiosos para el pronóstico. Además, otra de las limitaciones inherentes a tumores líquidos es la ausencia de muestra germinal pareada como control, por lo que polimorfismos no patogénicos pueden ser valorados erróneamente como marcadores.⁽¹⁴²⁾

Por otro lado, este trabajo es uno de los pocos trabajos que combina el análisis pareado de refractariedad vs diagnóstico, RC vs diagnóstico y recaída vs diagnóstico simultáneamente. Una de las mayores ventajas de este estudio radica en la alta mediana de cobertura alcanzada de las variantes, (> 1000X), lo que confiere una detección de sub-clones con frecuencias alélicas muy bajas (VAF < 5%).

En conclusión, los resultados presentados evidencian como la secuenciación mediante NGS es capaz de detectar perfiles mutacionales en muestras de seguimiento de LMA, y cómo estos perfiles son dinámicos en la evolución de la enfermedad. Tanto la adquisición de nuevas mutaciones como la re-expansión y pérdida de las detectadas en el diagnóstico, conforman dinámica clonal y condiciona la refractariedad y recaída de los pacientes. Este estudio sugiere que la evaluación de múltiples marcadores mediante NGS tanto en el diagnóstico como en el seguimiento del pacientes podría ser útil en la práctica clínica y la decisión terapéutica, y que cada paciente debe ser estudiado de manera personalizada.

5.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EMR EN LMA MEDIANTE NGS

Los resultados del apartado anterior sugieren la capacidad informativa que ofrecen los estudios moleculares mediante NGS a lo largo del seguimiento del paciente. Por eso en este trabajo se ha optimizado y validado un método basado en NGS de alta sensibilidad para detectar y cuantificar secuencias mutadas en *NPM1*, *IDH1/2* y *FLT3-SNV* a una frecuencia alélica muy baja en muestras de ADN_g tomadas en el seguimiento.

La tecnología de NGS ha demostrado valor pronóstico en el diagnóstico en pacientes con LMA,⁽¹²⁾ y también puede ser una herramienta útil para detectar EMR.^(143, 144) En primer lugar se estudió el perfil mutacional en el diagnóstico de pacientes con LMA usando un panel NGS personalizado para garantizar una alta aplicabilidad, 82% de los casos de nuestra cohorte. Este enfoque también es un método útil para identificar todos los posibles candidatos como marcadores de EMR, con el fin de seleccionar uno o varios marcadores candidatos de manera personalizada. Este método además permite la combinación de varios marcadores simultáneamente y supera las limitaciones características del seguimiento de EMR relativa a la heterogeneidad sub-clonal de LMA y a las mutaciones tipo CHIP.⁽⁵⁹⁾

Como ya se ha detallado en el apartado anterior, variantes reportadas asociadas a CHIP se localizan principalmente en los genes *DNMT3A*, *TET2* o *ASXL1*, y se detectan en la fase pre-leucémica y en los estados de remisión completa de LMA.^(14, 16, 65, 145) De hecho, cualquier gen podría portar variantes tanto asociadas como no asociadas a CHIP dependiendo de la localización cromosómica de las mismas, originando una situación que debe evaluarse para cada paciente. En este sentido, otros estudios han demostrado que genes relacionados con CHIP, tales como *IDH1/2*, son igualmente válidos para predecir el pronóstico debido a que en estos casos las alteraciones genéticas se han adquirido en el clon leucémico y no previamente.⁽¹³⁾

En este sentido el método desarrollado tiene la capacidad de evaluar múltiples marcadores simultáneamente y considerando que 61% de los pacientes de nuestra cohorte debuta con dos o más alteraciones genéticas, le confiere suficientemente robustez como método de monitorización de la EMR en los pacientes, incluso si estos presentan evolución clonal.

La sensibilidad alcanzada con este método se establece en la detección de una célula mutada entre 100000 células no mutadas (LOQ 10^{-5}) para el prototipo ensayado de mutaciones tipo InDel (*NPM1*) y una célula mutada entre 10000 células no mutadas (LOQ 10^{-4}) para los prototipos ensayados de mutaciones tipo SNV (*IDH1/2* y *FLT3-SNV*.) Esta diferencia en la sensibilidad se relaciona con el hecho de que la mutación de *NPM1*-tipo A (insCCTG) es una mutación cuya detección errónea por NGS es altamente improbable, asegurando mayor precisión en la cuantificación de la misma.

El método desarrollado tiene una tasa de error intrínseca asociada a la secuenciación mediante NGS del 1-2% respecto al total de las secuencias obtenidas, lo que limita su sensibilidad en la mayoría de los variantes de tipo SNV. Sin embargo, esta limitación puede superarse gracias a la naturaleza escalar de la NGS.⁽¹⁴⁶⁾ Por lo tanto, conseguimos incrementar la sensibilidad de NGS aumentando la cantidad de ADN mediante PCR antes de la secuenciación propiamente dicha, y aumentando la profundidad de cobertura a un millón de lecturas totales. De manera paralela se optimizó también el análisis bioinformático mejorando la especificidad de la técnica al aumentar la precisión en la búsqueda de la variante diana, y reduciendo el tiempo de cálculo. Nuestro método basado en NGS presenta una sensibilidad de las más altas reportadas utilizando esta tecnología en LMA.^(45, 142-144, 147, 148)

La PCR digital (dPCR) es una técnica relativamente novedosa para la cuantificación relativa de ácidos nucleicos, basada en la división del volumen de PCR en infinitas partes y en la estadística de Poisson.⁽¹⁴⁹⁾ También es una técnica extremadamente sensible y con alta especificidad debido a la detección de mutaciones alelo específicas.⁽¹⁵⁰⁾ Sin embargo, cuando comparamos las mismas diluciones estándar empleadas en el método basado en NGS, observamos que la dPCR detectó dos logaritmos menos en el caso de variantes tipo InDels (*NPM1*, LOQ= 10^{-3}) y un logaritmo menos en los casos de variantes tipo SNV (*IDH1/2*; LOQ= 10^{-3}), una sensibilidad similar a lo informado en un estudio previamente publicado.⁽¹⁵¹⁾ Por lo tanto y comparado con la tecnología NGS, la dPCR es una técnica de medición más rápida pero requiere primers alelo específicos que complican el abordaje experimental. Además necesita un gran número de ensayos paralelos para aumentar la sensibilidad, aumentando el costo económico. Y aunque la tecnología mediante dPCR permite el estudio de varios marcadores simultáneamente, desafortunadamente este se reduce a un número muy limitado dentro de cada muestra.⁽⁵⁸⁾ Otra ventaja de la tecnología NGS al igual que la dPCR es que no requieren curvas de calibración en cada ensayo, y los resultados se informan en valores absolutos, facilitando su estandarización.

El método basado en NGS descrito mostró sensibilidades (10^{-4} para SNV y 10^{-5} para InDels) comparables con métodos basados en CMF en aquellos casos que presentan poblaciones inmunofenóticamente aberrantes.^(61, 152) Y aunque mostró una sensibilidad similar a la alcanzada por qPCR, el método basado en NGS no requiere oligonucleótidos que hibriden específicamente con una secuencia concreta, por lo que cualquiera de las posiciones nucleotídicas en la región amplificada puede ser analizada. En consecuencia, la técnica mediante NGS tiene la capacidad de detectar todas las mutaciones del subtipo *NPM1* de manera simultánea.

Se encontraron correlaciones positivas aunque no con la linealidad esperada cuando los niveles de EMR fueron evaluados mediante NGS frente a CFM y frente a qPCR. En el caso de CMF podría explicarse, en parte, porque las mutaciones de *NPM1* generalmente están asociadas al subtipo monocítico-LMA, que a menudo presenta mayor dificultad para identificar EMR mediante estudios

de inmunofenotipo. De hecho, Salipante et al⁽¹⁴⁷⁾ describieron que el nivel de éxito de CMF depende en gran medida del inmunofenotipo de los blastos anormales y del poder discriminatorio de los blastos regenerados que puedan localizarse en la misma muestra. Además, debido a la falta de estandarización, la CMF muestra una variabilidad sustancial entre los distintos laboratorios, que incluye variabilidad en el procesamiento de las muestras, configuración del instrumento, el número de eventos valorados y el criterio subjetivo del analista.⁽¹⁵³⁾ La falta de una alta correlación entre NGS y qPCR podría explicarse por la naturaleza de la muestra (la secuenciación usa ADNg mientras que la qPCR usa ADNc). Aunque la sobre-expresión de ARN permite una mayor sensibilidad de detección, los niveles de expresión de ARN no se correlacionan con el número de células tumorales a diferencia de la cantidad de ADN genómico mutado. En consecuencia, el ADN mutado es más representativo de la carga tumoral de lo que es la sobre-expresión de ARN mutado.
(154)

Finalmente, el análisis de supervivencia mostró que presentar EMR positiva evaluado por NGS en post-consolidación se asoció con un mayor riesgo de recaída y muerte, y que presentar EMR negativa se asoció con mayor SG y SLE; acorde a estudios publicados recientemente.⁽⁶⁵⁾ Apoyando estos hallazgos, estudios previos reportaron que evaluar el estado de EMR en post-consolidación podría ser el mejor momento para realizar este análisis porque ofrece buenos resultados predictivos de la evolución del paciente.^(64, 155-158) Los análisis multivariantes de regresión de Cox confirmaron que el estado positivo de EMR mediante secuenciación fue el único factor independiente capaz de predecir de riesgo significativo de recaída ($p = 0,012$). Cabe señalar que la predicción de la supervivencia de pacientes con LMA utilizando el método de NGS mejoró la predicción sobre los la evaluación de la EMR utilizando CMF o qPCR, al menos en las cohortes evaluadas.

En conclusión, se ha optimizado un nuevo método de secuenciación dirigida con alta sensibilidad para la evaluación de EMR con aplicabilidad para un alto porcentaje de pacientes con LMA, mejorando la capacidad de predecir la evolución de la enfermedad respecto a CMF o qPCR.

5.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO PRE-TRATAMIENTO EN LMA

El uso de variantes alélicas como marcadores moleculares con valor predictivo se está incorporando cada vez más como criterio de monitorización de la progresión de tumores y de la aparición de resistencias tanto al inicio como durante el tratamiento. Tal es así que los avances en genómica enfocada a cáncer está permitiendo la identificación de mutaciones incluso cuando estas se hallan en muy baja frecuencia alélica, existentes tanto al inicio de la enfermedad como adquiridas posteriormente y que confieren resistencia a diversos fármacos. Los marcadores

moleculares junto con la edad del paciente, AML secundarias, alto recuento leucocitario y alteraciones citogenéticas y están asociados con resistencia a tratamientos. ⁽¹⁵⁹⁾

Estudios de secuenciación en amplias cohortes ha identificado que ciertas mutaciones en *FLT3*, *IDH1*, *KIT* y *RAS* tiene un fuerte impacto en el pronóstico del paciente y en la sensibilidad a fármacos. ^(52, 160, 161) Además los avances en la caracterización genómica de la LMA facilita el desarrollo de una terapia personalizada basada en el perfil molecular combinado con ensayos ex vivo de sensibilidad a drogas. ^(162, 163)

La evolución clonal que pueda darse a lo largo de la enfermedad se ve potenciada en parte por la terapia administrada causando por presión selectiva de ciertos clones que pudieran protagonizar la respuesta a los fármacos empleados en el tratamiento; potenciado en parte por alteraciones en el microambiente que podrían contribuir a dicha selección clonal. ⁽¹⁶⁴⁾ Por ello en este estudio se utiliza un modelo experimental que se ajusta con mayor fidelidad al comportamiento de las células tumorales en el paciente, ya que incorpora dicho microambiente en el test ex vivo.

Este estudio prueba la capacidad de predecir la respuesta a tratamientos estándar utilizando un método no invasivo y de manera paralela a la evolución clínica del paciente. El test estratifica pacientes según su respuesta farmacológica, y es capaz de discriminar probabilidad de supervivencia entre los pacientes clasificados como sensibles (AUC inferiores percentil 20) respecto a pacientes clasificados como resistentes (AUC inferiores percentil 80) en los ensayos con fludarabina y con amsacrina.

Evaluando los valores óptimos respecto a la sensibilidad y especificidad obtenidos en las curvas ROC para en el ensayo con citarabina, la precisión diagnóstica del test farmacológico optimiza su valor predictivo. La probabilidad de SG estimada fue inferior en pacientes pronosticados como resistentes a citarabina bajo este criterio respecto a los pacientes que fueron clasificados como sensibles ($p=0,058$). Los resultados mostraron una buena correlación (69%) entre la respuesta con citarabina ex vivo y la respuesta hematológica al tratamiento de inducción, acorde al modelo predictivo ya reportado para este test.

Además, se ha observado un grupo de pacientes que presentan un patrón de resistencia a múltiples fármacos y que presenta menor supervivencia global que el resto de pacientes ($p=0,015$).

El conocimiento genómico se está utilizando para la monitorización de cualquier tipo de cáncer y la detección temprana de resistencia durante el tratamiento. Tal es así que el perfil mutacional de los pacientes ha detectado mutaciones existentes o adquiridas que le confieren resistencia a fármacos. ^(165, 166) Concretamente en este trabajo se ha observado variabilidad de la respuesta ex vivo en relación a marcadores moleculares.

Por un lado muestran mayor sensibilidad ex vivo pacientes mutados en *NPM1* en los ensayos con mitoxantrona y amsacrina; pacientes mutados en *FLT3* en los ensayos con daunorubicina, panobinostat, 6-tioguanina y 5-azacitidina; pacientes mutados en *KMT2A* en los ensayos con idarubicina y fludarabina; y pacientes mutados en *KRAS* en los ensayos con sorafenib y mafosfamida.

Por otro lado muestran menor sensibilidad ex vivo pacientes mutados en *U2AF1* en los ensayos con amsacrina y 6-tioguanina; pacientes mutados en *TP53* en los ensayos con fludarabina y mitoxantrona; pacientes mutados en *EPOR* en el ensayo con citarabina; y pacientes mutados en *IDH2* en el ensayo con citarabina.

Antes estas evidencias en este estudio se estableció un nuevo punto de corte para discriminar los buenos respondedores de malos al tratamiento, según un score que incluye marcadores moleculares en combinación con la respuesta farmacológica. Se seleccionaron los marcadores moleculares con mayor riesgo de muerte otorgado por el análisis de regresión multivariable: *TP53* (HR:12,22; $p < 0,001$), *TET2* (HR:4,39; $p = 0,024$), *KMT2A* (HR:6,43; $p = 0,032$) y la respuesta múltiple farmacológica (HR:2,52; $p = 0,047$). Utilizando este score de riesgo adverso, se alcanzó el mejor modelo de predicción por encima de la alcanzada cuando solo se utiliza la respuesta farmacológica o la alcanzada si solo se valoran marcadores moleculares de forma independiente.

Como se ajusta a nuestros datos, mutaciones tanto en *TET2* como *TP53* han sido reportados como marcadores que identifica como pacientes malos respondedores en eventos tempranos.⁽¹⁶⁷⁾

En conclusión, el estudio combinado del perfil mutacional mediante NGS junto con el test farmacológico ex vivo a drogas podría ofrecer un mejor conocimiento de la patología que nos guíe en la decisión del esquema terapéutico de una manera personalizada. Valorando esencialmente a los pacientes pronosticados de riesgo adverso como posibles candidatos de inclusión en ensayos clínicos u otros esquemas de inducción alternativos.

CONCLUSIONES

La conclusión global de este trabajo radica en la utilidad de herramientas computacionales y el desarrollo de pipelines personalizados que optimizan el abordaje de datos de origen *–ómico* obtenidos mediante tecnología NGS. Permitiendo establecer marcadores moleculares con valor pronóstico y terapéutico en distintos momentos de la enfermedad, así como complementar los resultados derivados de ensayos farmacológicos *ex vivo*.

Las conclusiones específicas de este trabajo han sido las siguientes:

1. El análisis de las regiones codificantes de 32 genes mediante NGS identifica marcadores moleculares en el 86 % de los pacientes, con una mediana de 2 mutaciones por paciente y una frecuencia alélica mediana del 33%.
2. Los genes candidatos como marcadores moleculares de riesgo adverso de muerte son *TP53*, *U2AF1*, *KMT2A* y *EZH2*. El gen candidato como marcador molecular de menor de muerte es *ZRSR2*. Y el gen candidato como marcador molecular de riesgo adverso de recaída es *EZH2*.
3. El estudio del perfil mutacional mediante NGS asociado a fracaso terapéutico revela estabilidad clonal en los casos de refractariedad primaria. El 77% de los marcadores moleculares detectados al diagnóstico persisten después del tratamiento de inducción.
4. El estudio del perfil mutacional mediante NGS revela dinámica clonal en los casos de recaída. Una alta representación de marcadores moleculares surgen *de novo* y el 76% de los marcadores moleculares detectados al diagnóstico resurgen después de alcanzar RC.
5. El método de detección de EMR mediante NGS desarrollado tiene una aplicabilidad del 82% de los pacientes con LMA y muestra una sensibilidad de 10^{-4} para la detección de variantes de SNV y 10^{-5} para la detección de InDels. Presentar EMR positiva valorada por NGS es uno de los parámetros con mayor valor pronóstico adverso de muerte.
6. El test farmacológico *ex vivo* es capaz de discriminar pacientes sensibles y pacientes resistentes a fármacos antiléucemia. Se ha validado menor supervivencia de los pacientes resistentes a citarabina *ex vivo* respecto a los pacientes sensibles. Y la respuesta clínica se ha correlacionado en el 67 % de los pacientes.
7. Los marcadores moleculares modulan la respuesta farmacológica *ex vivo*.
8. El score combinado, del perfil farmacológico y del perfil mutacional, potencia el valor predictivo del pronóstico del paciente

BIBLIOGRAFÍA

1. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368(9550):1894-907.
2. Maynadie M, Girodon F, Manivet-Janoray I, Mounier M, Mugneret F, Bailly F, et al. Twenty-five years of epidemiological recording on myeloid malignancies: data from the specialized registry of hematologic malignancies of Cote d'Or (Burgundy, France). *Haematologica*. 2011;96(1):55-61.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):620-5.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. 1991;78(3):325-9.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
7. Harada Y, Nagata Y, Kihara R, Ishikawa Y, Asou N, Ohtake S, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leuk Res*. 2018;66:20-7.
8. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner 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. *Blood*. 2010;115(3):453-74.
9. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
10. 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. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
11. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23.
12. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-89.
13. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
14. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Gorlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686-98.
15. Papaemmanuil E, Dohner H, Campbell PJ. Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;375(9):900-1.
16. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-46.
17. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):475-86.
18. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-41.
19. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients

treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-65.

20. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.

21. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012;119(9):2114-21.

22. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-76.

23. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*. 2005;19(3):329-34.

24. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol*. 2009;27(4):171-81.

25. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009;114(11):2220-31.

26. Ohgami RS, Arber DA. The diagnostic and clinical impact of genetics and epigenetics in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2015;37 Suppl 1:122-32.

27. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-6.

28. Bowman RL, Busque L, Levine RL. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. *Cell Stem Cell*. 2018;22(2):157-70.

29. Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2015;4(3):460-78.

30. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2424-33.

31. Aad G, Abbott B, Abdallah J, Abdelalim AA, Abdesselam A, Abidinov O, et al. Observation of a centrality-dependent dijet asymmetry in lead-lead collisions at $\sqrt{s(NN)} = 2.76$ TeV with the ATLAS detector at the LHC. *Phys Rev Lett*. 2010;105(25):252303.

32. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(7):2548-53.

33. Cedena MT, Rapado I, Santos-Lozano A, Ayala R, Onecha E, Abaigar M, et al. Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017;8(63):106948-61.

34. Lagunas-Rangel FA, Chavez-Valencia V, Gomez-Guijosa MA, Cortes-Penagos C. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2017;11(4):328-39.

35. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(4):1262-70.

36. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2451-9.

37. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109(2):431-48.

38. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Bloomfield CD. Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2008;20(6):711-8.

39. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013;122(25):4021-34.

40. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, Callaghan M, Noris P, Savoia A, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2015;47(5):535-8.
41. Topka S, Vijai J, Walsh MF, Jacobs L, Maria A, Villano D, et al. Germline ETV6 Mutations Confer Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia and Thrombocytopenia. *PLoS Genet.* 2015;11(6):e1005262.
42. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature.* 2015;518(7540):552-5.
43. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(24):4991-5004.
44. Kuehn EW, Walz G, Benzing T. Von hippel-lindau: a tumor suppressor links microtubules to ciliogenesis and cancer development. *Cancer Res.* 2007;67(10):4537-40.
45. Klco JM, Miller CA, Griffith M, Petti A, Spencer DH, Ketkar-Kulkarni S, et al. Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA.* 2015;314(8):811-22.
46. Breems DA, Van Putten WL, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Verdonck LF, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol.* 2005;23(9):1969-78.
47. Pemmaraju N, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Pierce S, Cardenas-Turanzas M, Cortes J, et al. Improving outcomes for patients with acute myeloid leukemia in first relapse: a single center experience. *Am J Hematol.* 2015;90(1):27-30.
48. Bose P, Vachhani P, Cortes JE. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(3):17.
49. Ramos NR, Mo CC, Karp JE, Hourigan CS. Current Approaches in the Treatment of Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2015;4(4):665-95.
50. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481(7382):506-10.
51. Chung SS, Park CY. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* 2017;1(26):2572-8.
52. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012;150(2):264-78.
53. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126(1):9-16.
54. Arends CM, Galan-Sousa J, Hoyer K, Chan W, Jager M, Yoshida K, et al. Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis. *Leukemia.* 2018.
55. Shlush LI. Age-related clonal hematopoiesis. *Blood.* 2018;131(5):496-504.
56. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-87.
57. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1090-8.
58. Roloff GW, Lai C, Hourigan CS, Dillon LW. Technical Advances in the Measurement of Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2017;6(9).
59. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Bene 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):1275-91.
60. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, Grimwade D, Russell N, Hills RK, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2013;31(32):4123-31.
61. Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, van der Velden VH, Brooimans RA, Pabst T, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid

- leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3889-97.
62. Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Br J Haematol*. 2011;153(4):421-36.
 63. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):222-33.
 64. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(7):1482-90.
 65. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1189-99.
 66. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21(24):4642-9.
 67. Derendorf H, Lesko LJ, Chaikin P, Colburn WA, Lee P, Miller R, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug research and development. *J Clin Pharmacol*. 2000;40(12 Pt 2):1399-418.
 68. Schoemaker RC, van Gerven JM, Cohen AF. Estimating potency for the Emax-model without attaining maximal effects. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1998;26(5):581-93.
 69. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55.
 70. Zhao L, Au JL, Wientjes MG. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:241-9.
 71. Bennett TA, Montesinos P, Moscardo F, Martinez-Cuadron D, Martinez J, Sierra J, et al. Pharmacological profiles of acute myeloid leukemia treatments in patient samples by automated flow cytometry: a bridge to individualized medicine. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(4):305-18.
 72. Hernandez P, Gorrochategui J, Primo D, Robles A, Rojas JL, Espinosa AB, et al. Drug Discovery Testing Compounds in Patient Samples by Automated Flow Cytometry. *SLAS Technol*. 2017;22(3):325-37.
 73. Swords RT, Azzam D, Al-Ali H, Lohse I, Volmar CH, Watts JM, et al. Ex-vivo sensitivity profiling to guide clinical decision making in acute myeloid leukemia: A pilot study. *Leuk Res*. 2018;64:34-41.
 74. Bosanquet AG, Richards SM, Wade R, Else M, Matutes E, Dyer MJ, et al. Drug cross-resistance and therapy-induced resistance in chronic lymphocytic leukaemia by an enhanced method of individualised tumour response testing. *Br J Haematol*. 2009;146(4):384-95.
 75. Piatkowska M, Styczynski J, Kolodziej B, Kurylo-Rafinska B, Kubicka M, Pogorzala M, et al. Individualized tumor response testing profile has a prognostic value in childhood acute leukemias: multicenter non-interventional long-term follow-up study. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(6):1256-62.
 76. McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(3):217-28.
 77. Sounni NE, Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem*. 2013;59(1):85-93.
 78. Pottier C, Wheatherspoon A, Roncarati P, Longuespee R, Herfs M, Duray A, et al. The importance of the tumor microenvironment in the therapeutic management of cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15(8):943-54.
 79. Tawfik B, Sliesoraitis S, Lyerly S, Klepin HD, Lawrence J, Isom S, et al. Efficacy of the hypomethylating agents as frontline, salvage, or consolidation therapy in adults with acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol*. 2014;93(1):47-55.
 80. Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*. 2009;10(10):1657-74.
 81. Cooper T, Ayres M, Nowak B, Gandhi V. Biochemical modulation of cytarabine triphosphate

- by clofarabine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55(4):361-8.
82. Faderl S, Gandhi V, Keating MJ, Jeha S, Plunkett W, Kantarjian HM. The role of clofarabine in hematologic and solid malignancies--development of a next-generation nucleoside analog. *Cancer*. 2005;103(10):1985-95.
83. Krynetski EY, Evans WE. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res*. 1999;16(3):342-9.
84. de Boer NK, van Bodegraven AA, Jharap B, de Graaf P, Mulder CJ. Drug Insight: pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007;4(12):686-94.
85. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(5):338-50.
86. Chen Y, Borthakur G. Lenalidomide as a novel treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22(3):389-97.
87. Ralhan R, Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2007;17(9):1061-75.
88. Zhang W, Konopleva M, Shi YX, McQueen T, Harris D, Ling X, et al. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(3):184-98.
89. Yang X, Wang J. Precision therapy for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):3.
90. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349-52.
91. Giles FJ. New drugs in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2002;4(5):369-74.
92. Barr FA, Sillje HH, Nigg EA. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(6):429-40.
93. Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016;540(7633):433-7.
94. Rubio-Camarillo M, Gomez-Lopez G, Fernandez JM, Valencia A, Pisano DG. RUBioSeq: a suite of parallelized pipelines to automate exome variation and bisulfite-seq analyses. *Bioinformatics*. 2013;29(13):1687-9.
95. Rubio-Camarillo M, Lopez-Fernandez H, Gomez-Lopez G, Carro A, Fernandez JM, Torre CF, et al. RUBioSeq+: A multiplatform application that executes parallelized pipelines to analyse next-generation sequencing data. *Comput Methods Programs Biomed*. 2017;138:73-81.
96. Homer N, Merriman B, Nelson SF. BFAST: an alignment tool for large scale genome resequencing. *PLoS One*. 2009;4(11):e7767.
97. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.
98. De Summa S, Malerba G, Pinto R, Mori A, Mijatovic V, Tommasi S. GATK hard filtering: tunable parameters to improve variant calling for next generation sequencing targeted gene panel data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(Suppl 5):119.
99. Hummel M, Bonnin S, Lowy E, Roma G. TEQC: an R package for quality control in target capture experiments. *Bioinformatics*. 2011;27(9):1316-7.
100. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*. 2016;17(1):122.
101. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):213-9.
102. Curwen V, Eyraas E, Andrews TD, Clarke L, Mongin E, Searle SM, et al. The Ensembl automatic gene annotation system. *Genome Res*. 2004;14(5):942-50.
103. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*. 1992;13(3):444-9.
104. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*. 2012;84(2):1003-11.
105. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al.

- Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103-8.
106. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
107. Johansson AM, Karlsson MO. Multiple imputation of missing covariates in NONMEM and evaluation of the method's sensitivity to eta-shrinkage. *AAPS J*. 2013;15(4):1035-42.
108. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):178-92.
109. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, et al. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol*. 2007;8(9):R183.
110. Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350(16):1605-16.
111. de la Bletiere DR, Blanchet O, Cornillet-Lefebvre P, Coutolleau A, Baranger L, Genevieve F, et al. Routine use of microarray-based gene expression profiling to identify patients with low cytogenetic risk acute myeloid leukemia: accurate results can be obtained even with suboptimal samples. *BMC Med Genomics*. 2012;5:6.
112. Cancer, Leukemia Group B, Farag SS, Archer KJ, Mrozek K, Ruppert AS, et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood*. 2006;108(1):63-73.
113. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008;26(10):1135-45.
114. Sabatini LM, Mathews C, Ptak D, Doshi S, Tynan K, Hegde MR, et al. Genomic Sequencing Procedure Microcosting Analysis and Health Economic Cost-Impact Analysis: A Report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2016;18(3):319-28.
115. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155(1):27-38.
116. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058-66.
117. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 2013;153(1):17-37.
118. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
119. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
120. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899-905.
121. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
122. Wakita S, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kurosawa S, Kobayashi Y, et al. Complex molecular genetic abnormalities involving three or more genetic mutations are important prognostic factors for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(3):545-54.
123. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-27; quiz 99.
124. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(8):2854-61.

125. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol.* 2013;160(5):660-72.
126. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(3):152-65.
127. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011;43(4):309-15.
128. Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stolze A, Spath D, Kuendgen A, et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AML SG). *Blood.* 2013;121(23):4769-77.
129. Rowe JM, Tallman MS. How I treat acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010;116(17):3147-56.
130. Al-Saleh I, Al-Rouqi R, Obsum CA, Shinwari N, Mashhour A, Billedo G, et al. Interaction between cadmium (Cd), selenium (Se) and oxidative stress biomarkers in healthy mothers and its impact on birth anthropometric measures. *Int J Hyg Environ Health.* 2015;218(1):66-90.
131. De S, Ganesan S. Looking beyond drivers and passengers in cancer genome sequencing data. *Ann Oncol.* 2017;28(5):938-45.
132. Barber LJ, Davies MN, Gerlinger M. Dissecting cancer evolution at the macro-heterogeneity and micro-heterogeneity scale. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;30:1-6.
133. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
134. Sottoriva A, Kang H, Ma Z, Graham TA, Salomon MP, Zhao J, et al. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet.* 2015;47(3):209-16.
135. Jan M, Majeti R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene.* 2013;32(2):135-40.
136. Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschurtz F, Gaidzik VI, Kuhn MW, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122(1):100-8.
137. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-98.
138. Klco JM, Spencer DH, Miller CA, Griffith M, Lamprecht TL, O'Laughlin M, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2014;25(3):379-92.
139. Quek L, Ferguson P, Metzner M, Ahmed I, Kennedy A, Garnett C, et al. Mutational analysis of disease relapse in patients allografted for acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2016;1(3):193-204.
140. Quek L, Otto GW, Garnett C, Lhermitte L, Karamitros D, Stoilova B, et al. Genetically distinct leukemic stem cells in human CD34- acute myeloid leukemia are arrested at a hemopoietic precursor-like stage. *J Exp Med.* 2016;213(8):1513-35.
141. Garg M, Nagata Y, Kanojia D, Mayakonda A, Yoshida K, Haridas Keloth S, et al. Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse. *Blood.* 2015;126(22):2491-501.
142. Getta BM, Devlin SM, Levine RL, Arcila ME, Mohanty AS, Zehir A, et al. Multicolor Flow Cytometry and Multigene Next-Generation Sequencing Are Complementary and Highly Predictive for Relapse in Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(7):1064-71.
143. Thol F, Kolking B, Damm F, Reinhardt K, Klusmann JH, Reinhardt D, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(7):689-95.
144. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, Grossmann V, Schindela S, Dicker F, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia.* 2014;28(1):129-37.
145. Koefler HP, Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia.* 2017;31(3):534-42.

146. Tomlinson B, Lazarus HM. Enhancing acute myeloid leukemia therapy - monitoring response using residual disease testing as a guide to therapeutic decision-making. *Expert Rev Hematol.* 2017;10(6):563-74.
147. Salipante SJ, Fromm JR, Shendure J, Wood BL, Wu D. Detection of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Mod Pathol.* 2014;27(11):1438-46.
148. Debarri H, Lebon D, Roumier C, Cheok M, Marceau-Renaut A, Nibourel O, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget.* 2015;6(39):42345-53.
149. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, Minervini A, Minervini CF, Casieri P, et al. Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia. *J Mol Diagn.* 2017;19(3):437-44.
150. Aaboud M, Aad G, Abbott B, Abidinov O, Abeloos B, Abidi SH, et al. Search for the Decay of the Higgs Boson to Charm Quarks with the ATLAS Experiment. *Phys Rev Lett.* 2018;120(21):211802.
151. Minervini A, Francesco Minervini C, Anelli L, Zagaria A, Casieri P, Cocco N, et al. Droplet digital PCR analysis of NOTCH1 gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(52):86469-79.
152. Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):356-65.
153. Cruz NM, Mencia-Trinchant N, Hassane DC, Guzman ML. Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2017;39 Suppl 1:53-60.
154. Duployez N, Nibourel O, Marceau-Renaut A, Willekens C, Helevaut N, Caillault A, et al. Minimal residual disease monitoring in t(8;21) acute myeloid leukemia based on RUNX1-RUNX1T1 fusion quantification on genomic DNA. *Am J Hematol.* 2014;89(6):610-5.
155. Jacobsohn DA, Tse WT, Chaleff S, Rademaker A, Duerst R, Olszewski M, et al. High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol.* 2009;146(6):669-74.
156. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(12):2213-23.
157. Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, Liu DH, Jiang H, Chen H, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood.* 2013;121(20):4056-62.
158. Rossi G, Carella AM, Minervini MM, di Nardo F, Waure C, Greco MM, et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tumor 1 expression. *Leuk Res.* 2015;39(2):138-43.
159. Walter RB, Othus M, Burnett AK, Lowenberg B, Kantarjian HM, Ossenkoppele GJ, et al. Resistance prediction in AML: analysis of 4601 patients from MRC/NCRI, HOVON/SAKK, SWOG and MD Anderson Cancer Center. *Leukemia.* 2015;29(2):312-20.
160. Smith FO. Personalized medicine for AML? *Blood.* 2010;116(15):2622-3.
161. Dohner H, Gaidzik VI. Impact of genetic features on treatment decisions in AML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:36-42.
162. Hourigan CS, Karp JE. Personalized therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Discov.* 2013;3(12):1336-8.
163. Pemovska T, Kontro M, Yadav B, Edgren H, Eldfors S, Szwajda A, et al. Individualized systems medicine strategy to tailor treatments for patients with chemorefractory acute myeloid leukemia. *Cancer Discov.* 2013;3(12):1416-29.
164. Medyouf H. The microenvironment in human myeloid malignancies: emerging concepts and therapeutic implications. *Blood.* 2017;129(12):1617-26.
165. Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal

- clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun.* 2015;6:8760.
166. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun.* 2016;7:11815.
167. Hirsch P, Tang R, Abermil N, Flandrin P, Moatti H, Favale F, et al. Precision and prognostic value of clone-specific minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2017;102(7):1227-37.

ANEXOS

ANEXO 1. FICHERO DE SALIDA DE RUBIOSEQ

Variable	Descripción
chr	Chromosome
loc	Variant genomic position (hg19)
mut	Reference allele/Variant allele
gene_hgnc	Gene official name
tumorportal	tumor types where the gene is significantly mutated as indicated in TumorPortal
role_driver	oncogene or tumor suppressor gene as indicated in Cancer Genome Census (CGC) and OncodriveROLE and driver gene as referenced in Nature, 2013. Tamborero D
Type	Somatic/Germline
zygosity	Tumor sample genotype
var_freq	Variant allele frequency to the total number of sequences in the tumor sample
coverage	Total number of sequences in the tumor sample
gene	Ensembl Gene ID
feature	Ensembl Transcript ID
consequence	Variant effect on the transcript (see figure)
functional_impact_prediction (PolyPhen/SIFT/CONDEL)	Predictive functional effect based on different algorithms
cosmic_id	COSMIC id (if any)
cosmic_vep_id	COSMIC id (if any)
kegg_data	KEGG pathway
protein_position	Variant position on protein sequence
amino_acids	aminoacid affected by the variant
dbSNP	dbSNP id (if any)
clinvar_acc	ClinVar id (if any), semicolon separated
clinvar_disease	Associated conditions (in same order as ClinVar_acc)
clinvar_clinical_significance	Clinical significance (in same order as ClinVar_acc)
variation_type	Type of mutation
HGVS_cDNA	HGVS DNA
HGVS_protein	HGVS protein
GMAF	Global minor allele frequency (MAF): dbSNP is reporting the minor allele frequency for each rs included in a default global population
GMAF_freq	GMAF frequency (<1% is considered rare variant)
gnomAD	Global Allele Frequency for the variant in gnomAD (Exome Aggregation Consortium)
gnomAD_NEF	Allele Frequency for the variant in Non-Finnish European population in gnomAD (Exome Aggregation Consortium)
pfam	PFAM domain affected
uniprot	Uniprot bibliographic references for the variant
interpro	Interpro domain affected
homopolymer	if yes, it might be an sequencing error
repeats	Number of times the variant was detected in our analysis
gene_cosmic_freq	Gene frequency in COSMIC
mut_cosmic_freq	Variant frequency in COSMIC
vscore	Custom score based on relevance (0-1): 1 max and 0 min
comments	Additional comments for the variant (variant from MuTect software, low coverage variant (less than 10% of the median coverage of the PASS variants))

ANEXO 2. FICHERO EJEMPLO *sequencingAP.conf*

#config file

#Optional arguments must be commented when not specified.

#Directories

#Path to PCDA files.

PCDA = /drives/slave/TBU/Programs/sequencingAP/PCDA

#Path to RUBioSeq program.

RUBioSeq = /drives/slave/TBU/Programs/sequencingAP/RUBioSeq3.8

#Path to MuTect program.

MuTect = /localHome/meonecha_fast/muTect-1.1.4-bin

#Path to ONCOCNV.sh edited for this patient

ONCOCNV = /home/meonecha/files_to_Rubioseq/pro42.fastq/42_001

#Path to java 1.6.0 program.

Java = /localHome/meonecha_fast/64/jdk1.6.0_45/bin

#Genome data path

Genome = /drives/slave/TBU/REFERENCES/HG19/

#intervals

Intervals = /localHome/meonecha_fast/IAD51814_112_Designed.bed

#Path to databases.

Databases = /drives/slave/TBU/Programs/sequencingAP/databases_Aug_2017

#Absolute path to template with parameters definition used by RUBioSeq. Mandatory.

Template = /home/meonecha/files_to_Rubioseq/pro87.fastq/87_046/Template.IonTorrent.3.8.xml

#Execution output dir. Default ./output.

OutputDir = /home/meonecha/files_to_Rubioseq/pro87.fastq/87_046

#Absolute path to excel with tumor variants reported by Ion Torrent software. Mandatory.

TumorExcel=/home/meonecha/files_to_Rubioseq/pro87.fastq/87_046/alleles_IonXpress_046_pro87.xls

#Names

#Tumor directory name. Mandatory.

CaseName = 87_046

#Tumor sample name (prefix of fastq file). Mandatory.

TumorName = IonXpress_046_PRO-87

#Control sample name (prefix of fastq file). Optional.

ControlName = NormalBaseline

#Root name for the PCDA output files. Default none.

RootName = 87_046

#RUBioSeq job ID (same name as indicated in RUBioSeq Template). Mandatory

RUBioSeqID = resultsRS

#Options

#Ion Torrent panel used in the analysis. Options: BRCA/cancer/colon&lung/CCP. Mandatory.

Panel = designed

#Tumor class. Mandatory.

TumorClass = 'H12O'

ANEXO 3. FICHERO EJEMPLO *Template.ionTorrent.3.8.xmlm*

```

<!-- EXAMPLE RUBIOSEQ EXPERIMENT CONFIG FILE -->
<configData branch="SNV">
  <!-- GENOME REFERENCE PATH :: MANDATORY -->
  <GenRef>/drives/slave/TBU/REFERENCES/HG19/hg19.fa</GenRef>
  <!-- DBSNP ANNOTATION PATH :: MANDATORY -->
  <DbSnpAnnot>/drives/slave/TBU/REFERENCES/HG19/dbsnp_138.hg19.vcf</DbSnpAnnot>
  <!-- 1000 Genomes ANNOTATION PATH :: MANDATORY -->
  <Genomes1000Annot>/drives/slave/TBU/REFERENCES/HG19/1000G_omni2.5.hg19.vcf</
  Genomes1000Annot>
  <!-- REFSEQ ANNOTATION PATH :: MANDATORY -->
  <IndelAnnot>/drives/slave/TBU/REFERENCES/HG19/refseqhg19.rod</IndelAnnot>
  <!-- INTERVALS PATH :: OPTIONAL -->
  <Intervals>/drives/slave/TBU/Patients/H12O/IAD51814_112_Designed.bed</Intervals>
  <!-- KNOWN INDELS FOR REALIGNING :: OPTIONAL -->
  <KnownIndels>/drives/slave/TBU/REFERENCES/HG19/
  Mills_and_1000G_gold_standard.indels.hg19.vcf</KnownIndels>
  <!-- <KnownIndels>/Volumes/RAID/NGS/HG19/Mills_Devine_2hit.indels.hg19.sites.vcf</
  KnownIndels> -->

<!-- PLATFORM :: MANDATORY -->
  <Platform>ion</Platform>
  <!-- checkCasava :: OPTIONAL. Set to 0 only if fastq reads have ascii33 qualities and they don't
  have standard Casava format -->
  <checkCasava>0</checkCasava>
  <!-- alignProtocol :: OPTIONAL. Values: BWAMEM - applies BWA-Mem alignment,
  recommended for 70bp or greater reads; BWABFAST- applies BWASW + BFAST. Default value:
  BWAMEM -->
  <alignProtocol>BWAMEM</alignProtocol>

<!-- OUTPUT DIRECTORY :: OPTIONAL, DEFAULT: Home directory -->
  <dirOutBase>/home/meonecha/files_to_Rubioseq/pro87.fastq/87_046/</dirOutBase>
  <!-- PROJECT NAME :: MANDATORY -->
  <ProjectId>resultsRS</ProjectId>
  <!-- USER NAME :: OPTIONAL(default Undefined) -->
  <!--<UserName>MyUser</UserName>-->
  <!-- RAW DATA PATH :: MANDATORY -->
  <InDirPreProcess>/home/meonecha/files_to_Rubioseq/pro87.fastq/87_046/</InDirPreProcess>
  <Sample>

```

ANEXO 4. VARIANTES DETECTADAS EN EL DIAGNÓSTICO

Gen	Chr	Localización	Variante (nivel ADN)	Variante (nivel proteína)	Efecto	Tipo	Rep.
Nivel 1							
IDH2	15	90631934	c.419G>A	p.Arg140Gln	missense	SNV	19
DNMT3A	2	25457242	c.2645G>A	p.Arg882His	missense	SNV	16
NRAS	1	115258747	c.35G>A	p.Gly12Asp	missense	SNV	13
NRAS	1	115258744	c.38G>A	p.Gly13Asp	missense	SNV	8
FLT3	13	28592642	c.2503G>T	p.Asp835Tyr	missense	SNV	8
DNMT3A	2	25457243	c.2644C>T	p.Arg882Cys	missense	SNV	8
KRAS	12	25398284	c.35G>A	p.Gly12Asp	missense	SNV	7
IDH1	2	209113113	c.394C>T	p.Arg132Cys	missense	SNV	7
TP53	17	7578398	c.532dup	p.His178ProfsTer3	frameshift insertion	InDel	6
IDH2	15	90631838	c.515G>A	p.Arg172Lys	missense	SNV	6
NRAS	1	115256529	c.182A>G	p.Gln61Arg	missense	SNV	5
SF3B1	2	198266834	c.2098A>G	p.Lys700Glu	missense	SNV	5
U2AF1	21	44524456	c.101C>T	p.Ser34Phe	missense	SNV	5
KRAS	12	25398281	c.38G>A	p.Gly13Asp	missense	SNV	4
IDH1	2	209113112	c.395G>A	p.Arg132His	missense	SNV	4
JAK2	9	5073770	c.1849G>T	p.Val617Phe	missense	SNV	4
NRAS	1	115258748	c.34G>A	p.Gly12Ser	missense	SNV	3
ASXL1	20	31023821	c.3306G>T	p.Glu1102Asp	missense	SNV	3
RUNX1	21	36231782	c.602G>A	p.Arg201Gln	missense	SNV	3
DNMT3A	2	25467083	c.1792C>T	p.Arg598Ter	stop gained	SNV	2
RUNX1	21	36231783	c.601C>T	p.Arg201Ter	stop gained	SNV	2
TET2	4	106164778	c.3646C>T	p.Arg1216Ter	stop gained	SNV	2
TET2	4	106193748	c.4210C>T	p.Arg1404Ter	stop gained	SNV	2
NRAS	1	115258745	c.37G>T	p.Gly13Cys	missense	SNV	2
NRAS	1	115258747	c.35G>T	p.Gly12Val	missense	SNV	2
KMT2A	11	118375572	c.8956G>A	p.Glu2986Lys	missense	SNV	2
FLT3	13	28592623	c.2522A>T	p.Asn841Ile	missense	SNV	2
FLT3	13	28608281	c.1775T>C	p.Val592Ala	missense	SNV	2
TP53	17	7573931	c.1096T>G	p.Ser366Ala	missense	SNV	2
TP53	17	7577538	c.743G>A	p.Arg248Gln	missense	SNV	2
IDH1	2	209113113	c.394C>G	p.Arg132Gly	missense	SNV	2
DNMT3A	2	25523096	c.89A>C	p.Glu30Ala	missense	SNV	2
U2AF1	21	44514777	c.470A>C	p.Gln157Pro	missense	SNV	2
TET2	4	106157698	c.2599T>C	p.Tyr867His	missense	SNV	2
KIT	4	55589774	c.1256A>C	p.Asp419Ala	missense	SNV	2
EZH2	7	148506443	c.2069G>A	p.Arg690His	missense	SNV	2
ASXL1	20	31022288	c.1772ins	p.Tyr591delinsTer	stop gained	InDel	1
KRAS	12	25398279	c.38dup	p.Gly13dup	inframe insertion	InDel	1
MPL	1	43804964	c.414dup	p.Ile139HisfsTer25	frameshift insertion	InDel	1
PTEN	10	89717706	c.732dup	p.Gln245LeufsTer12	frameshift insertion	InDel	1
KMT2A	11	118362487	c.4838ins	p.Pro1614AlafsTer13	frameshift insertion	InDel	1
TET2	4	106156187	c.1087ins	p.Pro363LeufsTer6	frameshift insertion	InDel	1
KIT	4	55602762	c.2583dup	p.Leu862AlafsTer17	frameshift insertion	InDel	1
EZH2	7	148512041	c.1637dup	p.Asn546LysfsTer4	frameshift insertion	InDel	1
JAK2	9	5080558	c.2308ins	p.His770LeufsTer17	frameshift insertion	InDel	1
KDM6A	X	44949005	c.3566dup	p.Met1190AsnfsTer9	frameshift insertion	InDel	1
TP53	17	7578500	c.430C>T	p.Gln144Ter	stop gained	SNV	1
RUNX1	21	36252866	c.496C>T	p.Arg166Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106157809	c.2710C>T	p.Gln904Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106157845	c.2746C>T	p.Gln916Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106157896	c.2797C>T	p.Gln933Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106164831	c.3699G>A	p.Trp1233Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106194019	c.4481C>A	p.Ser1494Ter	stop gained	SNV	1
ZRSR2	X	15827389	c.505C>T	p.Arg169Ter	stop gained	SNV	1
PHF6	X	133511650	c.3G>A	p.Met1?	start lost	SNV	1
NRAS	1	115251173	c.553C>T	p.Pro185Ser	missense	SNV	1
NRAS	1	115256521	c.190T>G	p.Tyr64Asp	missense	SNV	1
NRAS	1	115256528	c.183A>T	p.Gln61His	missense	SNV	1
NRAS	1	115256528	c.183A>C	p.Gln61His	missense	SNV	1
NRAS	1	115256529	c.182A>T	p.Gln61Leu	missense	SNV	1

Gen	Chr	Localización	Variante (nivel ADN)	Variante (nivel proteína)	Efecto	Tipo	Rep.
NRAS	1	115256529	c.182A>C	p.Gln61Pro	missense	SNV	1
NRAS	1	115256538	c.173C>T	p.Thr58Ile	missense	SNV	1
NRAS	1	115258744	c.38G>T	p.Gly13Val	missense	SNV	1
NRAS	1	115258747	c.35G>C	p.Gly12Ala	missense	SNV	1
NRAS	1	115258748	c.34G>T	p.Gly12Cys	missense	SNV	1
PTEN	10	89717716	c.741A>T	p.Leu247Phe	missense	SNV	1
KMT2A	11	118373307	c.6691G>A	p.Gly2231Arg	missense	SNV	1
KMT2A	11	118379865	c.10841T>C	p.Leu3614Pro	missense	SNV	1
CBL	11	119148949	c.1169A>T	p.Asp390Val	missense	SNV	1
CBL	11	119148966	c.1186T>C	p.Cys396Arg	missense	SNV	1
CBL	11	119148982	c.1202G>A	p.Cys401Tyr	missense	SNV	1
CBL	11	119149239	c.1247G>A	p.Cys416Tyr	missense	SNV	1
CBL	11	119149251	c.1259G>A	p.Arg420Gln	missense	SNV	1
KRAS	12	25378562	c.436G>A	p.Ala146Thr	missense	SNV	1
KRAS	12	25378647	c.351A>T	p.Lys117Asn	missense	SNV	1
KRAS	12	25380275	c.183A>C	p.Gln61His	missense	SNV	1
KRAS	12	25380276	c.182A>T	p.Gln61Leu	missense	SNV	1
KRAS	12	25380276	c.182A>G	p.Gln61Arg	missense	SNV	1
KRAS	12	25398284	c.35G>C	p.Gly12Ala	missense	SNV	1
KRAS	12	25398285	c.34G>A	p.Gly12Ser	missense	SNV	1
FLT3	13	28592642	c.2503G>C	p.Asp835His	missense	SNV	1
FLT3	13	28602329	c.2039C>T	p.Ala680Val	missense	SNV	1
FLT3	13	28602376	c.1992G>T	p.Met664Ile	missense	SNV	1
FLT3	13	28608320	c.1736T>C	p.Val579Ala	missense	SNV	1
FLT3	13	28608320	c.1736T>A	p.Val579Glu	missense	SNV	1
FLT3	13	28608329	c.1727T>C	p.Leu576Pro	missense	SNV	1
FLT3	13	28610138	c.1352C>T	p.Ser451Phe	missense	SNV	1
IDH2	15	90630725	c.761T>C	p.Ile254Thr	missense	SNV	1
SRSF2	17	74733073	c.170T>A	p.Phe57Tyr	missense	SNV	1
TP53	17	7577097	c.841G>T	p.Asp281Tyr	missense	SNV	1
TP53	17	7577099	c.839G>A	p.Arg280Lys	missense	SNV	1
TP53	17	7577120	c.818G>A	p.Arg273His	missense	SNV	1
TP53	17	7577121	c.817C>T	p.Arg273Cys	missense	SNV	1
TP53	17	7577124	c.814G>A	p.Val272Met	missense	SNV	1
TP53	17	7577570	c.711G>A	p.Met237Ile	missense	SNV	1
TP53	17	7578190	c.659A>G	p.Tyr220Cys	missense	SNV	1
TP53	17	7578502	c.428T>A	p.Val143Glu	missense	SNV	1
SF3B1	2	198267303	c.2054G>A	p.Ser685Asn	missense	SNV	1
SF3B1	2	198267359	c.1998G>T	p.Lys666Asn	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25457252	c.2635A>G	p.Asn879Asp	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25463239	c.2254T>C	p.Phe752Leu	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25463242	c.2251T>G	p.Phe751Val	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25463286	c.2207G>A	p.Arg736His	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25463524	c.2158C>T	p.Arg720Cys	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25464507	c.2006C>T	p.Ser669Phe	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25464525	c.1988C>T	p.Ser663Leu	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25467436	c.1640T>G	p.Leu547Arg	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25467437	c.1639C>T	p.Leu547Phe	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25467449	c.1627G>T	p.Gly543Cys	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25470480	c.994G>A	p.Gly332Arg	missense	SNV	1
ASXL1	20	31024704	c.4189G>A	p.Gly1397Ser	missense	SNV	1
RUNX1	21	36164611	c.1264G>A	p.Glu422Lys	missense	SNV	1
RUNX1	21	36231773	c.611G>A	p.Arg204Gln	missense	SNV	1
SF3A1	22	30735202	c.1414C>T	p.Arg472Trp	missense	SNV	1
VHL	3	10188233	c.376G>A	p.Asp126Asn	missense	SNV	1
TET2	4	106164069	c.3579T>G	p.Cys1193Trp	missense	SNV	1
TET2	4	106164767	c.3635T>C	p.Leu1212Ser	missense	SNV	1
TET2	4	106164913	c.3781C>T	p.Arg1261Cys	missense	SNV	1
TET2	4	106164916	c.3784C>T	p.Arg1262Trp	missense	SNV	1
TET2	4	106180865	c.3893G>A	p.Cys1298Tyr	missense	SNV	1
TET2	4	106190794	c.4072T>C	p.Cys1358Arg	missense	SNV	1
TET2	4	106190819	c.4097G>A	p.Arg1366His	missense	SNV	1
TET2	4	106197249	c.5582G>A	p.Gly1861Glu	missense	SNV	1
TET2	4	106197317	c.5650A>G	p.Thr1884Ala	missense	SNV	1
TET2	4	106197387	c.5720T>C	p.Met1907Thr	missense	SNV	1

Gen	Chr	Localización	Variante (nivel ADN)	Variante (nivel proteína)	Efecto	Tipo	Rep.
KIT	4	55575669	c.1195G>A	p.Val399Ile	missense	SNV	1
KIT	4	55589773	c.1255G>C	p.Asp419His	missense	SNV	1
KIT	4	55599320	c.2446G>T	p.Asp816Tyr	missense	SNV	1
KIT	4	55599321	c.2447A>T	p.Asp816Val	missense	SNV	1
KIT	4	55599340	c.2466T>A	p.Asn822Lys	missense	SNV	1
KIT	4	55599340	c.2466T>G	p.Asn822Lys	missense	SNV	1
EZH2	7	148506462	c.2050C>T	p.Arg684Cys	missense	SNV	1
EZH2	7	148506477	c.2035G>A	p.Val679Met	missense	SNV	1
JAK2	9	5126715	c.3323A>G	p.Asn1108Ser	missense	SNV	1
PHF6	X	133549122	c.806T>C	p.Leu269Pro	missense	SNV	1
PHF6	X	133549137	c.821G>A	p.Arg274Gln	missense	SNV	1
KDM6A	X	44929164	c.2264C>T	p.Thr755Met	missense	SNV	1

Nivel 2

TET2	4	106196819	c.5152G>T	p.Val1718Leu	missense	SNV	4
TET2	4	106156729	c.1630C>T	p.Arg544Ter	stop gained	SNV	2
TP53	17	7578485	c.445dup	p.Ser149PhefsTer32	frameshift insertion	InDel	1
TET2	4	106156747	c.1648C>T	p.Arg550Ter	stop gained	SNV	1
MPL	1	43818306	c.1771T>G	p.Tyr591Asp	missense	SNV	1
FLT3	13	28609758	c.1471G>T	p.Val491Leu	missense	SNV	1
ZRSR2	X	15841270	c.1354C>T	p.Arg452Cys	missense	SNV	1

Nivel 3

RUNX1	21	36231791	c.593A>G	p.Asp198Gly	missense	SNV	3
DNMT3A	2	25470497	c.977G>T	p.Arg326Leu	missense	SNV	2
KMT2A	11	118342946	c.1072G>T	p.Val358Phe	missense	SNV	1
KMT2A	11	118344507	c.2633G>A	p.Arg878Gln	missense	SNV	1
KMT2A	11	118366567	c.5507A>G	p.Asp1836Gly	missense	SNV	1
KMT2A	11	118374758	c.8142C>G	p.Ile2714Met	missense	SNV	1
KMT2A	11	118375783	c.9167C>T	p.Pro3056Leu	missense	SNV	1
KMT2A	11	118390369	c.11174A>T	p.Asp3725Val	missense	SNV	1
KMT2A	11	118392076	c.11578G>T	p.Gly3860Cys	missense	SNV	1
KMT2A	11	118392625	c.11648A>T	p.Tyr3883Phe	missense	SNV	1
SF1	11	64535106	c.1279C>T	p.Pro427Ser	missense	SNV	1
SF1	11	64537000	c.561G>T	p.Lys187Asn	missense	SNV	1
SF1	11	64537813	c.304C>T	p.Arg102Cys	missense	SNV	1
ETV6	12	12038908	c.1201T>G	p.Tyr401Asp	missense	SNV	1
KRAS	12	25380336	c.122G>A	p.Arg41Lys	missense	SNV	1
PRPF40B	12	50031516	c.1676G>C	p.Gly559Ala	missense	SNV	1
FLT3	13	28602342	c.2026A>C	p.Asn676His	missense	SNV	1
TP53	17	7579719	c.77T>C	p.Leu26Pro	missense	SNV	1
EPOR	19	11488844	c.1343C>A	p.Thr448Asn	missense	SNV	1
EPOR	19	11489085	c.1102T>C	p.Tyr368His	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25457162	c.2725T>C	p.Phe909Leu	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25462024	c.2383T>C	p.Trp795Arg	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25462063	c.2344G>A	p.Ala782Thr	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25464528	c.1985C>T	p.Ala662Val	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25464544	c.1969G>A	p.Val657Met	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25470467	c.1007T>C	p.Phe336Ser	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25470497	c.977G>A	p.Arg326His	missense	SNV	1
RUNX1	21	36206795	c.717C>G	p.Ser239Arg	missense	SNV	1
RUNX1	21	36252887	c.475A>G	p.Asn159Asp	missense	SNV	1
RUNX1	21	36259381	c.110G>T	p.Ser37Ile	missense	SNV	1
TET2	4	106180904	c.3932T>C	p.Leu1311Pro	missense	SNV	1
TET2	4	106190862	c.4140T>G	p.His1380Gln	missense	SNV	1
TET2	4	106197312	c.5645C>T	p.Ala1882Val	missense	SNV	1
TET2	4	106197333	c.5666C>T	p.Pro1889Leu	missense	SNV	1
TET2	4	106197359	c.5692T>A	p.Ser1898Thr	missense	SNV	1
EZH2	7	148511199	c.1703A>T	p.Lys568Ile	missense	SNV	1
EZH2	7	148512105	c.1573T>A	p.Tyr525Asn	missense	SNV	1
EZH2	7	148516756	c.931T>A	p.Tyr311Asn	missense	SNV	1
EZH2	7	148526859	c.445C>A	p.Leu149Ile	missense	SNV	1
EZH2	7	148544317	c.74G>C	p.Arg25Pro	missense	SNV	1
JAK2	9	5077492	c.1904A>G	p.Asp635Gly	missense	SNV	1

Gen	Chr	Localización	Variante (nivel ADN)	Variante (nivel proteína)	Efecto	Tipo	Rep.
PHF6	X	133549053	c.737C>T	p.Ser246Phe	missense	SNV	1
PHF6	X	133549140	c.824G>A	p.Gly275Glu	missense	SNV	1
ZRSR2	X	15836747	c.809T>C	p.Val270Ala	missense	SNV	1
KDM6A	X	44733223	c.215T>G	p.Leu72Arg	missense	SNV	1
KDM6A	X	44942752	c.3332G>T	p.Arg1111Leu	missense	SNV	1

Nivel 4

KMT2A	11	118344353	c.2479T>A	p.Phe827Ile	missense	SNV	1
FLT3	13	28609724	c.1505A>T	p.Asn502Ile	missense	SNV	1
SF3B1	2	198270040	c.1396T>A	p.Phe466Ile	missense	SNV	1
TET2	4	106194031	c.4493G>A	p.Arg1498His	missense	SNV	1
PHF6	X	133512050	c.154T>G	p.Leu52Val	missense	SNV	1
KDM6A	X	44966722	c.3946G>A	p.Glu1316Lys	missense	SNV	1

Nivel 5

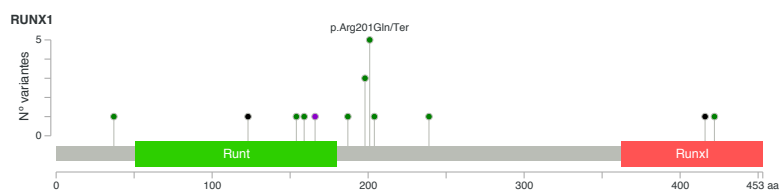
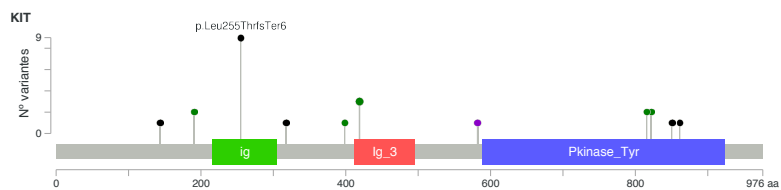
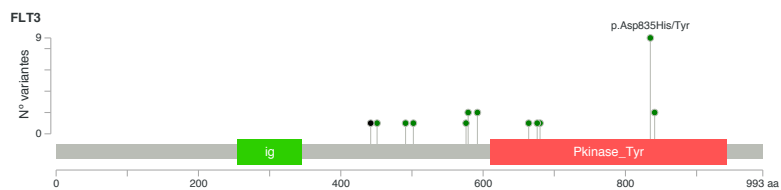
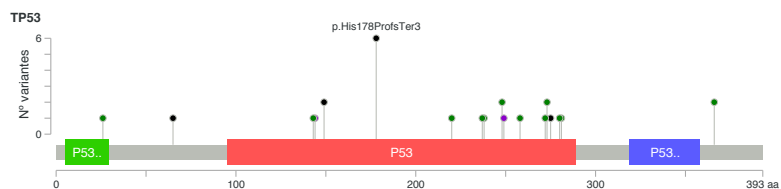
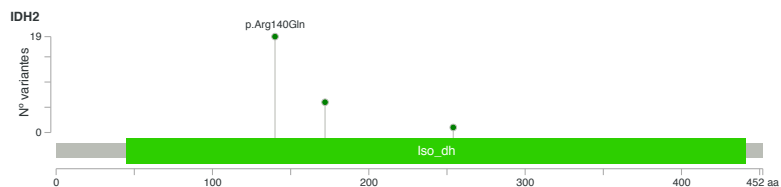
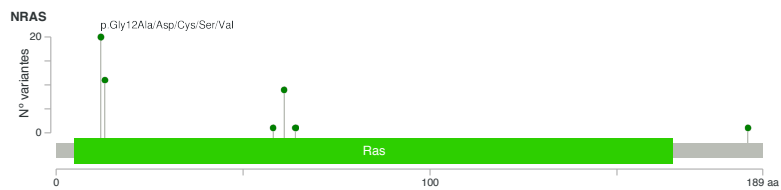
EPOR	19	11494811	c.73dup	p.Ala25GlyfsTer5	frameshift insertion	InDel	9
KIT	4	55569893	c.762dup	p.Leu255ThrfsTer6	frameshift insertion	InDel	9
VHL	3	10188307	c.450dup	p.Ile151TyrfsTer23	frameshift insertion	InDel	4
PTEN	10	89624271	c.45dup	p.Tyr16IlefsTer28	frameshift insertion	InDel	2
VHL	3	10188250	c.394del	p.Gln132LysfsTer27	frameshift deletion	InDel	1
CBL	11	119077247	c.121dup	p.His41ProfsTer40	frameshift insertion	InDel	1
CBL	11	119144725	c.737ins	p.Leu247ThrfsTer29	frameshift insertion	InDel	1
ETV6	12	11905411	c.61dup	p.Glu21GlyfsTer45	frameshift insertion	InDel	1
KRAS	12	25378603	c.395dup	p.Asp132GlufsTer12	frameshift insertion	InDel	1
FLT3	13	28610166	c.1324ins	p.Leu442ArgfsTer44	frameshift insertion	InDel	1
TP53	17	7578487	c.443ins	p.Ser149PhefsTer32	frameshift insertion	InDel	1
TP53	17	7579495	c.192dup	p.Arg65GlnfsTer84	frameshift insertion	InDel	1
EPOR	19	11494835	c.49ins	p.Leu17ArgfsTer13	frameshift insertion	InDel	1
VHL	3	10188235	c.378dup	p.Gly127TrpfsTer5	frameshift insertion	InDel	1
KIT	4	55564541	c.428ins	p.Thr144AspfsTer22	frameshift insertion	InDel	1
KIT	4	55573291	c.952ins	p.Met318ThrfsTer19	frameshift insertion	InDel	1
KIT	4	55602731	c.2552dup	p.Asp851GlufsTer28	frameshift insertion	InDel	1
KRAS	12	25378649	c.349A>T	p.Lys117Ter	stop gained	SNV	1
ASXL1	20	31022817	c.2302C>T	p.Gln768Ter	stop gained	SNV	1
ASXL1	20	31023159	c.2644C>T	p.Gln882Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106156690	c.1591C>T	p.Gln531Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106156862	c.1763C>G	p.Ser588Ter	stop gained	SNV	1
TET2	4	106157573	c.2474C>G	p.Ser825Ter	stop gained	SNV	1

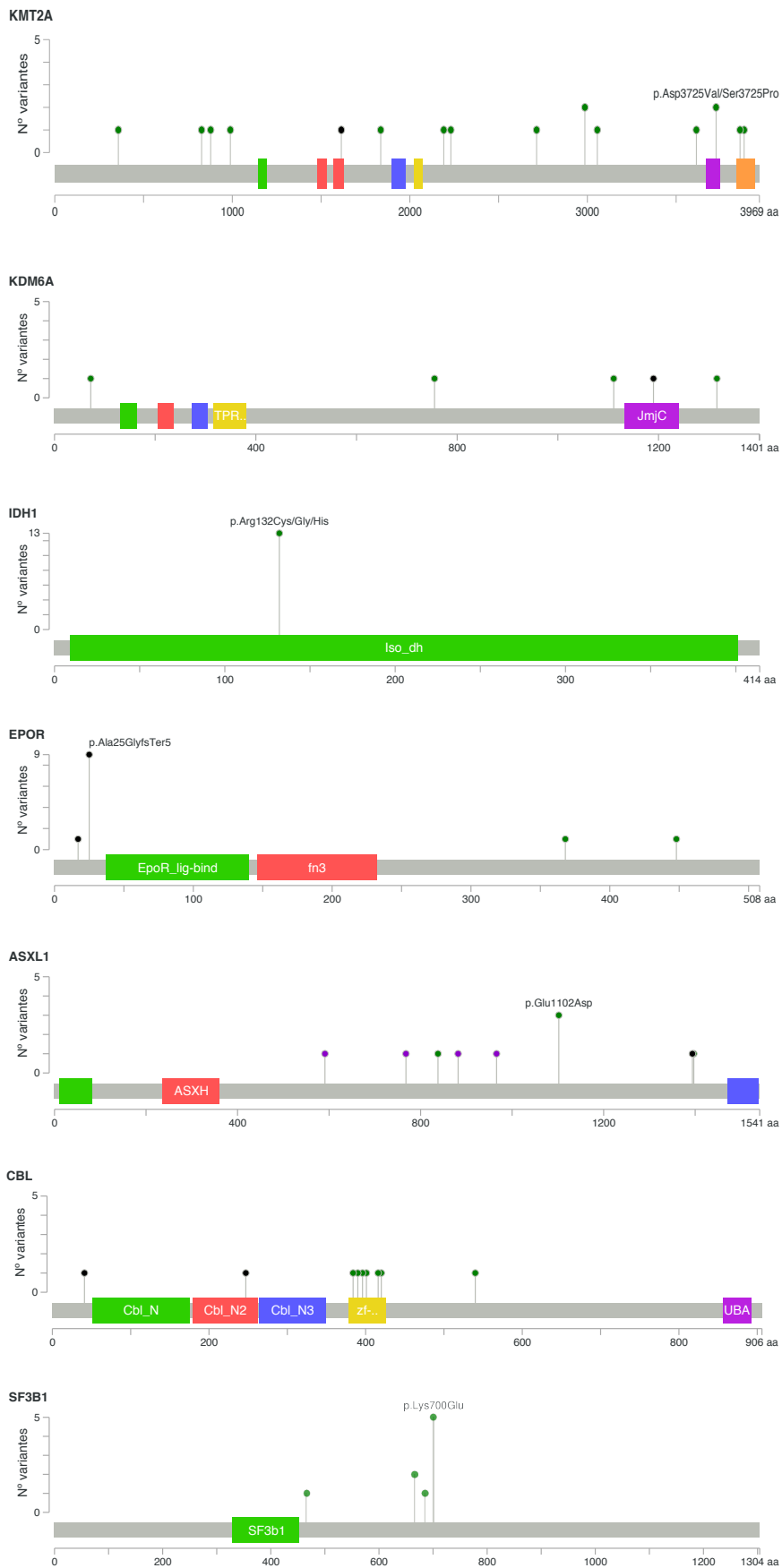
Nivel 6

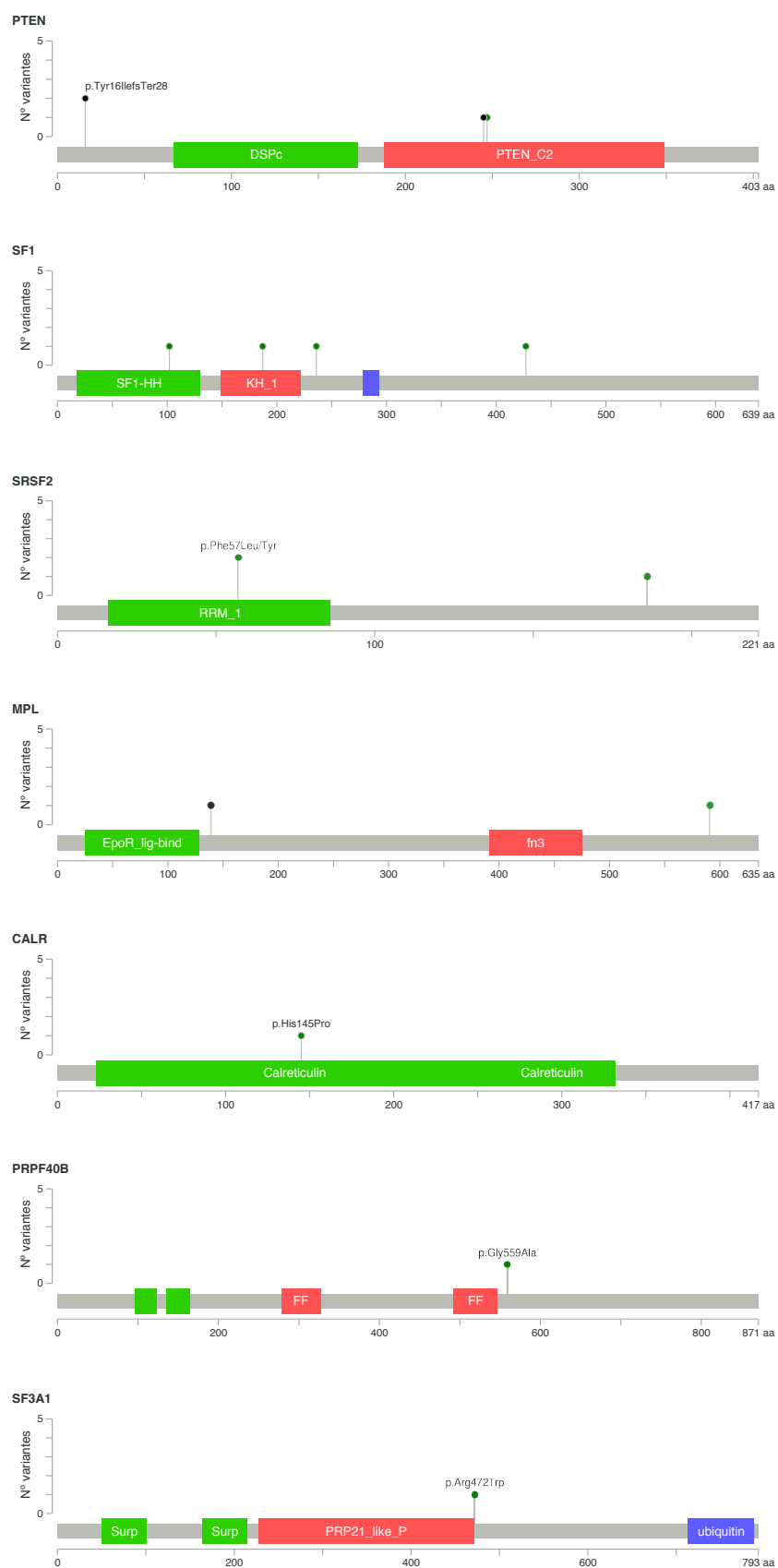
TET2	4	106155199	c.100C>T	p.Leu34Phe	missense	SNV	3
U2AF1	21	44514777	c.470A>G	p.Gln157Arg	missense	SNV	2
KIT	4	55564683	c.571G>A	p.Glu191Lys	missense	SNV	2
ZRSR2	X	15841063	c.1147C>G	p.Pro383Ala	missense	SNV	2
TP53	17	7577529	c.746del	p.Arg249del	inframe deletion	InDel	1
ASXL1	20	31023408	c.2894del	p.Gly966del	inframe deletion	InDel	1
ETV6	12	12038918	c.1212del	p.Asn405fs	frameshift deletion	InDel	1
TP53	17	7577112	c.825del	p.Cys275fs	frameshift deletion	InDel	1
TET2	4	106156423	c.1325del	p.Thr443fs	frameshift deletion	InDel	1
EZH2	7	148512614	c.1529del	p.Lys510fs	frameshift deletion	InDel	1
KIT	4	55593678	c.1744ins	p.Trp582ins	inframe insertion	InDel	1
DNMT3A	2	25469945	c.1096ins	p.Arg366fs	frameshift insertion	InDel	1
ASXL1	20	31024692	c.4178ins	p.Glu1394fs	frameshift insertion	InDel	1
RUNX1	21	36164627	c.1247ins	p.Phe416fs	frameshift insertion	InDel	1
RUNX1	21	36252994	c.367ins	p.Asp123fs	frameshift insertion	InDel	1
TET2	4	106155578	c.479ins	p.Lys161fs	frameshift insertion	InDel	1
TET2	4	106156986	c.1887ins	p.Ser631fs	frameshift insertion	InDel	1
KMT2A	11	118344839	c.2965C>T	p.Leu989Phe	missense	SNV	1
KMT2A	11	118373179	c.6572G>A	p.Arg2191Gln	missense	SNV	1
CBL	11	119148930	c.1150T>C	p.Cys384Arg	missense	SNV	1
CBL	11	119155953	c.1618C>T	p.Arg540Ter	missense	SNV	1
SF1	11	64537785	c.707A>G	p.Asn236Ser	missense	SNV	1
SRSF2	17	74732352	c.557G>T	p.Arg186Leu	missense	SNV	1

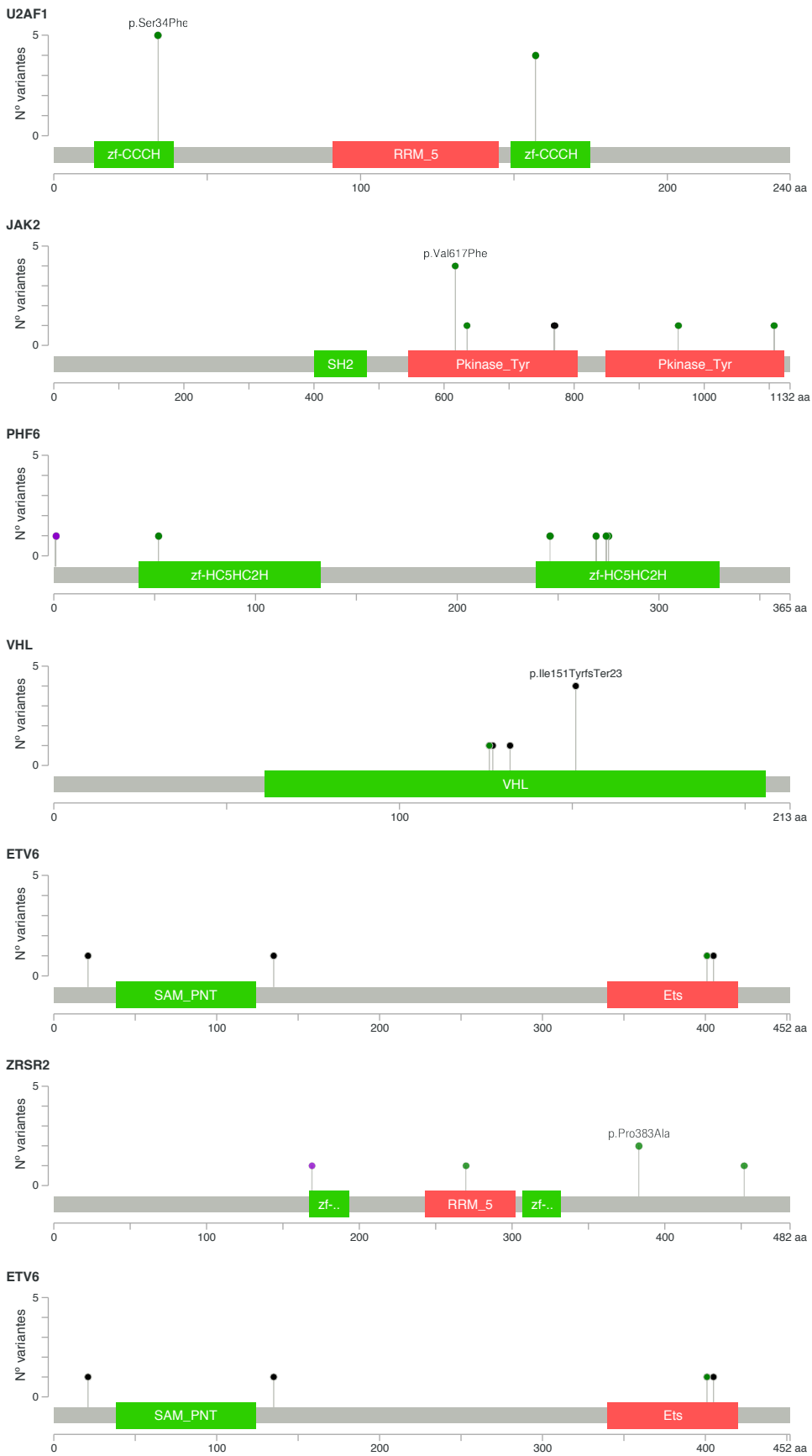
Gen	Chr	Localización	Variante (nivel ADN)	Variante (nivel proteína)	Efecto	Tipo	Rep.
SRSF2	17	74733074	c.169T>C	p.Phe57Leu	missense	SNV	1
TP53	17	7577509	c.772G>A	p.Glu258Lys	missense	SNV	1
TP53	17	7577568	c.713G>A	p.Cys238Tyr	missense	SNV	1
CALR	19	13050903	c.434A>C	p.His145Pro	missense	SNV	1
SF3B1	2	198267360	c.1997A>G	p.Lys666Arg	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25457281	c.2606G>T	p.Gly869Val	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25458595	c.2578T>C	p.Trp860Arg	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25458648	c.2525A>G	p.Gln842Arg	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25467143	c.1732G>T	p.Glu578Ter	missense	SNV	1
DNMT3A	2	25469073	c.1385C>A	p.Ala462Glu	missense	SNV	1
RUNX1	21	36231825	c.559G>A	p.Ala187Thr	missense	SNV	1
RUNX1	21	36252902	c.460C>T	p.Gln154Ter	missense	SNV	1
TET2	4	106197255	c.5588C>T	p.Ala1863Val	missense	SNV	1
EZH2	7	148507484	c.1970A>G	p.Asp657Gly	missense	SNV	1
JAK2	9	5090562	c.2878A>G	p.Ile960Val	missense	SNV	1
KMT2A	11	118390398	c.11203T>C	p.Ser3725Pro	missense	SNV	1
CBL	11	119149209	-	-	frameshift insertion	InDel	1
ETV6	12	12006437	c.405del	p.His135Ter	frameshift deletion	InDel	1
FLT3	13	28578331	-	-	frameshift deletion	InDel	1
FLT3	13	28588663	c.2785ins	-	frameshift insertion	InDel	1
FLT3	13	28592631	c.2514ins	-	frameshift insertion	InDel	1
ASXL1	20	31024751	c.4236A>G	p.Ser838Arg	missense	SNV	1

ANEXO 5. DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES EN LOS GENES







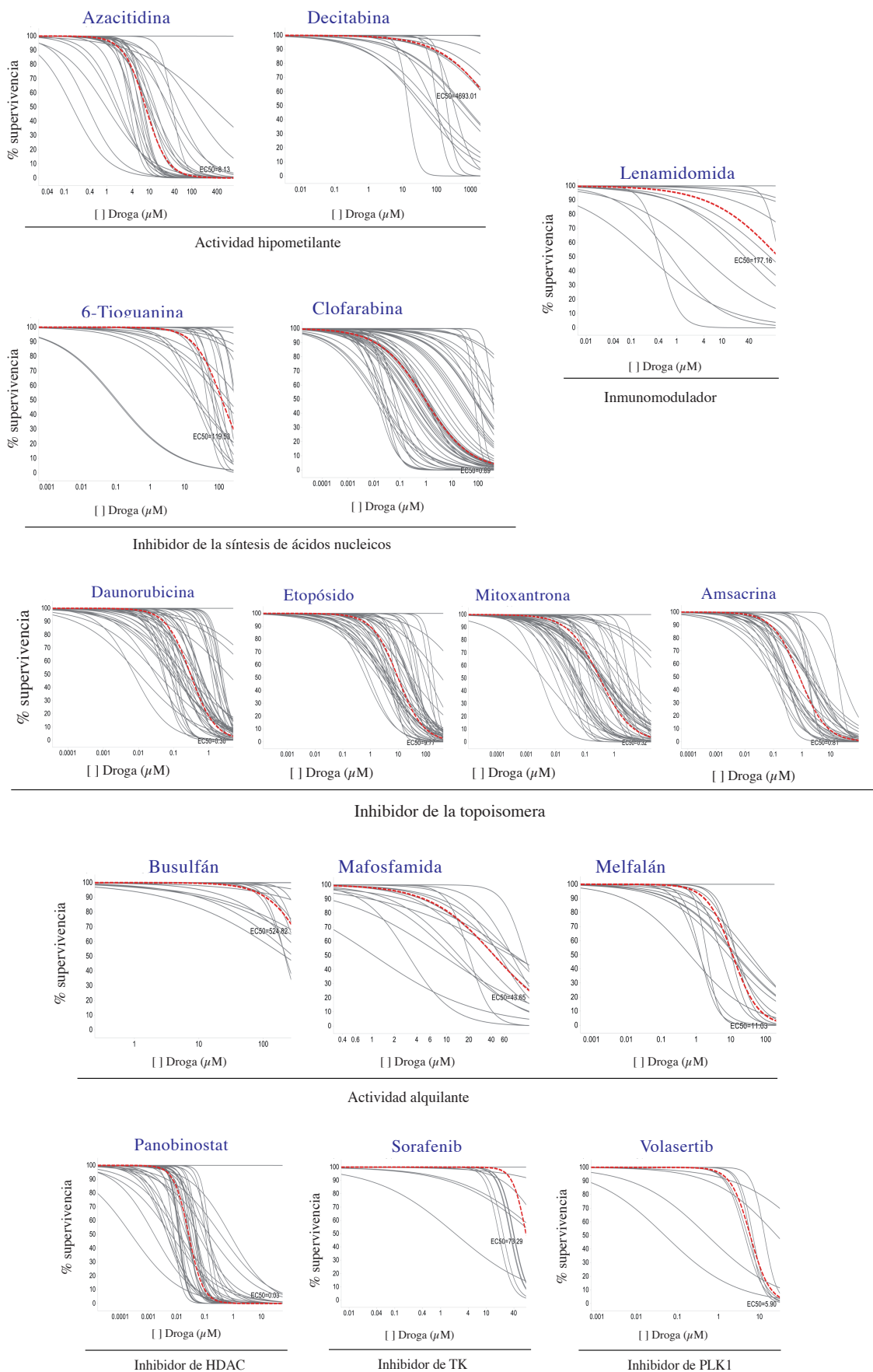


ANEXO 6. VARIANTES DETECTADAS EN EL ESTADOS DE FRACASO TERAPÉUTICO

Gen	Chr	Localización	Variante (nivel ADN)	Variante (nivel proteína)	Efecto	Tipo
ZRSR2	X	15841230	c.1314insAGCCGG	p.Gly438_Ser439insSerArg	nonframeshiftInsertion	InDel
VHL	3	10188307	c.450dup	p.Ile151TyrfsTer23	frameshift_insertion	InDel
U2AF1	21	44514777	c.470A>G	p.Gln157Arg	missense	SNV
TP53	17	7573931	c.1096T>G	p.Ser366Ala	missense	SNV
TP53	17	7577097	c.841G>T	p.Asp281Tyr	missense	SNV
TP53	17	7577099	c.839G>A	p.Arg280Lys	missense	SNV
TP53	17	7578413	c.517G>A	p.Val173Met	missense	SNV
TP53	17	7578398	c.532dup	p.His178ProfsTer3	frameshift_insertion	InDel
TP53	17	7577112	c.825del	p.Cys275fs	frameshift_deletion	InDel
TET2	4	106157845	c.2746C>T	p.Gln916Ter	stop_gained	SNV
TET2	4	106164767	c.3635T>C	p.Leu1212Ser	missense	SNV
TET2	4	106164913	c.3781C>T	p.Arg1261Cys	missense	SNV
TET2	4	106164032	c.3543del	p.Tyr1182fs	frameshift_insertion	InDel
SRSF2	17	74733073	c.170T>A	p.Phe57Tyr	missense	SNV
SF3B1	2	198267303	c.2054G>A	p.Ser685Asn	missense	SNV
SF3B1	2	198266834:T/C	c.2098A>G	p.Lys700Glu	missense	SNV
SF3B1	2	198270040	c.1396T>A	p.Phe466Ile	missense	SNV
SF3A1	22	30733135	c.1985insC	p.Ala663fs	frameshift_insertion	InDel
RUNX1	21	36164627	c.1247ins	p.Phe416LeufsTer185	frameshift_insertion	InDel
RUNX1	21	36231773	c.611G>A	p.Arg204Gln	missense	SNV
RUNX1	21	36231791	c.593A>G	p.Asp198Gly	missense	SNV
PTEN	10	89624271	c.45dup	p.Tyr161IlefsTer28	frameshift_insertion	InDel
PRPF40B	12	50031516	c.1676G>C	p.Gly559Ala	missense	SNV
PHF6	X	133549140	c.824G>A	p.Gly275Glu	missense	SNV
NRAS	1	115256528	c.183A>C	p.Gln61His	missense	SNV
NRAS	1	115258744	c.38G>A	p.Gly13Asp	missense	SNV
NRAS	1	115258745	c.37G>T	p.Gly13Cys	missense	SNV
NRAS	1	115258747	c.35G>A	p.Gly12Asp	missense	SNV
MPL	1	43818306	c.1771T>G	p.Tyr591Asp	missense	SNV
KRAS	12	25398285	c.34G>A	p.Gly12Ser	missense	SNV
KRAS	12	25378603	c.395dup	p.Asp132GlufsTer12	frameshift_insertion	InDel
KMT2A	11	118343378	c.1505A>T	p.Asn502Ile	missense	SNV
KMT2A	11	118344081	p.Arg736Met	c.2207G>T	missense	SNV
KMT2A	11	118352769	c.3974G>A	p.Ser1325Asn	missense	SNV
KMT2A	11	118374758	c.8142C>G	p.Ile2714Met	missense	SNV
KMT2A	11	118377003	c.10396A>G	p.Thr3466Ala	missense	SNV
KIT	4	55604640	c.2848G>A	p.Val950Met	missense	SNV
KIT	4	5558977	c.1253_1255delACG	p.Asp419del	frameshiftDeletion	InDel
KIT	4	55602762	c.2583dup	p.Leu862AlafsTer17	frameshift_insertion	InDel
KDM6A	X	44733223	c.215T>G	p.Leu72Arg	missense	SNV
JAK2	9	5073770	c.1849G>T	p.Val617Phe	missense	SNV
JAK2	9	5126715	c.3323A>G	p.Asn1108Ser	missense	SNV
JAK2	9	5080558	c.2308_2309insT	p.His770LeufsTer17	frameshift_insertion	InDel
IDH2	15	90631838	c.515G>A	p.Arg172Lys	missense	SNV
IDH2	15	90631934	c.419G>A	p.Arg140Gln	missense	SNV
IDH2	15	90631935	c.418C>T	p.Arg140Trp	missense	SNV
IDH1	2	209113113	c.394C>T	p.Arg132Cys	missense	SNV
FLT3	13	28592623	c.2522A>T	p.Asn841Ile	missense	SNV
FLT3	13	28592642	c.2503G>T	p.Asp835Tyr	missense	SNV
FLT3	13	28609724	c.1505A>T	p.Asn502Ile	missense	SNV
FLT3	13	2861015	c.1337C>T	p.Ser446Leu	missense	SNV
FLT3	13	28610153	c.1337C>T	p.Ser446Leu	missense	SNV
EZH2	7	148506462	c.2050C>T	p.Arg684Cys	missense	SNV
EZH2	7	148512096	c.1582T>C	p.Cys528Arg	missense	SNV

Gen	Chr	Localización	Variante (nivel ADN)	Variante (nivel proteína)	Efecto	Tipo
EZH2	7	148516756	c.931T>A	p.Tyr311Asn	missense	SNV
ETV6	12	12038908	c.1201T>G	p.Tyr401Asp	missense	SNV
ETV6	12	12038918	c.1212del	p.Asn405fs	frameshift_deletion	InDel
EPOR	19	11488844	c.1343C>A	p.Thr448Asn	missense	SNV
EPOR	19	11494811	c.73dup	p.Ala25GlyfsTer5	frameshift_insertion	InDel
EPOR	19	11494835	c.49_50insG	p.Leu17ArgfsTer13	frameshift_insertion	InDel
DNMT3A	2	25457243	c.2644C>T	p.Arg882Cys	missense	SNV
DNMT3A	2	25457252	c.2635A>G	p.Asn879Asp	missense	SNV
DNMT3A	2	25470497	c.977G>T	p.Arg326Leu	missense	SNV
DNMT3A	2	25469945	c.1096ins	p.Arg366fs	frameshift_insertion	InDel
DNMT3A	2	25463290	c.2202_2203del	p.Phe734LeufsTer6	frameshift_deletion	InDel
CBL	11	119103319	c.357G>A	p.Met119Ile	missense	SNV
CBL	11	119149209			intron_variant	InDel
CBL	11	119077179	c.56dup	p.Ser20LeufsTer61	frameshift_insertion	InDel
CALR	19	13054627	c.1154insTTGTC	p.Lys385fs	frameshift_insertion	InDel
ASXL1	20	31023403	c.2888C>T	p.Pro963Leu	missense	SNV
ASXL1	20	31023821	c.3306G>T	p.Glu1102Asp	missense	SNV
ASXL1	20	31023408	c.2894del	p.Gly966del	inframe_deletion	InDel

ANEXO 7. CURVAS DOSIS-RESPUESTA



PUBLICACIONES



Novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia

by Esther Onecha, Maria Linares, Inmaculada Rapado, Yanira Ruiz-Heredia, Pilar Martinez-Sanchez, Teresa Cedena, Marta Pratcorona, Jaime Perez Oteyza, Pilar Herrera, Eva Barragan, Pau Montesinos, Jose Antonio Garcia Vela, Elena Magro, Eduardo Anguita, Angela Figuera, Rosalia Riaza, Pilar Martinez-Barranco, Beatriz Sanchez-Vega, Josep Nomdedeu, Miguel Gallardo, Joaquin Martinez-Lopez, and Rosa Ayala

Haematologica 2018 [Epub ahead of print]

Citation: Esther Onecha, Maria Linares, Inmaculada Rapado, Yanira Ruiz-Heredia, Pilar Martinez-Sanchez, Teresa Cedena, Marta Pratcorona, Jaime Perez Oteyza, Pilar Herrera, Eva Barragan, Pau Montesinos, Jose Antonio Garcia Vela, Elena Magro, Eduardo Anguita, Angela Figuera, Rosalia Riaza, Pilar Martinez-Barranco, Beatriz Sanchez-Vega, Josep Nomdedeu, Miguel Gallardo, Joaquin Martinez-Lopez, and Rosa Ayala. Novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia.

Haematologica. 2018; 103:xxx

doi:10.3324/haematol.2018.194712

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia

AUTHORS

Esther Onecha,^{1,2} Maria Linares,^{1,2} Inmaculada Rapado,^{1,2,3} Yanira Ruiz-Heredia,^{1,2} Pilar Martinez-Sanchez,¹ Teresa Cedena,^{1,2,3,4} Marta Pratcorona,⁵ Jaime Perez Oteyza,⁶ Pilar Herrera,⁷ Eva Barragan,^{4,8} Pau Montesinos,^{4,8} Jose Antonio Garcia Vela,⁹ Elena Magro,¹⁰ Eduardo Anguita,¹¹ Angela Figuera,¹² Rosalia Riaza,¹³ Pilar Martinez-Barranco,¹⁴ Beatriz Sanchez-Vega,^{1,2} Josep Nomdedeu,⁵ Miguel Gallardo,^{2*} Joaquin Martinez-Lopez,^{1,2,3,4*} and Rosa Ayala^{1,2,3,4*}

*M.G., J.M-L. and R.A. contributed equally to this study

RUNNING HEAD

Deep sequencing method for MRD monitoring in AML

AUTHORS AND AFFILIATIONS

¹Hematology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ²Hematological Malignancies Clinical Research Unit, CNIO, Madrid, Spain; ³CIBERONC, Spain; ⁴Complutense University, Madrid, Spain; ⁵Hematology Department, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁶Hematology Department, Hospital Universitario Sanchinarro, Madrid, Spain; ⁷Hematology Department, Hospital Universitario Ramon y Cajal, Madrid, Spain; ⁸Hematology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ⁹Department of Hematology, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain; ¹⁰Hematology Department, Hospital Universitario Principe de Asturias, Madrid, Spain; ¹¹Hematology Department, Hospital Clínico San Carlos, IdISSC, UCM, Madrid, Spain; ¹²Hematology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain; ¹³Hematology Department, Hospital Universitario Severo Ochoa, Madrid, Spain; ¹⁴Hematology Department, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid, Spain.

CORRESPONDING AUTHOR

Rosa Ayala, MD, PhD
Hematology Department
Hospital Universitario 12 de Octubre
Edificio de Atención Ambulatoria, Planta 6 Bloque D
Avenida de Córdoba s/n, 28041, Madrid, Spain
Email: rosam.ayala@salud.madrid.org
Phone: +34 91 779 27 88
Fax: +34 91 390 80 00

SCIENTIFIC CATEGORY

Acute myeloid leukemia

KEYWORDS

Acute myeloid leukemia, sequencing, minimal residual disease

Word count: 2931

Abstract word count: 237

Figures and tables: 4 figures, 2 tables

References: 37

Funding

CRIS against Cancer foundation and ISCIII

Abstract

A high proportion of patients with acute myeloid leukemia who achieve minimal residual disease negative status ultimately relapse because a fraction of pathological clones remains undetected by standard methods. We designed and validated a high-throughput sequencing method for minimal residual disease assessment of cell clonotypes with mutations of *NPM1*, *IDH1/2* and/or *FLT3*-SNV. For clinical validation, 106 follow-up samples from 63 patients in complete remission were studied by sequencing, evaluating the level of mutations detected at diagnosis. The predictive value of minimal residual disease status by sequencing, multiparameter flow cytometry, or quantitative PCR was determined by survival analysis. The method achieved a sensitivity of 10^{-4} for single nucleotide variant and 10^{-5} for insertions/deletions and could be used in acute myeloid leukemia patients who carry any mutation (86% in our diagnosis data set). Sequencing-determined minimal residual disease positive status was associated with lower disease-free survival (hazard ratio 3.4, $p=0.005$) and lower overall survival (hazard ratio 4.2, $p<0.001$). Multivariate analysis showed that minimal residual disease positive status by sequencing was an independent factor associated with risk of death (hazard ratio 4.54, $p=0.005$) and the only independent factor conferring risk of relapse (hazard ratio 3.76, $p=0.012$). This sequencing-based method simplifies and standardizes minimal residual disease evaluation, with high applicability in acute myeloid leukemia. It also improves upon flow cytometry and quantitative PCR to predict acute myeloid leukemia outcome and could be incorporated in clinical settings and clinical trials.

Introduction

Cytogenetic and molecular alterations at diagnosis and response to treatment are the most useful criteria to predict relative risk of relapse in acute myeloid leukemia (AML), and to guide the choice between chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in first complete remission (CR).⁽¹⁾ The definition of CR for AML includes criteria for the identification of patients with poor prognosis using cytomorphological methods.⁽²⁾ But, these studies do not have a good predictive value because most of the CR cases relapse within 3 years of diagnosis.⁽³⁾

Assessment of minimal residual disease (MRD) is critical in monitoring patients in morphological remission, to inform decisions about further therapy.⁽¹⁾ Indeed, several studies have reported MRD status as a stronger predictor of relapse, because patients who are MRD negative have a better prognosis than those who are MRD positive.^(4, 5) In support of this, recent non-randomized studies from prospective multicenter trials suggested better outcomes when leukemia therapy was selected based on the results of MRD assessment.⁽⁶⁻⁸⁾

AML is, nevertheless, a biologically complex and heterogeneous disease, which makes MRD testing challenging when compared with other hematological neoplasms such as acute lymphoblastic leukemia or multiple myeloma. The detection of very low levels of MRD by conventional methods such as quantitative (q)-PCR or multiparameter flow cytometry (MFC) provides powerful independent prognostic information. Unfortunately, as described for cytomorphological CR, many patients who achieve MRD negative status relapse as a result of the progression of undetected leukemic cells. The most common method for MRD detection is MFC, with intermediate applicability (70–80%) and limited sensitivity.^(9, 10) However, there is no consensus on multi-antibody panels with regards to inter-laboratory performance, and the technique requires a high level of expertise. The other principal MRD monitoring method, qPCR, has good sensitivity (10^{-4} – 10^{-6}), but its applicability is limited in up to 40% of patients who present molecular alterations (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11* or *NPM1*) at diagnosis.⁽¹¹⁾

For the above reasons, new methods with higher sensitivity, specificity, applicability and performance are needed for MRD assessment in AML. Against this background, next-generation sequencing (NGS) and digital PCR (dPCR) have recently emerged as potentially promising platforms to assess MRD.⁽¹²⁾ Here, we optimized and clinically validated a new deep targeted NGS-based method, supported with dPCR technical validation, for MRD detection and quantification (both small insertion/deletions [InDels] and single

nucleotide variants [SNVs]) in AML patients, in an attempt to improve and/or complement the current MRD evaluation techniques, and to establish its potential as a predictor of patient outcome.

Methods

More detailed information can be found in the *Online Supplementary data (1–6)*.

Patients and samples

One hundred and ninety patients with *de novo* or secondary non-M3 AML were included in mutational profile screening at diagnosis. We performed a new selection for retrospective MRD assessment using the following criteria: presence of the *NPM1* type A mutation, or SNVs in *FLT3*, *IDH1* and/or *IDH2* at diagnosis, and availability of at least one follow-up genomic (g)-DNA sample.

The MRD approach included 51 (48%) follow-up samples taken at post-induction, and 55 (52%) at post-consolidation time, corresponding to 63 patients diagnosed between 2006 and 2016 (for selection criteria see *Online Supplementary 6* and *Supplementary Table S1*). Patients were treated according to PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología) or CETLAM (Grupo cooperativo de Estudio y Tratamiento de Leucemias Agudas y Mielodisplasias) protocols. The study was conducted according to the Spanish law 14/2007 of biomedical research, and was approved by the Research Ethics Board of each participating institution. All patients provided informed consent. The main clinical characteristics of patients are summarized in Table 1. All patients achieved CR by cytomorphological criteria after induction therapy (<5% of bone marrow blasts).

To construct calibration curves, commercial (Horizon Discovery, UK) reference standard gDNA was used for somatic SNVs in *IDH1* (R132C) and *IDH2* (R172K). As a further source of gDNA, we used the OCI-AML3 cell line (ACC 582, DSMZ, Germany) with the *NPM1* type A mutation (c.863_864insCCTG) to examine InDels. As OCI-AML3 cells also present a SNV in *DNMT3A* (R882C), this was included only for technical optimization.

Deep targeted sequencing workflow

The sequencing workflow included one first study at diagnosis and a second study at follow-up. Mutational profile screening at diagnosis was done with a custom NGS myeloid panel of 32 genes frequently mutated in myeloid diseases,⁽¹³⁾ (*Online Supplementary Table S2*) and *NPM1* analysis was carried out with qPCR.⁽¹⁴⁾

The specific mutations detected at diagnosis were studied at follow-up. A variety of experimental steps were first tested to define optimal conditions (*Online Supplementary 1*). We established an optimal protocol (Figure 1) that included DNA amplification, library preparation and sequencing as experimental steps (*Online Supplementary 2*).

Libraries were sequenced on the Ion Proton System platform (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) with an estimated depth $\geq 1,000,000$ of reads, generating .fastq files. These files were analyzed using a custom bioinformatic pipeline; which leads from the .fastq file and a .csv file that contains information about name identifier, run and barcode identifier, chromosomal position and the variant detected in the diagnosis to be evaluated in the follow-up sample. Through Ensembl Perl API,⁽¹⁵⁾ the aligned mutated sequence and the aligned wild type (wt) sequence are presented in FASTA format (sequences of 40 bp). Finally, we obtained a .csv file containing the name identifier, run and barcode identifier, chromosomal position, the variant, the specific target sequence in FASTA format (mutated forward, mutated reverse, wt forward and wt reverse), the counts of each and the ratio (mutated/wt) in absolute values.

Results

A high percentage of AML patients could benefit from deep sequencing MRD approach

In total, 211 (80%) SNVs and 46 (20%) InDels were detected in the 190 patients analyzed at diagnosis using the NGS custom panel. We detected one variant (SNV or InDel) in 48 (25%) cases, 2 or more variants in

116 (61%) cases and no variants in 26 (14%) cases. In addition, we detected the *NPM1* type A mutation in 53 (28%) patients by qPCR. Genes (*TET2*, *ASXL1*, or *DNMT3A*) with evidence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) association were excluded from the analysis.⁽¹¹⁾ Consequently, 82% of patients in our cohort could benefit from this approach.

Based on those genes reported as potential markers to monitor MRD,⁽¹⁶⁾ and also the availability of follow-up samples, we focused on *IDH1/2* and *FLT3*-SNV. We identified at diagnosis *IDH1* mutations in 13 patients (7%), *IDH2* mutations in 27 patients (14%) and *FLT3*-SNV mutations (18%) in 34 patients.

Deep sequencing MRD has a sensitivity of 10⁻⁴ for SNVs and 10⁻⁵ for InDels

To establish the limit of quantification (LOQ) of the method, we used 10-fold serial dilutions of mixed mutated and control DNA. To study prototype InDels, we used gDNA from OCI-AML3 cells (*NPM1* type A) and to study prototype SNVs, we used both gDNA from OCI-AML3 cells (*DNMT3A*) and commercial reference gDNA (*IDH1/IDH2*). As a control, we used a pool of gDNA from ten individuals without somatic mutations in these chromosomal regions. In all cases, initial allele frequency was 50% and a total of six dilutions were carried out to construct a calibration curve, covering a theoretical dynamic range from 10⁻¹ to 10⁻⁷.

As shown in Figure 2A, B, MRD NGS testing of *NPM1* (InDel) could quantify one mutated cell in the order of 10⁻⁵, and in the case of SNVs (*IDH1*, *IDH2* and *DNMT3A*) the LOQ was 10⁻⁴, which was reproducible for all SNVs tested.

NGS is more sensitive than dPCR for MRD testing

We compared the sensitivity of sequencing with that of dPCR using the same LOQ dilution protocol. Clone frequency expressed as target concentration (mutated copies/μL in wt copies/μL) gradually decreased with each dilution, reaching an LOQ of 10⁻³ for *NPM1*, *IDH1* and *IDH2* (Figure 2C–D). While both methods showed similar detection limits and good linearity, the LOQ for the sequencing method was one order of magnitude higher than that for dPCR (*IDH1* and *IDH2*), and two orders of magnitude higher for InDels (*NPM1*).

MRD status tested by sequencing has prognosis impact in AML

Median of depth coverage was 401,300 aligned reads (interquartile range 195,100–825,700) for the 88 *NPM1* and 18 SNV (9 *IDH1*, 7 *IDH2*, and 2 *FLT3*) follow-up samples evaluated. We detected no mutated sequence in 13 (12%) samples, 1–5 mutated sequences in 19 (18%) samples, and more than 10 in 74 (70%) samples. The ratio of mutated sequences to wt sequences defined MRD levels. Considering MRD levels from the 106 samples evaluated we established the optimal cutoff to classify MRD status (positive vs negative) by ROC curves (*Online Supplementary Figure S1*) at each check-point of MRD evaluation (post-induction [n=51], post-consolidation [n=55], or both together [n=106]).

Survival analysis revealed that positive MRD status (MRD levels > 0.1%) at post induction (n=35) was associated with a significantly lower rate of overall survival (OS) (33% vs. 78%; hazard ratio [HR]: 3.5; 95% confidence interval [CI]: 1.1–10.7; p=0.019), but a non-significant lower rate of disease-free survival (DFS) (58% vs. 78%; HR: 2.18; 95%CI: 0.63–7.5; p=0.208) (Figure 3A, B). At post-consolidation (n=28), MRD positive status (MRD levels > 0.025%) was associated both with significantly shorter OS (33% vs. 81%; HR: 6.0; 95% CI: 1.3–28.7; p<0.001), and significantly shorter DFS (17% vs. 94%; HR: 19.6; 95% CI: 2.5–155.6; p<0.001) (Figure 3C, D). Also, survival analysis was performed combining post-induction and post-consolidation (n=63), in order to compare survival analysis with MFC and qPCR data sets. We observed that positive MRD status (MRD levels > 0.035%) was associated with a higher risk of relapse (48% vs. 81%; HR: 3.4; 95% CI: 1.4–8.5; p=0.005) and death (37% vs. 81%; HR: 4.2; 95% CI: 1.6–10.7; p<0.001) (Figure 3E, F). In order to test the power of *NPM1* and SNVs as independent predictive markers, we performed the analysis separately. Evaluating *NPM1* as an MRD marker (n=54), we found that MRD positive status was associated both with significantly shorter OS (43% vs. 78%; HR: 3.3; 95%CI: 1.2–8.8; p=0.011), and shorter DFS (57% vs. 85%; HR: 2.9; 95%CI: 0.9–7.6; p=0.052), and the similar results are found when we evaluated *IDH1*, *IDH2* or *FLT3*-SNV as MRD markers (n=11). Accordingly, MRD positive

status was associated both with significantly shorter OS (17% vs. 100%; HR: NA; p=0.041), and shorter DFS (17% vs. 75%; HR:6.3; 95%CI:0.7–54; p=0.058).

In univariate Cox analysis (Table 2A), the risk of death was significantly higher in patients with increased age (HR: 1.04; p=0.013), those with *FLT3*-ITD (HR: 3.45; p=0.007), and those with MRD positive status tested by NGS (HR: 4.22; p=0.002). Risk of relapse was significantly higher only in those patients with MRD positive status tested by NGS (HR: 3.4; p=0.008). In multivariate analysis (Table 2B), the risk of death was significantly higher in patients with increased age (HR: 1.05; p=0.004), those with mutated *FLT3*-ITD (HR: 8.87; p=0.001), and those with MRD positive status tested by NGS (HR: 4.54; p=0.005). The risk of relapse was higher only in patients MRD positive patients tested by NGS (HR: 3.76; p=0.012).

MRD tested by sequencing improves prediction of OS and DFS over MFC and qPCR

A positive correlation was found when comparing MRD assessment by NGS vs MFC ($r=0.47$, $p=0.005$, $n=75$), and NGS vs qPCR ($r=0.62$, $p<0.001$, $n=80$) (*Online Supplementary Figure S2*). There were differences between positive MRD and negative MRD groups of patients tested by MFC, but they were not significant for OS ($p=0.193$) or DFS ($p=0.117$) ($n=46$, Figure 4A). Similarly, differences were observed between positive MRD and negative MRD groups by qPCR of *NPM1*, although significance was not reached for OS ($p=0.212$) or DFS ($p=0.086$) ($n=46$, Figure 4B).

Discussion

We have optimized and validated a high sensitivity NGS method to detect and quantify *NPM1*, *IDH1*, *IDH2* and *FLT3*-SNV mutated sequences at very low allele frequency in follow-up gDNA samples. NGS has demonstrated prognostic value for pre-treatment status in patients with AML,⁽¹⁷⁾ and may also be a useful tool to detect MRD.^(18, 19) We first studied the mutational profile of patients with AML using a custom NGS panel to ensure a high applicability (82% of patients). This approach is also a useful screening method to detect all potential MRD markers and to choose those most relevant. The combination of several markers is possible and recommended to overcome limitations of MRD assessment that are due to sub-clonal heterogeneity of AML and to CHIP.⁽¹¹⁾ Accordingly, our method has the capacity to evaluate multiple markers simultaneously and, considering that 61% of patients in our cohort had two or more genetic alterations this approach is sufficiently robust to monitor MRD in patients even if they present clonal evolution.

Reported variants associated with CHIP are frequently located in *DNMT3A*, *TET2* or *ASXL1* genes, and are detected at the preleukemic phase and at complete AML remission.⁽²⁰⁻²³⁾ Indeed, any gene could carry both CHIP and non-CHIP variants, and these should be evaluated for each patient. Moreover, studies have shown that genes related to CHIP (*IDH1/2*) are useful for predicting prognosis because in these cases the genetic alterations have been acquired in the leukemic clone and not before.⁽²⁴⁾

The sensitivity achieved with this method equates to one mutated cell per 100,000 cells (LOQ 10^{-5}) for *NPM1* and one mutated cell per 10,000 cells (LOQ 10^{-4}) for *IDH1*, *IDH2* and *FLT3*-SNV. This difference in sensitivity is related to the fact that the *NPM1* type A (insCCTG) mutation is rarely generated erroneously by NGS, and the quantification is precise.

Our method, as with any NGS method, has an intrinsic error rate that limits its sensitivity for most SNVs to 1–2% of all reads. This limitation can nevertheless be overcome by virtue of the scalable nature of NGS.⁽¹⁶⁾ Thus, we boosted NGS sensitivity by increasing the amount of DNA by PCR prior to sequencing, which increased the depth of coverage to one million reads. By also optimizing the bioinformatic analysis, we focused the search for the precise variant in order to eliminate random sequencing errors, enhancing the specificity of the technique and reducing the computational time. To the best of knowledge, our NGS method presents possibly the highest sensitivity reported for NGS in AML.^(18, 19, 24-27)

dPCR is a relatively novel technique for precise and absolute quantification of nucleic acids, which is based on limiting partitions of the PCR volume and Poisson statistics.⁽²⁸⁾ It is also an extremely sensitive technique, with a high specificity due to the detection of mutant alleles.⁽²⁹⁾ However, when we compared the same standard dilutions in NGS and dPCR, NGS afforded a 2-log increment in LOQ for InDels (*NPM1*) and a 1-log increment for SNVs (*IDH1/2*), with the sensitivity of dPCR for InDels similar to that reported in a previously published study (10⁻²).⁽³⁰⁾ Compared with NGS, dPCR is a faster measurement technique but, as it is focused, it requires allele-specific primers that can complicate the experimental procedure, and a high number of parallel experiments are needed to raise the sensitivity, increasing the cost of the assay. Additionally, although it is possible to multiplex dPCR, unfortunately only a few targets can be monitored simultaneously within each sample.⁽²⁹⁾ Another advantage of NGS technology is that it does not require calibration curves in each assay, and the results are reported in absolute values, facilitating its standardization.

The NGS method described in this report showed comparable sensitivities (10⁻⁴ for SNVs and 10⁻⁵ for InDels) to MFC methods in those cases with immunophenotypically aberrant populations.^(10, 31) Although our method showed a similar sensitivity to that of qPCR, it does not require oligonucleotides that hybridize specifically to a particular sequence, so all nucleotides in the amplified region can be studied. Consequently, the NGS test is capable of detecting all *NPM1* subtype mutations in the same assay.

We found positive correlations when MRD levels were evaluated by NGS vs MFC and vs qPCR, but not with the expected results. In the case of MFC, this could be explained, in part, because *NPM1* mutations are usually associated with monocytic subtype-AML, which frequently presents more difficulties for identifying MRD by MFC. Indeed, Salipante et al⁽²⁷⁾ described that the level of success of MFC depends greatly on the immunophenotype of the abnormal blasts and how to discriminate them from background regenerative blasts. Moreover, due to the lack of standardization, MFC shows substantial variability across laboratories, including that of sample processing, instrument configuration, number of events, and training of pathologists.⁽³²⁾ The lack of a strong correlation between NGS and qPCR could be explained by the nature of the sample (sequencing uses gDNA whereas qPCR uses cDNA). Although RNA overexpression allows a higher sensitivity of detection, RNA levels do not correlate with the number of tumoral cells, in contrast to mutated DNA. Accordingly, mutated DNA is more representative of the tumoral burden than is overexpression of mutated RNA.⁽³³⁾ It should be noted that the prediction of survival and progression of AML using MRD NGS was improved over the other methodologies employed, at least in the cohorts evaluated.

Finally, survival analysis showed that MRD positive status tested by NGS was associated with a higher risk of relapse and death and that MRD negative status at post-consolidation was associated with a longer OS and DFS; as according to recently published studies.⁽²³⁾ Supporting these findings, previous studies reported that an MRD check-point at post-consolidation could be the best moment for analysis because a better prediction is observed.^(8, 34-37) Cox regression multivariate analyses confirmed that MRD positive status by sequencing was the only factor with significant risk prediction of relapse (p=0.012).

In conclusion, we have optimized a new targeted sequencing method with high sensitivity for MRD evaluation with applicability for a high percentage of AML patients, improving the capacity to predict the AML outcome over MFC or qPCR in our cohort.

References

1. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447.
2. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21(24):4642-4649.
3. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152.
4. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 2016;374(5):422-433.
5. Kronke J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2709-2716.
6. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(6):543-552.
7. Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2017;35(2):185-193.
8. Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood*. 2013;121(20):4056-4062.
9. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(32):4123-4131.
10. Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3889-3897.
11. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-1291.
12. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):222-233.
13. Cedena MT, Rapado I, Santos-Lozano A, et al. Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017;8(63):106948-106961.
14. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103-1108.
15. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*. 2016;17(1):122.
16. Tomlinson B, Lazarus HM. Enhancing acute myeloid leukemia therapy - monitoring response using residual disease testing as a guide to therapeutic decision-making. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(6):563-574.
17. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-1089.
18. Thol F, Kolking B, Damm F, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(7):689-695.
19. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014;28(1):129-137.
20. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686-698.
21. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-946.
22. Koefler HP, Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia*. 2017;31(3):534-542.
23. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1189-1199.
24. Kloco JM, Miller CA, Griffith M, et al. Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA*. 2015;314(8):811-822.
25. Getta BM, Devlin SM, Levine RL, et al. Multicolor Flow Cytometry and Multigene Next-Generation Sequencing Are Complementary and Highly Predictive for Relapse in Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(7):1064-1071.
26. Debarri H, Lebon D, Roumier C, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget*. 2015;6(39):42345-42353.
27. Salipante SJ, Fromm JR, Shendure J, et al. Detection of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Mod Pathol*. 2014;27(11):1438-1446.

28. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, et al. Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia. *J Mol Diagn.* 2017;19(3):437-444.
29. Roloff GW, Lai C, Hourigan CS, et al. Technical Advances in the Measurement of Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2017;6(9).
30. Minervini A, Francesco Minervini C, Anelli L, et al. Droplet digital PCR analysis of NOTCH1 gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(52):86469-86479.
31. Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):356-365.
32. Cruz NM, Mencia-Trinchant N, Hassane DC, et al. Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2017;39 Suppl 1:53-60.
33. Duployez N, Nibourel O, Marceau-Renaut A, et al. Minimal residual disease monitoring in t(8;21) acute myeloid leukemia based on RUNX1-RUNX1T1 fusion quantification on genomic DNA. *Am J Hematol.* 2014;89(6):610-615.
34. Jacobsohn DA, Tse WT, Chaleff S, et al. High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol.* 2009;146(6):669-674.
35. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, et al. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2017;31(7):1482-1490.
36. Rossi G, Carella AM, Minervini MM, et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tumor 1 expression. *Leuk Res.* 2015;39(2):138-143.
37. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(12):2213-2223.

Acknowledgments

This study was supported by the Subdirección General de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Spain) grants PI13/02387 and PI16/01530, and the CRIS against Cancer foundation grant 2014/0120. M.L. holds a postdoctoral fellowship of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FPDI-2013-16409). P.R.P. holds a postdoctoral fellowship of the Spanish of Instituto de Salud Carlos III: Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud i-PFIS (IFI 14/00008).

Authorship contributors

Contribution: E.O. collected samples, performed experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. M.L. analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. I.R. analyzed and interpreted data. P.R.P. collected samples and analyzed and interpreted data. P.M-S. collected samples and clinical data. T.C. analyzed and interpreted data experiments. M.P., J.P.O., P.P., E.B., P.M., J.A.G.V., E.M., E.A., A.F., R.R. and P.M-B., collected samples and clinical data. B.S.V. performed experiments. J.N. and M.G. supervised research, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. R.A. and J.M.L. collected samples and clinical data, designed and supervised research and experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. All authors prepared the report and approved the final version.

Role of funding source

Funding source not have additional role in this study.

Ethics committee approval

The study was conducted according to the Declaration of Helsinki, and the protocol was reviewed and approved by the institutional review board/independent ethics committee.

PATIENTS (n = 63)	
Follow-up sample type	
BM	58 (92%)
PB	5 (8%)
Sex	
Male	21 (33%)
Female	42 (67%)
Age at diagnosis	
Median	54 (IQR, 41.5–66.0)
Blasts at diagnosis	
Median count	69 (IQR, 51.0–81.0)
Leukocytes at diagnosis	
Median count ($\times 10^9/L$)	15.7 (IQR, 12.2–20.24)
AML secondary	
No	59 (94%)
Yes	4 (6%)
Cytogenetic risk	
Favorable	25 (40%)
Intermediate	36 (57%)
Adverse	2 (3%)
FLT3-ITD	
FLT3 negative	49 (78%)
FLT3 positive	14 (22%)
FLT3-TKD	
FLT3 negative	60 (95%)
FLT3 positive	3 (5%)
NPM1	
NPM1 negative	6 (10%)
NPM1 positive	57 (90%)
HSCT	
No	42 (67%)
allo-HSCT	7 (11%)
auto-HSCT	14 (22%)
Relapse	
No	42 (67%)
Yes	21 (33%)
Death	
No	40 (63%)
Yes	23 (37%)
Treatment*	
3+7 regimen	50 (80%)
Flugaza	8 (13%)
Mylotarg	2 (3%)
Panobidara	3 (4%)

Table 1. Main characteristics of AML patients included in the MRD study

BM indicates bone marrow; PB, peripheral blood; AML, acute myeloid leukemia; ITD, internal tandem duplications; TKD, tyrosine kinase domain; allo-HSCT, allogeneic HSCT and auto-HSCT, autologous HSCT. *3+7 regimen of chemotherapy: one or two induction cycles of cytarabine and idarubicin during seven and three days, respectively; and two or three consolidation cycles at high doses of cytarabine, twice a day for three alternates days followed by allo- or auto-HSCT. The remainder of patients were included in others clinical trials (Mylotarg, NCT0104104; Flugaza (NCT02319135); Panobidara, NCT00840346). Clinical data were collected in the following Spanish AML epidemiological registries: NCT01700413, NCT02006004, NCT00464217, NCT02607059, NCT01041040 and NCT01296178.

Table 2. Cox regression analysis

(A) Univariate Cox regression analysis of each prognostic factor influencing the risk of relapse and risk of death of AML patients. (B) Multivariate Cox regression analysis evaluating the most relevant factors detected in univariate analysis. Abbreviations are explained in Table 1. CI indicates confidence interval; Dx, diagnosis; ELN, European Leukaemia Net; HR, hazard ratio; MFC, multiparametric flow cytometry; MRD, minimal residual disease; NGS, next-generation sequencing; qt, chemotherapy; *p values are considered significant (< 0.05), ** (< 0.01).

A.

	Risk of Death		Risk of Relapse	
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Sex (female vs male)	1.20 (0.50–2.83)	0.682	0.94 (0.37–2.44)	0.906
Age per year	1.04 (1.00–1.07)	0.013 *	1.03 (0.99–1.06)	0.069
Blasts at dx (%)	1.00 (0.99–1.02)	0.667	1.01 (0.99–1.03)	0.532
Leukocytes at dx ($\times 10^9/L$)	1.01 (0.99–1.01)	0.418	1.00 (0.99–1.01)	0.508
Favorable vs adverse (ELN risk)	0.67 (0.08–5.43)	0.714	0.75 (0.09–6.00)	0.786
Interm. vs adverse (ELN risk)	1.03 (0.13–7.86)	0.976	1.02 (0.13–7.82)	0.988
Mutated FLT3-ITD	3.45 (1.40–8.52)	0.007 *	2.37 (0.86–6.51)	0.095
Allo-HSCT vs intensive qt	1.35 (0.40–4.57)	0.634	1.78 (0.41–7.78)	0.44
Allo-HSCT vs auto-HSCT	0.29 (0.05–1.74)	0.176	0.64 (0.11–3.77)	0.629
MRD* by MFC	2.10 (0.67–6.62)	0.203	2.40 (0.77–7.46)	0.130
MRD* by qPCR	2.51 (0.56–11.2)	0.228	5.01 (0.64–38.8)	0.123
MRD* by NGS	4.22 (1.66–10.7)	0.002 **	3.41 (1.37–8.48)	0.008 **

B.

	Risk of Death		Risk of Relapse	
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Age per year	1.05 (1.02–1.09)	0.004 *	1.03 (0.99–1.07)	0.061
Sex (female vs male)	0.84 (0.33–2.17)	0.720	1.25 (0.44–3.52)	0.671
Leukocytes at dx ($\times 10^9/L$)	1.01 (0.99–1.03)	0.219	1.07 (0.99–1.02)	0.481
Favorable vs adverse (ELN risk)	13.75 (0.84–226.1)	0.067	7.09 (0.37–134.15)	0.192
Interm. vs adverse (ELN risk)	11.22 (0.82–154.2)	0.071	5.86 (0.39–86.84)	0.203
Mutated FLT3-ITD	8.87 (2.54–30.95)	0.001 **	4.18 (1.11–15.69)	0.034
MRD* by NGS	4.54 (1.58–13.03)	0.005 **	3.76 (1.34–10.54)	0.012 *

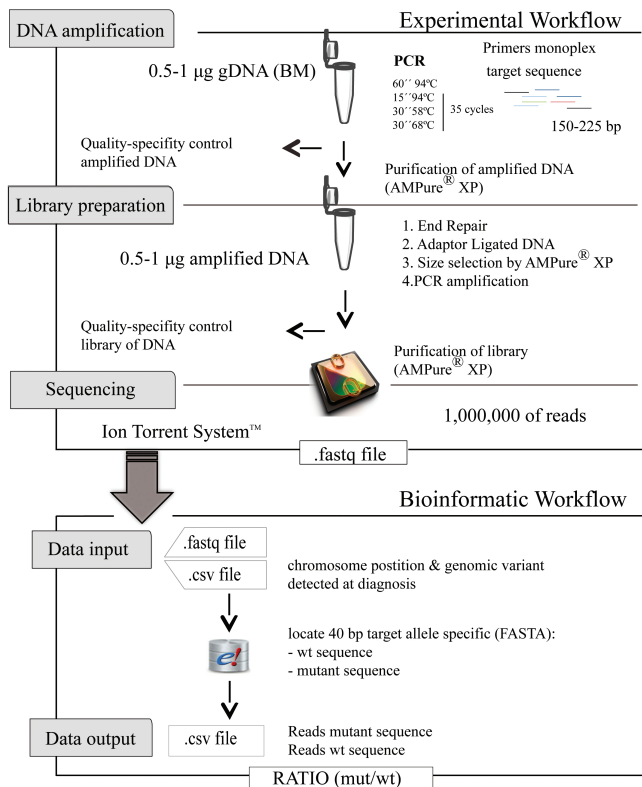


Figure 1. Workflow of NGS-MRD method

DNA amplification, library preparation and sequencing experimental workflow. gDNA is amplified by qPCR using specific primers. Library preparation is carried out in four steps: end repair, adaptor ligation, size selection, and PCR amplification. The library is then sequenced. A custom bioinformatic pipeline analyzes the obtained sequences. The results are expressed as a ratio of sequences mutated among wild-type sequences.

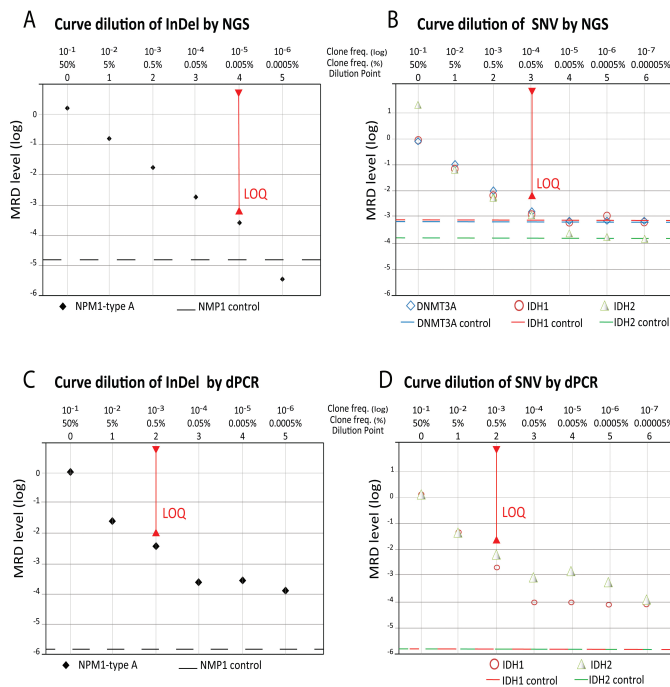


Figure 2. Calibration curve of MRD in serial dilutions

Top, 10-fold dilution curve for the assessment of sensitivity of sequencing in (A) InDels, using OCI-AML3 gDNA with 50% *NPM1* type A mutation ($R^2 = 0.98$); and in (B) SNV, using OCI-AML3 gDNA with 50% mutated *DNMT3A* ($R^2 = 0.98$), and gDNA with 50% mutated *IDH1* or *IDH2* from a commercial standard ($R^2 = 0.91$, $R^2 = 0.98$, respectively). *Bottom*, same 10-fold dilution curves for the assessment of sensitivity of dPCR in InDels (C, $R^2 = 0.98$); and in SNV (D, $R^2 = 0.91$ for *IDH1* and $R^2 = 0.98$ for *IDH2*).

Vertical red bars indicate LOQ according to the sample. Clone frequency is expressed as target concentration as mutated copies/ μ L in wild-type copies/ μ L. Negative control are included in the calibration curve and presented levels below the corresponding values of LOQ.

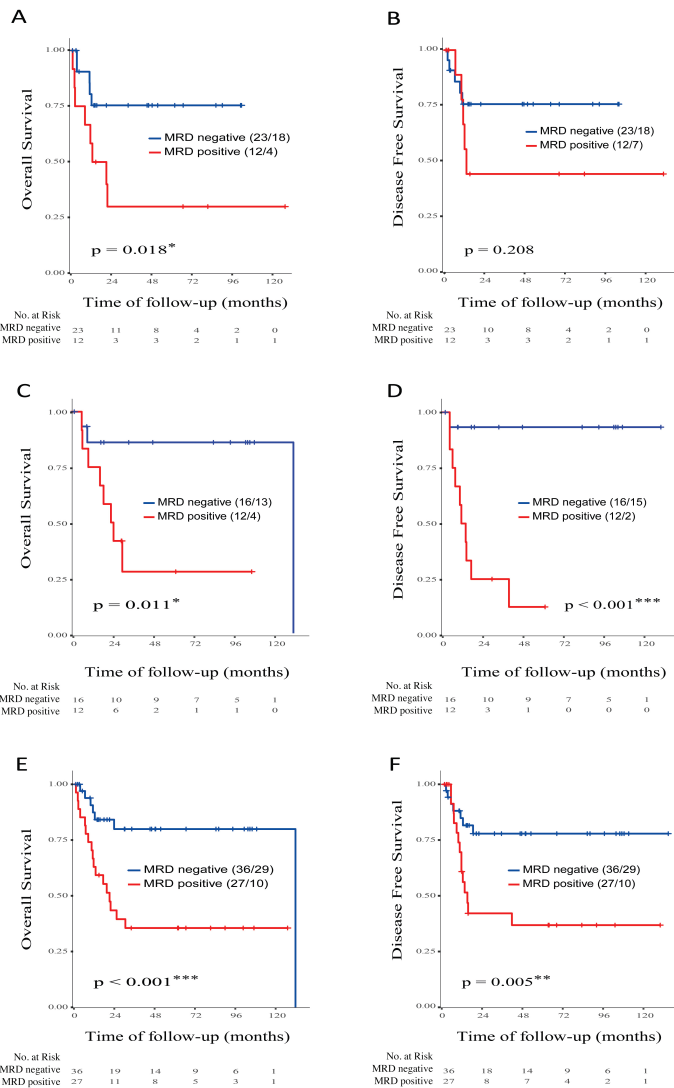


Figure 3. Analysis of OS and DFS in AML patients stratified according to MRD levels by sequencing

Analysis of OS for induction data set (A), for consolidation data set (C), and both together (E); and for DFS for induction data set (B), for consolidation data set (D), and both together (F). At post-induction check-point (n=35) the cutoff used was 0.001 for OS and DFS. At post-consolidation check-point (n=28) the cut off used was 0.00026 for OS and DFS. At both check-point (all data set) the cut off used was 0.00035 (n=63) for OS and DFS. Number of censored patients with respect to the stratified groups and the number at risk is indicated. *P values are considered significant (< 0.05), ** (< 0.01).

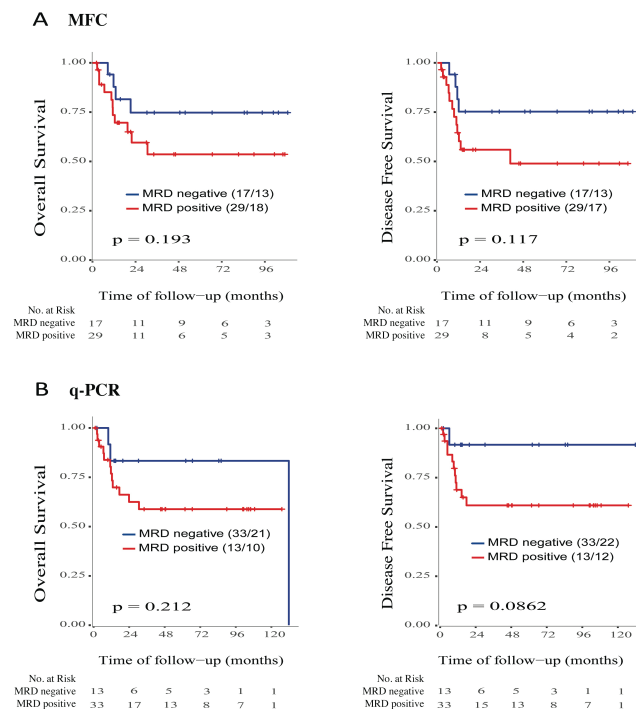


Figure 4. Prognosis analysis of OS and DFS in AML patients stratified according to MRD levels by conventional methods

Kaplan-Meier plots of (A) OS and (B) DFS with respect to MFC analysis and (C) OS and (D) DFS with respect to qPCR analysis. Number of censored patients with respect to each stratified group and number at risk is indicated. *p values are considered significant (< 0.05), ** (< 0.01).

