

Estudio de mutaciones en Leucemia Mieloide Aguda mediante secuenciación NGS en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

Percy Ortiz Guerra⁽¹⁾, Carolina Tantaleán Bazán⁽¹⁾, Arturo Arzapalo Poma⁽¹⁾

(1) Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

Introducción

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es una neoplasia hematológica heterogénea, resultado de mezclas de subclonas que evolucionan adquiriendo mutaciones adicionales en el tiempo. Tradicionalmente la clasificación de riesgo molecular y citogenético se ha utilizado para predecir el pronóstico de la enfermedad. Es así que dentro de las alteraciones genéticas comúnmente estudiadas se encuentran la fusión de los genes *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11*, así como el estudio de las mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1* o *CEBPA*. No obstante, con el advenimiento y aplicación extensiva de la secuenciación de próxima generación (NGS), se ha redefinido el panorama genético-molecular de la LMA para la clasificación y estratificación de riesgo de la LMA.

La posibilidad de detección de nuevos marcadores moleculares, tales como mutaciones en los genes *RUNX1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, entre otras que actualmente pueden ser estudiadas con los diferentes paneles de genes para LMA disponibles, han significado un cambio trascendente en la clasificación, estratificación pronóstica de la enfermedad, así como el tratamiento y la valoración de la respuesta terapéutica de la LMA.

La aplicación de la secuenciación masiva en LMA, ha revelado a través de numerosos estudios, la asociación entre diferentes mutaciones y el fenotipo expresado de la LMA, permitiendo así el uso de nuevas terapias específicamente dirigidas hacia la molécula producida por cada mutación.

Asimismo, las clasificaciones más recientes de las neoplasias hematológicas determinadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como las nuevas directrices de tratamiento, propuestos por European Leukemia Net (ELN), han incorporado también estos hallazgos moleculares.

El laboratorio de biología molecular e histocompatibilidad del hospital nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM), con el apoyo del Consorcio Internacional en Leucemia Aguda (ICAL), la Sociedad Americana de Hematología (ASH), la Universidad Erasmus MC (Países Bajos) y la Fundación Torsten Haferlach (Alemania), realizó la secuenciación NGS de las muestras de pacientes con LMA, en el marco de una iniciativa para mejorar la toma de decisiones terapéuticas en los pacientes con diagnóstico de LMA, camino a la aplicación de una medicina de precisión.

Metodología

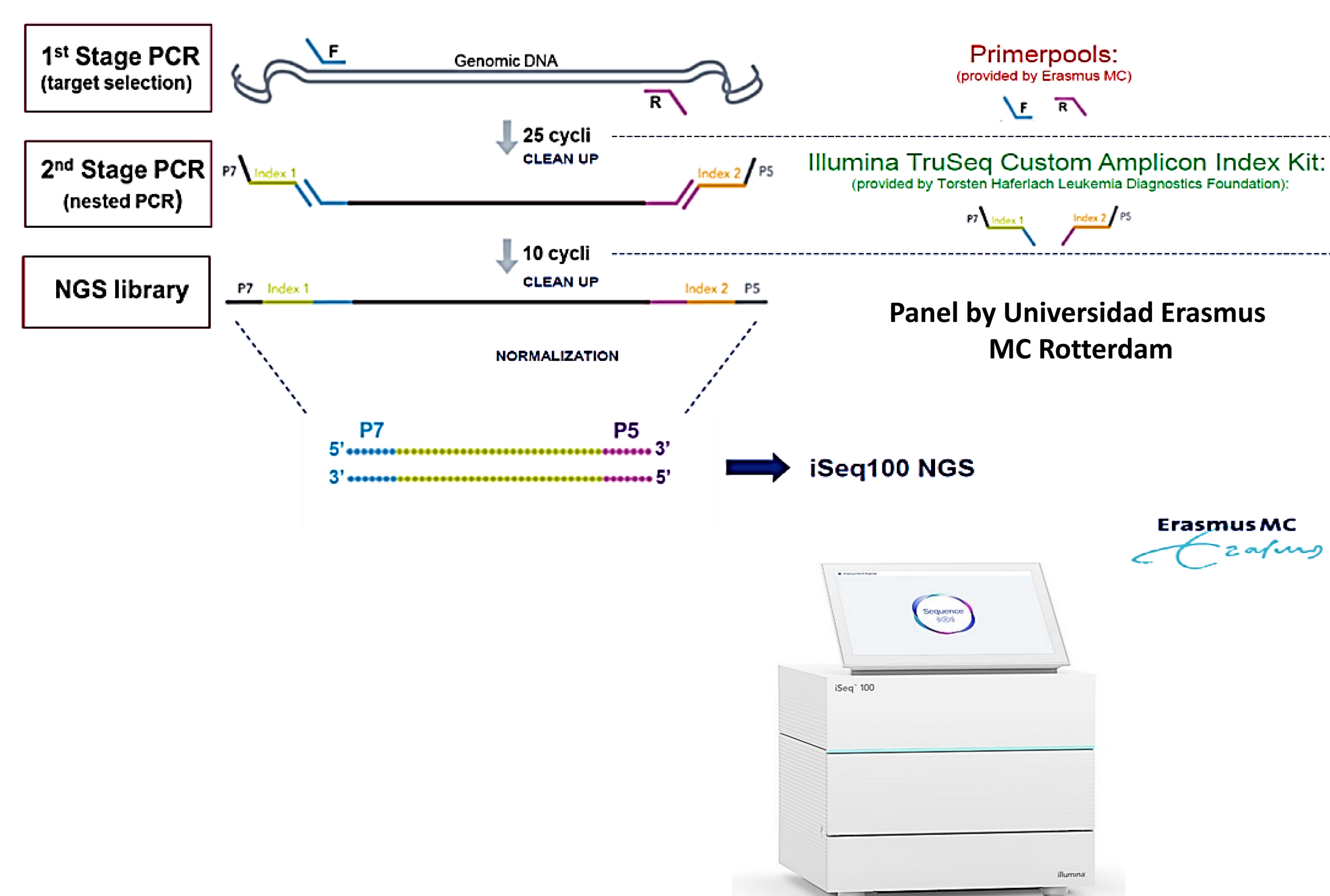
Se realizó el estudio de los resultados obtenidos en 18 muestras de pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda en debut, del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. Dicha población de estudio presentaba asimismo resultados de cariotipo normal y ausencia de alteraciones moleculares como fusión de los genes *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA* o mutaciones en los genes *FLT3* y *NPM1*.

Las muestras de sangre medular fueron proporcionadas y estudiadas al diagnóstico, realizándose la extracción del ADN con el reactivo *PureLink Genomic DNA (Invitrogen)*.

Para la amplificación del ADN proveniente de las regiones de interés, se utilizó el panel personalizado *ELN CUSTOM NGS PANEL*, proporcionado por la Universidad Erasmus MC de Rotterdam, que incluyó el estudio de las regiones codificantes de 8 genes: *ASXL1*, *CEBPA*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *RUNX1* y *TP53*.

La secuenciación NGS se realizó utilizando la plataforma *iSeq 100* de Illumina, donada al Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, por la fundación alemana de lucha contra la leucemia Torsten Haferlach. Siendo los datos obtenidos, analizados por el módulo de análisis *DNA AMPLICON* de Illumina y posteriormente validado por un pipeline de análisis elaborado por la Universidad Erasmus.

Principio de la Técnica:



Resultados y discusión

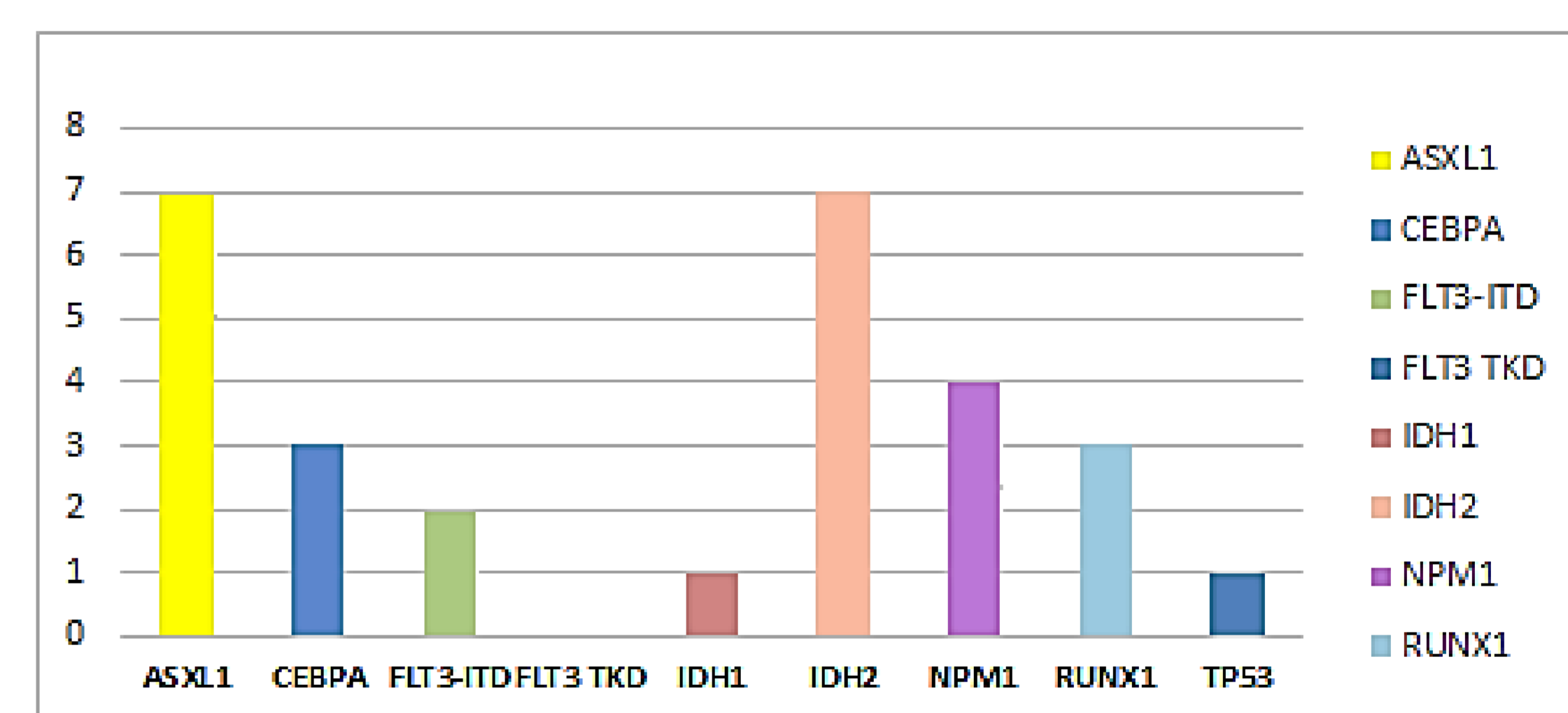
Se obtuvieron los resultados de la secuenciación NGS de 18 pacientes del HNERM, en los cuales se estudiaron mutaciones en los siguientes ocho (08) genes: *ASXL1*, *CEBPA*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *RUNX1* y *TP53*; encontrándose los siguientes hallazgos: la mutación del gen *ASXL1* estuvo presente en siete (07) pacientes; la mutación en el gen *CEBPA* en tres (03) pacientes; la mutación en el gen *FLT3* se encontró en dos (02) pacientes para la presentación Duplicación en Tándem Interna (ITD); la mutación *IDH1* se encontró en un (01) paciente; la mutación del gen *IDH2* en siete (07) pacientes; la mutación *NPM1* fue encontrada en cuatro (04) pacientes; la mutación *RUNX1* en tres (03) pacientes y la mutación en el gen *TP53* se halló en un (01) paciente. En algunos pacientes se hallaron mutaciones múltiples (más de dos mutaciones en un mismo paciente) y en tres (03) pacientes no se encontró ninguna de las mutaciones estudiadas con el panel NGS empleado. El resumen de los hallazgos obtenidos se resumen el Cuadro N° 1 y Figura N° 1:

Cuadro N° 1:

Samples	ASXL1	CEBPA	FLT3-ITD	FLT3 TKD	IDH1	IDH2	NPM1	RUNX1	TP53
P1		0.43							
P2									
P3	0.41							0.4	
P4						0.41		0.39	
P5	0.56	0.40							
P6	0.47					0.43			
P7									
P8		0.44				0.43			
P9	0.26								
P10						0.45			0.11
P11						0.38			
P12	0.47		0.35				0.48		
P13					0.52		0.49		
P14	0.49		0.25				0.46		
P15									
P16						0.4		0.1	
P17							0.4		
P18	0.2					0.25			

Se muestra las mutaciones encontradas en los genes estudiados considerando como parámetro de detección el valor de la frecuencia de la variante alélica (VAF).

Figura N° 1:



El hallazgo de mutaciones mediante el panel de secuenciación NGS ha permitido considerar dentro del espectro pronóstico de los pacientes estudiados, nuevas mutaciones que modificaría el nivel de categorización de riesgo del paciente. Haciendo que, pacientes que inicialmente fueron categorizados con un riesgo bajo o intermedio (según las recomendaciones de ELN 2022), tuvieran que recalificarse hacia un alto riesgo, al encontrarseles mutaciones adversas en genes tales como: *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53*.

Asimismo, el estudio de mutaciones más frecuentes como *NPM1*, *CEBPA*, ambas consideradas de buen pronóstico y la mutación del gen *FLT3*, permiten mejorar el criterio de categorización de los niveles de riesgo bajo e intermedio.

De otro lado, el disponer de la información sobre mutaciones de genes sobre las cuales se cuenta actualmente, o se tienen ensayos clínicos, con fármacos de acción específica sobre los transcritos de dichas mutaciones; tales como, *Gilteritinib* o *Quizartinib* para *FLT3*; *Enasidenib* para *IDH2*; *Ivosidenib* para *IDH1* o *Vosaroxina* para mutación de *TP53*, entre otras; abre un camino de esperanza en el tratamiento de pacientes con LMA.

Conclusiones

- Los estudios de las mutaciones en genes asociados a Leucemia Mieloide Aguda mediante la tecnología de secuenciación NGS, permite disponer de una mayor cobertura de genes estudiados, para poder así establecer una real categorización del riesgo del paciente.
- La información sobre mutaciones adicionales estudiadas mediante secuenciación NGS permite realizar una adecuada toma de decisiones acerca del pronóstico y tratamiento del paciente.
- Conocer la existencia de mutaciones sobre las cuales existen fármacos "noxa específicos" abre el camino para una real medicina de precisión.

Referencias

1. Döhner H et al. 2022 "Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN". *Blood* (12), vol. 140, 1345-1377.
2. Sperotto A et al. 2023. "Measurable Residual Disease and Clonal Evolution in Acute Myeloid Leukemia from Diagnosis to Post-Transplant Follow-Up: The Role of Next-Generation Sequencing". *Biomedicine*. (2), vol. 11.
3. Alonso C et al. 2019. "Clinical Utility of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia Diagnostics". *The Journal of Molecular Diagnostics* (2), vol. 21, 228-240
4. El Achi H et al. 2021. "Biomarkers in Acute Myeloid Leukemia: Leveraging Next Generation Sequencing Data for Optimal Therapeutic Strategies". *Frontiers in Oncology* (5), vol. 11, 45-53.