

Curso

Biología molecular aplicada al diagnóstico médico

2021

Clase: Oncohematología de precisión

Círculo Médico de Rosario | Fecha: 02/11/2021



Lic. Analía Seravalle
Responsable Biología Molecular CIBIC
aseravalle@cibic.com.ar

Objetivo

Revisar como los análisis genéticos contribuyen al diagnóstico, pronóstico, seguimiento y/o elección terapéutica de los neoplasmas hematológicos.

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

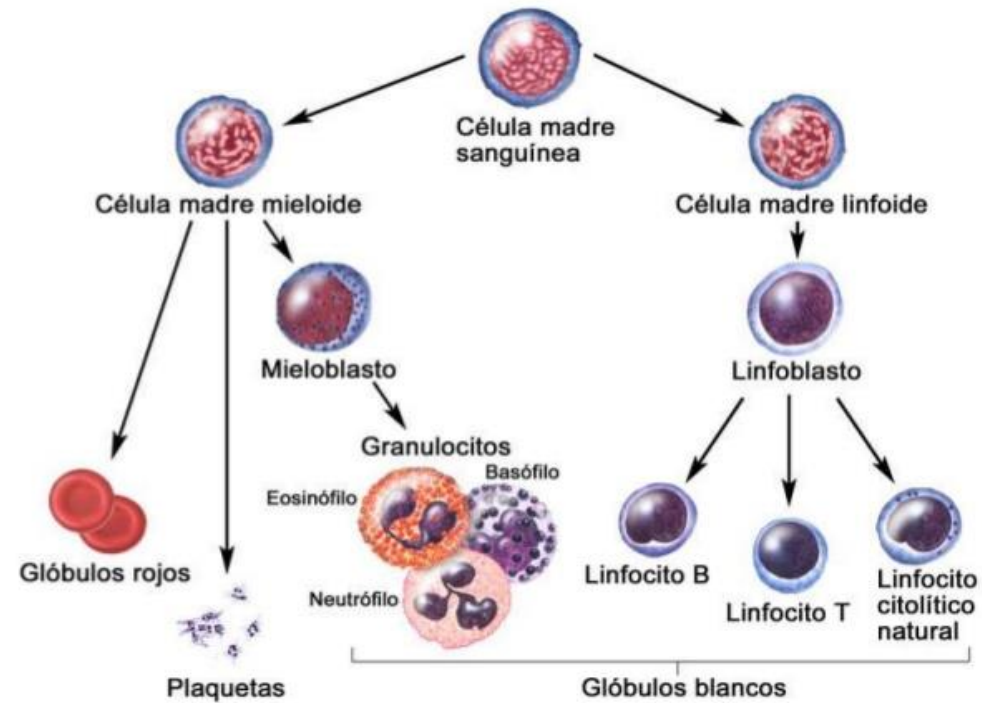
Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva

Introducción

- ✓ Los neoplasmas hematológicos constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas.
- ✓ Dependiendo del linaje celular involucrado, hablamos de neoplasias linfoides o mieloides.



Introducción

- ✓ El diagnóstico de las neoplasias hematológicas ha cambiado sustancialmente en las últimas décadas, pasando de la evaluación morfológica como único criterio, a la **integración de los hallazgos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares**, que son la base de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- ✓ Las enfermedades hematológicas históricamente han estado a la vanguardia entre los distintos tipos de cáncer respecto al uso de **análisis genéticos para el diagnóstico, clasificación, pronóstico y elección del tratamiento**.
- ✓ La **caracterización genética** de estas patologías es **vital** al momento de la evaluación clínica y se encuentra en constante evolución debido a los avances de las tecnologías empleadas para los análisis moleculares.

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofilica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

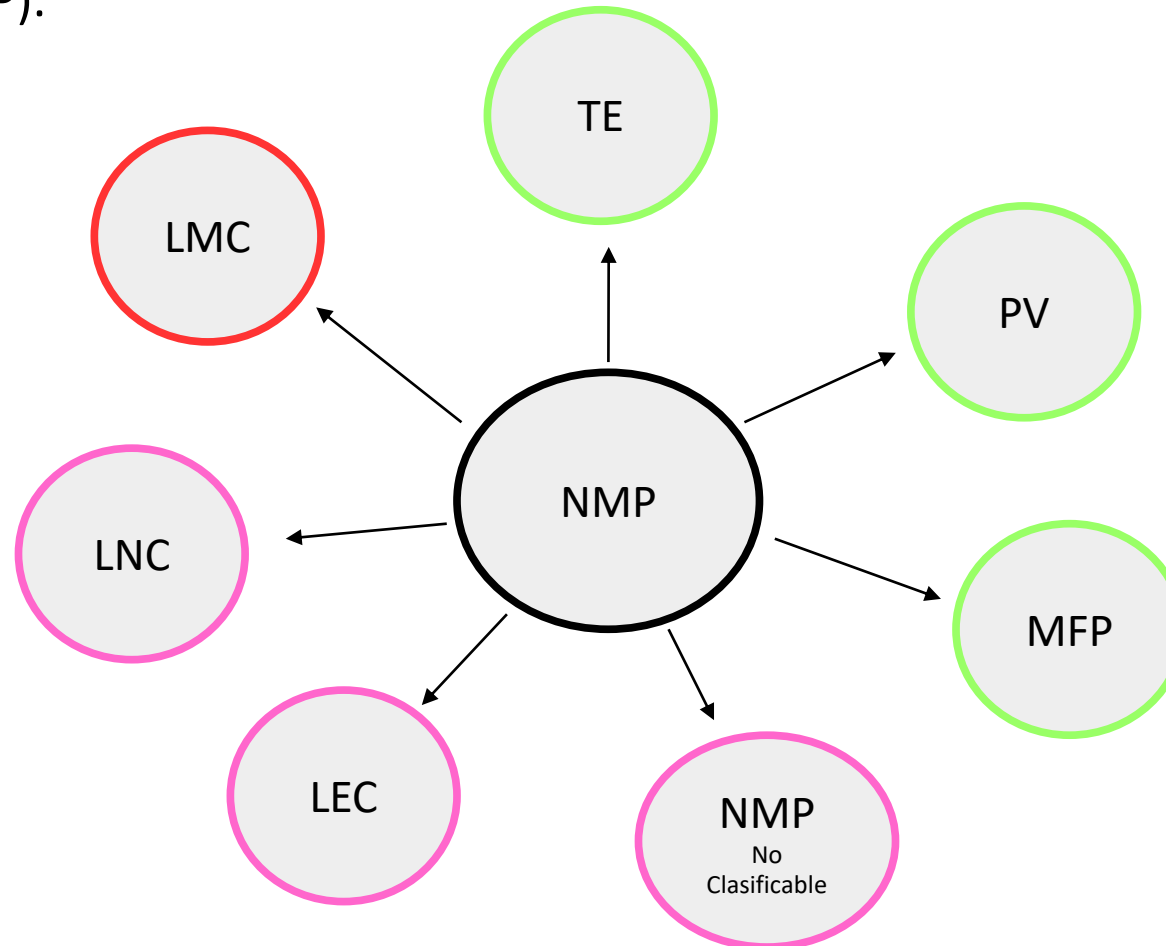
Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- ✓ La **organización mundial de la salud**, reconoce en su última revisión, **siete subtipos** de neoplasmas mieloproliferativos (NMP).



Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- **Leucemia Mieloide Crónica**
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofilica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

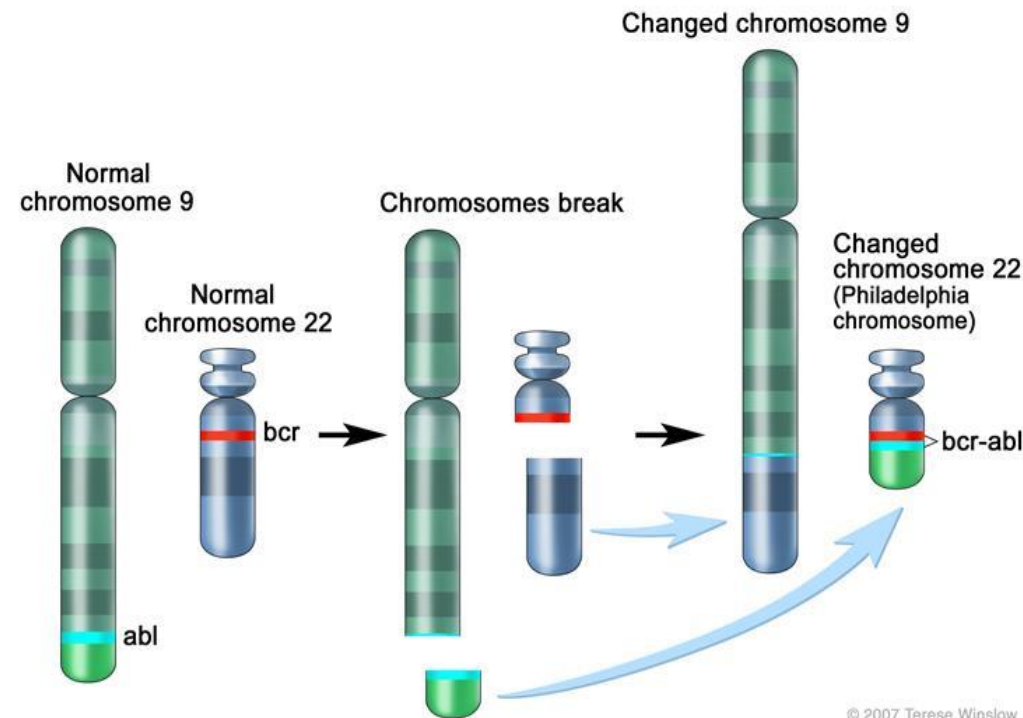
Secuenciación masiva

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Mieloide Crónica – LMC

Fue el primer tipo de cáncer para el cual se encontró un marcador genético.

Surge de la **translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22**, dando como resultado el **cromosoma Filadelfia (Ph)** y el gen de fusión ***BCR-ABL1***, que desregula la actividad quinasa intracelular y permite el desarrollo de la enfermedad.



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Mieloide Crónica – LMC

Clínicamente se divide en tres fases. La primera, en la que se encuentra la mayoría de los pacientes, es una **fase crónica** o estable, que puede resultar muy indolente y durar de tres a cinco años. Si no hay tratamiento, el paciente pasa a una segunda fase, la **acelerada**, que va seguida de una fase de **crisis blástica**, invariablemente fatal; esta última es muy semejante a la leucemia aguda.

Estas fases se diferencian particularmente por el número de células inmaduras que se pueden detectar en sangre, siendo las dos últimas difíciles de controlar con el tratamiento.

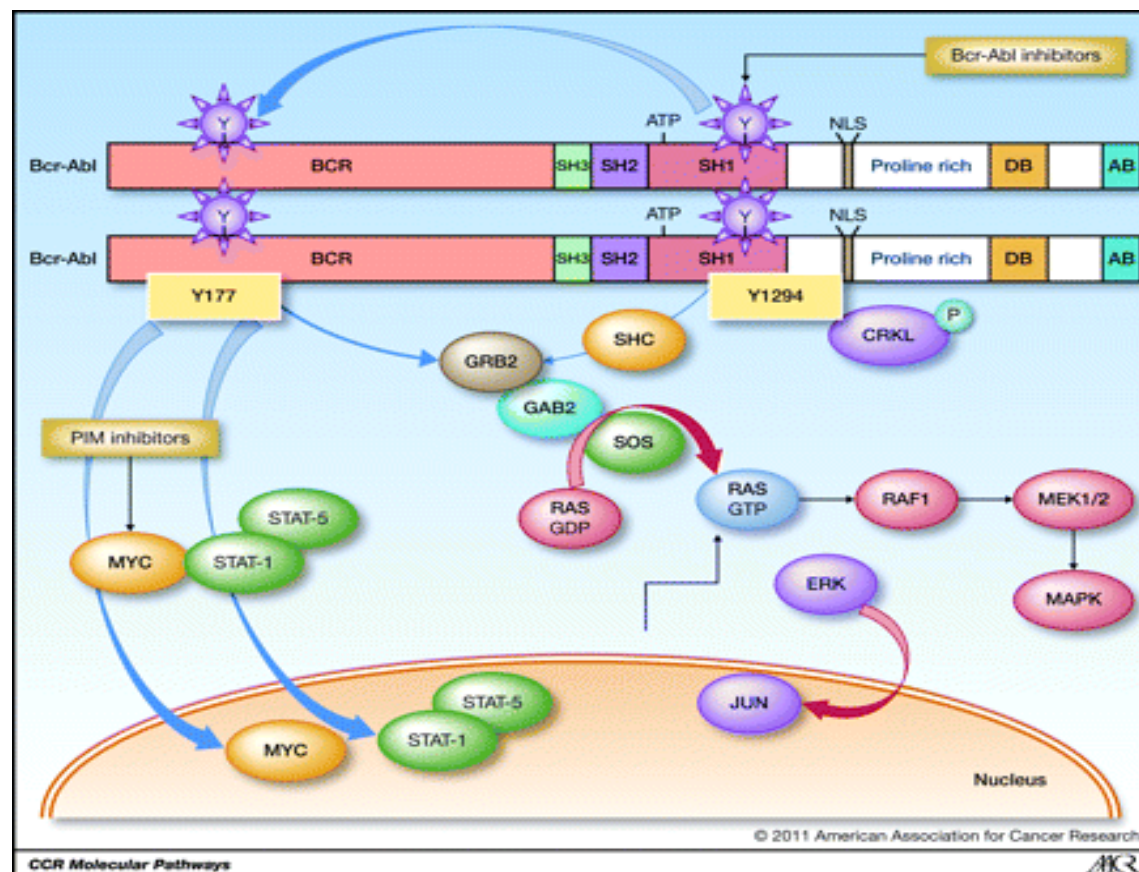


Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Mieloide Crónica – LMC

Representación esquemática de las rutas moleculares activadas por BCR ABL

La fosforilación de la tirosina Tyr177 de BCR es esencial para la leucemogénesis mediada por BCR ABL. El complejo BCR ABL/GRB2 recluta a SOS y el complejo BCR ABL/GRB2/SOS activa constitutivamente la vía de señalización RAS, activando las proteínas MEK1/2 y MAPK, resultando en una proliferación celular anormal.



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Mieloide Crónica – LMC

Estudios moleculares

Diagnóstico y seguimiento

El estudio cualitativo se realiza mediante RT-PCR y detecta la presencia del reordenamiento BCR-ABL1, mientras que el estudio cuantitativo se realiza mediante qRT-PCR, permitiendo cuantificar los transcritos BCR-ABL1 respecto a un gen control (ABL).

Un resultado cualitativo detectable, o no detectable, carece de un valor predictivo en si mismo para el monitoreo de la enfermedad; en cambio sí son de gran valor predictivo una serie de ensayos cuantitativos que evalúen la cinética del clearance del tumor (respuesta al tratamiento) o reaparición del mismo (recaída).

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Mieloide Crónica – LMC

Criterios de respuesta molecular

BCR-ABL/ABL1	Red Log	Resp. Molecular	Copias gen ABL*
≤ 0,001% o indetectable	≥ 5.0 log	RM 5.0	≥ 100.000
≤ 0,0032 o indetectable	≥ 4.5 log	RM 4.5	≥ 32.000
≤ 0,01 o indetectable	≥ 4.0 log	RM 4.0	≥ 10.000
0,1 – 0.01%	≥ 3.0 log	RM Mayor	
1 – 0,1%	≥ 2.0 log	RM Menor	
10 – 1%	≥ 1.0 log	RM Minima	
> 10%	< 1.0 log	RM Nula	

* En las Respuestas moleculares completas (RM^{4.0}, RM^{4.5} y RM^{5.0}) se debe tener en cuenta el n° de copias del gen ABL para evitar falsos negativos.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Mieloide Crónica – LMC

Resistencia al tratamiento

Primaria (intrínseca): incapacidad de alcanzar cualquier nivel de respuesta en evaluaciones sucesivas desde el diagnóstico.

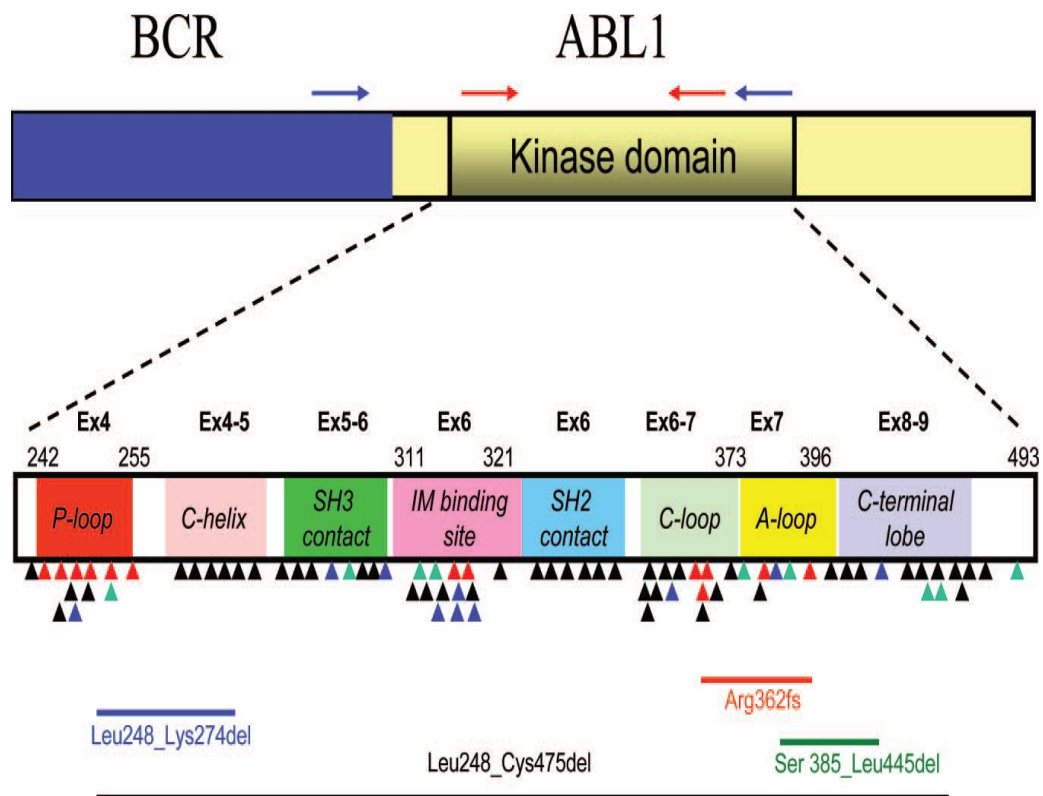
Secundaria (adquirida): la pérdida de la respuesta después de haberla alcanzado durante el tratamiento con inhibidores de tirosín quinasa, no atribuible a la suspensión de los mismos.

En la mayoría de los casos la resistencia se debe a una reactivación de la proteína BCR-ABL1 a expensas de mutaciones puntuales en el dominio quinasa que impiden la acción de sus inhibidores.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Mieloide Crónica – LMC

Resistencia al tratamiento



	Resistente	Pobre sensibilidad
Dasatinib	T315I	Q252H, E255V, F317L
Nilotinib	T315I	Y253H, E255 K/V, F355V
Bosutinib	T315I	G250E, E255 K/V
Ponatinib		E255 V, H396R

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- **Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos**
 - **Policitemia Vera**
 - **Trombocitemia Esencial**
 - **Mielofibrosis idiopática**
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Neoplasmas Mieloproliferativos Crónicos Clásicos BCR-ABL1 negativos (NMPCC)

Los NMPCC son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de las células madres hematopoyéticas, caracterizadas por aumento de la proliferación eritroide, mieloide y megacariocítica que provocan un aumento de células maduras en sangre periférica.

Comprenden las siguientes patologías:

Policitemia Vera (PV)

Trombocitemia Esencial (TE)

Mielofibrosis Primaria (MFP)

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Mutaciones “driver”

- JAK2
- MPL
- CARL

Mutaciones cooperadoras

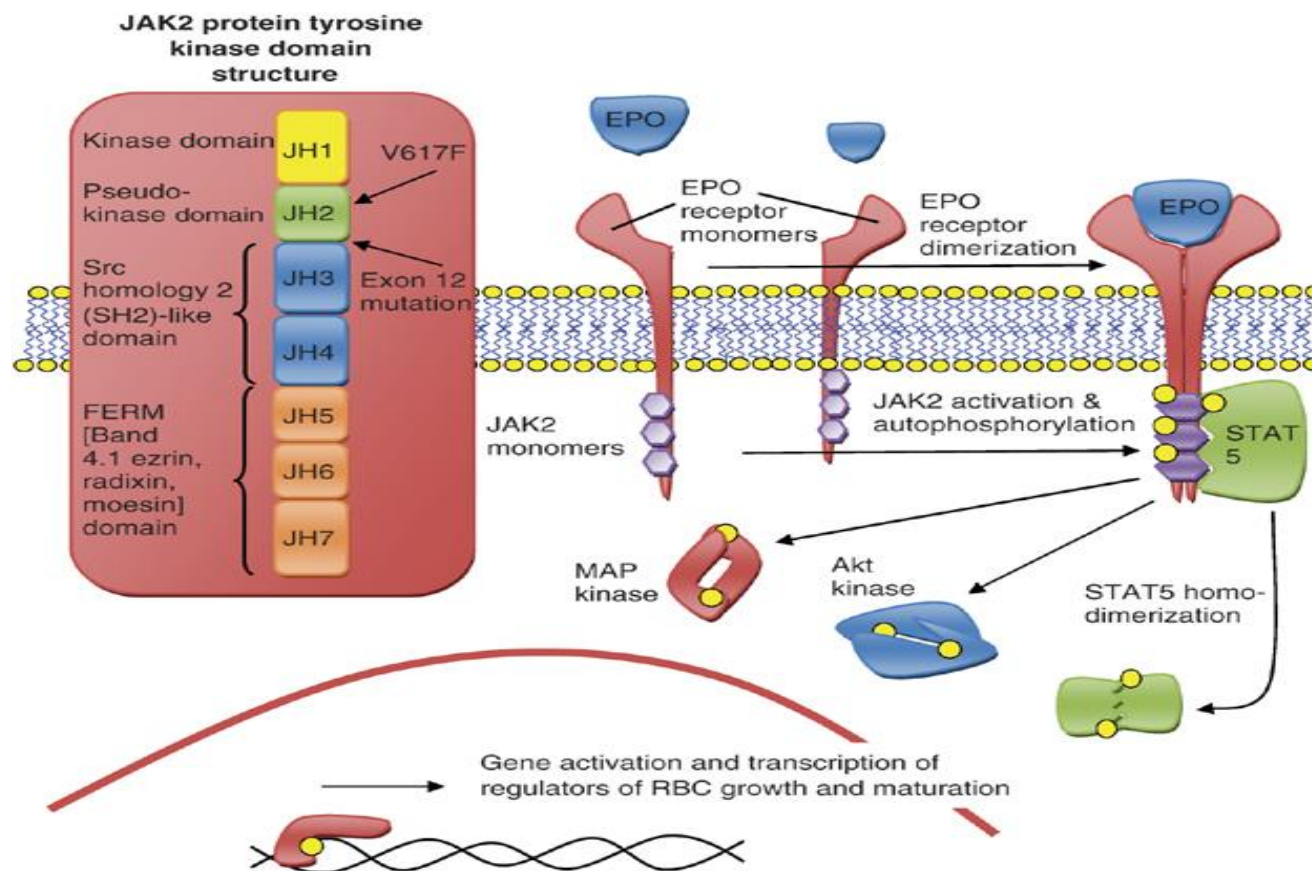
Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Mutaciones “driver” Están implicadas directamente en el desarrollo del fenotipo mieloproliferativo.

Mutaciones en JAK2

JAK2 es una tirosina quinasa que juega un rol esencial en la transducción de señales desde los receptores de quinasa clase 1, críticas para la mielopoyesis normal.

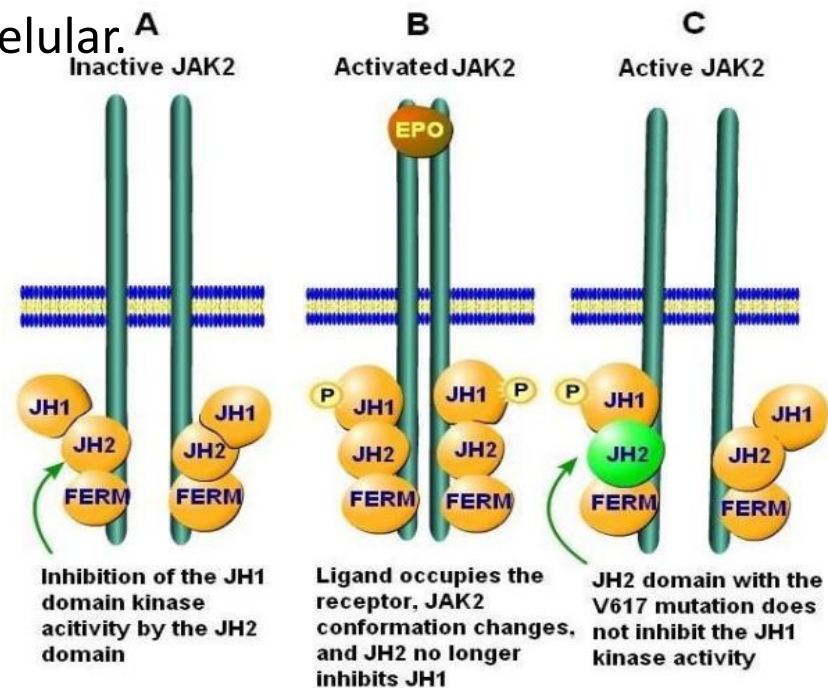


Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPC

JAK2 V617F

Implica el cambio de una valina por una fenilalanina en el codón 617 de JAK2. Es la alteración molecular más frecuente en pacientes con NMPC. Induce la activación constitutiva de la actividad quinasa de JAK2 y de las vías de transducción de la señal intracelular.



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Implicancia clínica JAK2 V617F

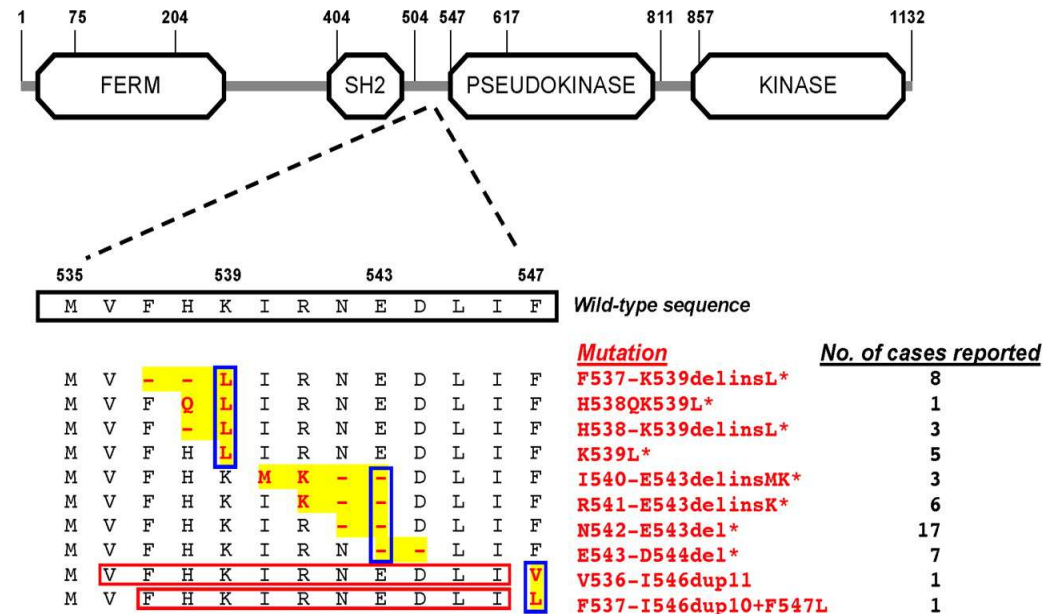
- ✓ La presencia no permite discriminar entre los distintos NMPCC, requiriéndose criterios diagnósticos clínicos, de laboratorio e histológicos para su clasificación.
- ✓ La ausencia no excluye el diagnóstico de PV, TE ni MFP aunque en el caso de PV la negatividad es poco probable.
- ✓ No afecta la sobrevida ni aumenta el riesgo de transformación leucémica en PV ni en TE.
- ✓ En TE su presencia se asocia con aumento de riesgo de trombosis arterial.
- ✓ Se relaciona con edades mayores de presentación, niveles mayores de hemoglobina, leucocitosis y menor recuento plaquetario.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Exón 12 de JAK2

Tiene una frecuencia del 4% en PV, representando entre el 60 y 80% de las PV JAK2V617 negativas, con lo cual la ausencia de mutaciones en JAK2 en PV es excepcional.



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Implicancia clínica mutaciones exòn 12 JAK2

- ✓ Se relaciona con mielopoyesis predominantemente eritroide, niveles de eritropoyetina sérica subnormales y menor edad al diagnóstico.
- ✓ En cuanto a pronóstico ambos marcadores son similares.

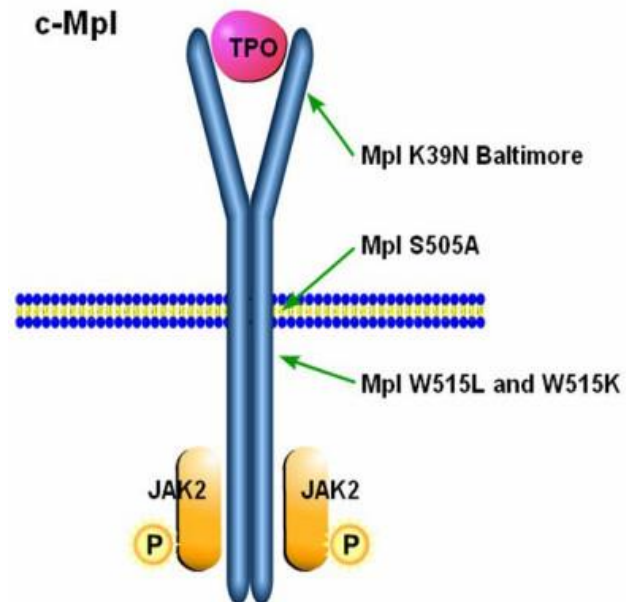
Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Mutaciones en MPL

Entre el 1% - 4% de pacientes con TE y entre el 5% - 11% de pacientes con MFP, presentan mutaciones en el exón 10 del receptor de trombopoyetina, MPL.

Las mutaciones más frecuentes son sustituciones del codón 515 (W515K/L), involucrado en el dominio autoinhibitorio del receptor.



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

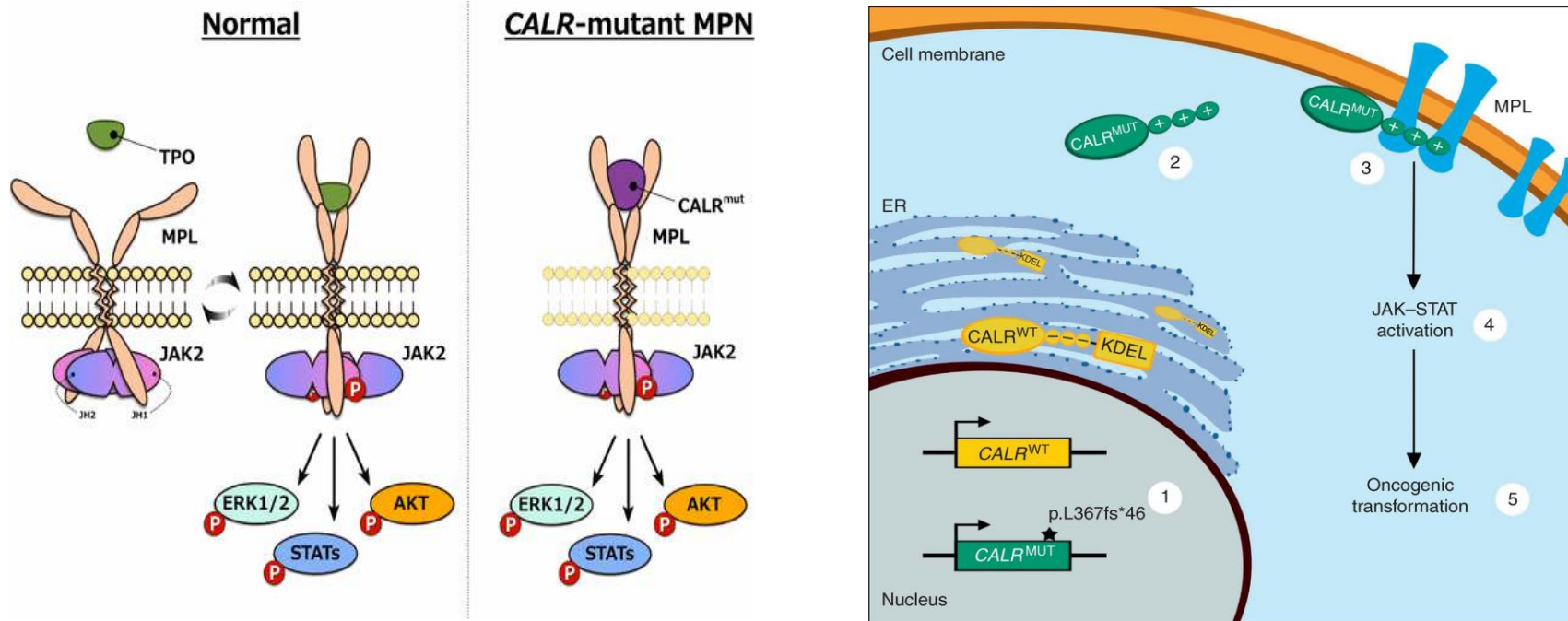
Mutaciones en CALR

- ✓ El gen de la calreticulina codifica una chaperona clave para el correcto plegado de proteínas y glicoproteínas y homeostasis del calcio.
- ✓ Las mutaciones en el exón 9 de este gen permiten la unión anormal con el receptor MPL en el retículo endoplásmico, con la consecuente activación constitutiva del mismo.
- ✓ Se han detectado en un 25% - 30% de los pacientes con TE y MFP.
- ✓ En el 80% de los pacientes afectados se encuentran dos tipos de mutaciones:
 - tipo 1 (deleciones), dentro de las cuales la más prevalente es la de 52 pb, p.L367fs*46
 - tipo 2 (inserciones), donde la más frecuente es la inserción de 5 pb, TTGTC, p.K385fs*47

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

CALR exón 9



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

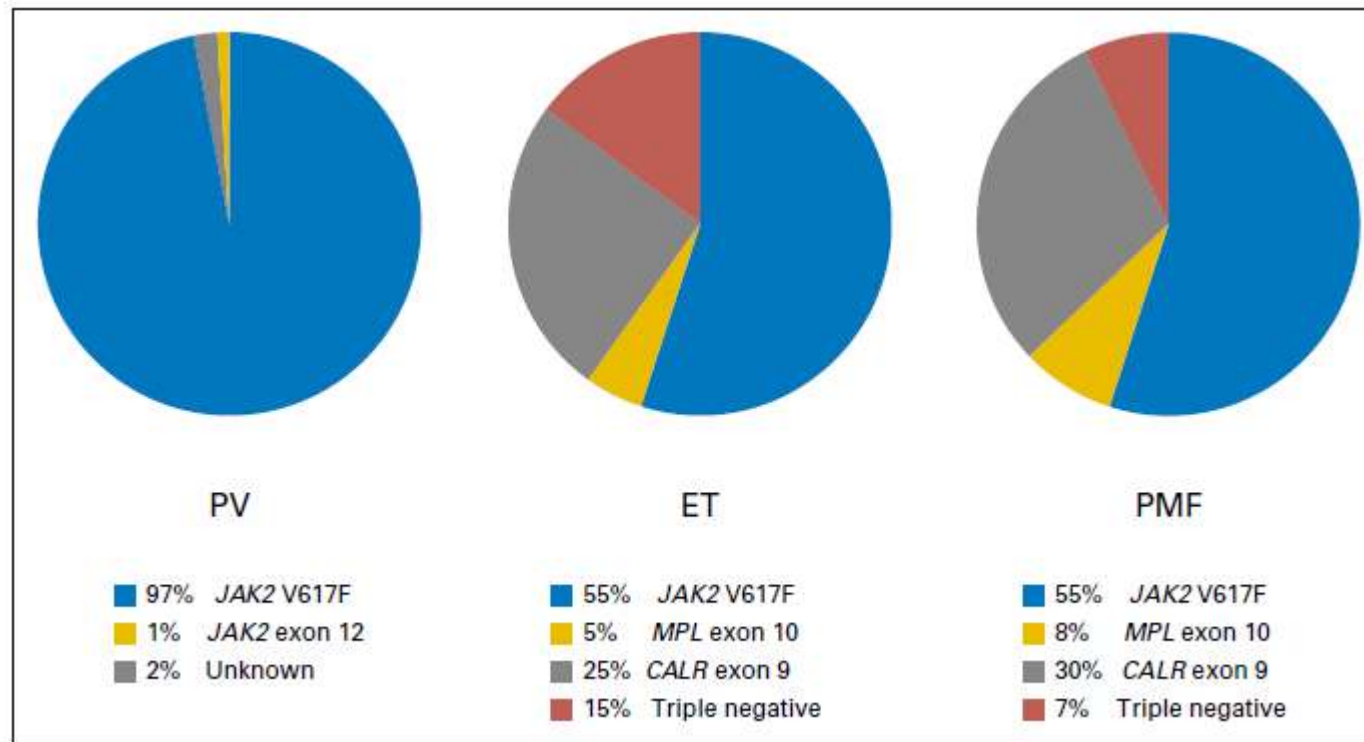
Implicancia clínica mutaciones exòn 9 CALR

- ✓ La evolución clínica de los pacientes con mutaciones en el exón 9 del gen CALR es más indolente que la de los pacientes con mutaciones en JAK2.
- ✓ En el caso de la TE, los pacientes con CALR mutado presentan respecto a los JAK2 mutados, cifras superiores de plaquetas e inferiores de leucocitos y hemoglobina.
- ✓ En el caso de MFP, los pacientes con CALR mutado tienen menor probabilidad de desarrollar anemia, trombocitopenia, leucocitosis, y tienen menor requerimiento transfusional.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Frecuencia de las mutaciones en JAK2, MPL y CALR



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Pacientes triple negativos

Los pacientes con ausencia de mutaciones en JAK2, MPL y CALR son los que presentan peor pronóstico.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

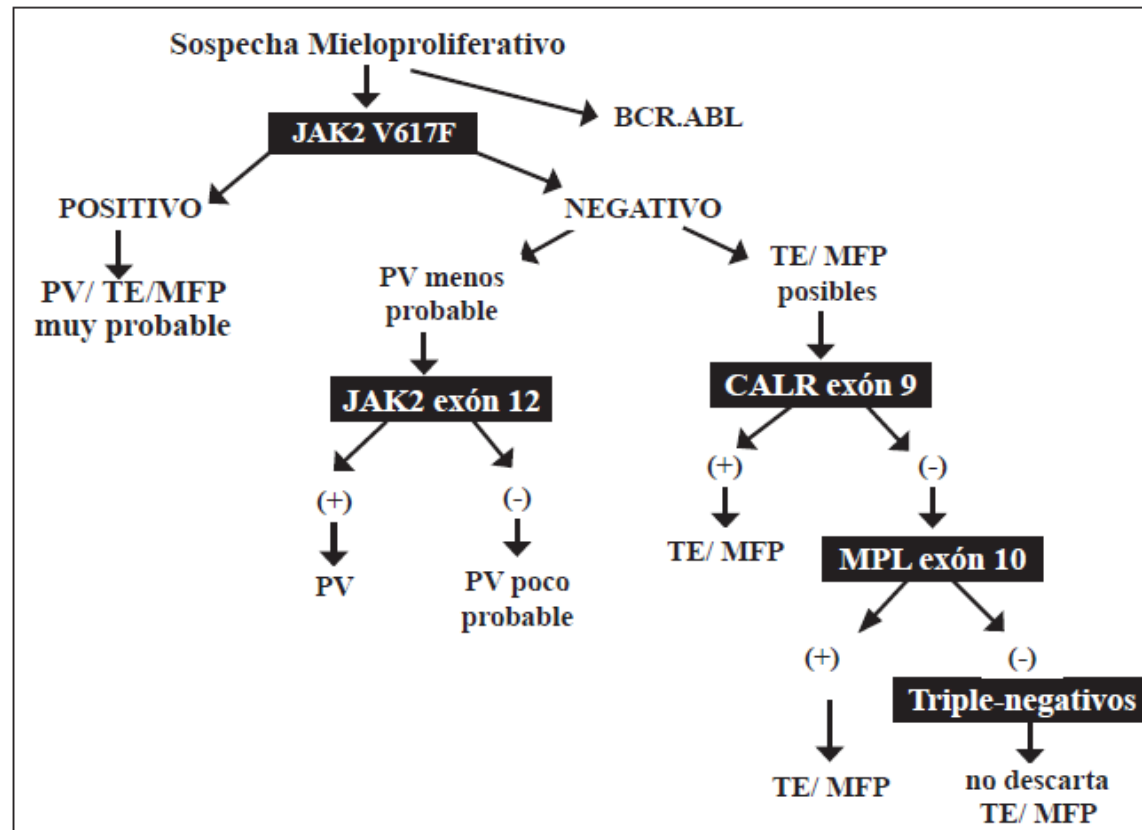
Mutaciones cooperadoras

- ✓ Las mutaciones cooperadoras se encuentran en reguladores:
 - epigenéticos: TET2, IDH1/2, ASXL1, EZH2, DNMT3
 - de la maquinaria de splicing del ARN: SRSF2, U2AF1, SF3B1
 - transcripcionales: TP53, IKZF1, NF-E2, CUX1
- ✓ No son específicas de los NMPCC sino que también se encuentran en síndromes mielodisplásicos y leucemias mieloides agudas.
- ✓ Están involucradas en el proceso de transformación neoplásica y se asocian con progresión de la enfermedad.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Alteraciones moleculares de los NMPCC

Algoritmo de estudio molecular



Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- **Neoplasmas mieloproliferativos atípicos**
 - **Leucemia Neutrofilica Crónica**
 - **Leucemia Eosinofílica Crónica**
 - **Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables**

Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

NMPs atípicos

- ✓ **Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC)**
- ✓ **Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC)**
- ✓ **Neoplasmas Mieloproliferativos no clasificables**

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Neutrofílica Crónica – LNC

- ✓ La LNC es un subtipo raro de NMP que comparte ciertas características con la LMC atípica. Se caracteriza por leucocitosis e hiper celularidad en la médula ósea (predominantemente granulocitos).
- ✓ Debido a la falta de marcadores moleculares diagnósticos o pronósticos, el diagnóstico se hace por exclusión de otras patologías. Aunque recientemente se han identificado mutaciones en el gen *CSF3R* que podrían ser potencialmente marcadores de LNC.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Neutrofílica Crónica – LNC

CSF3R

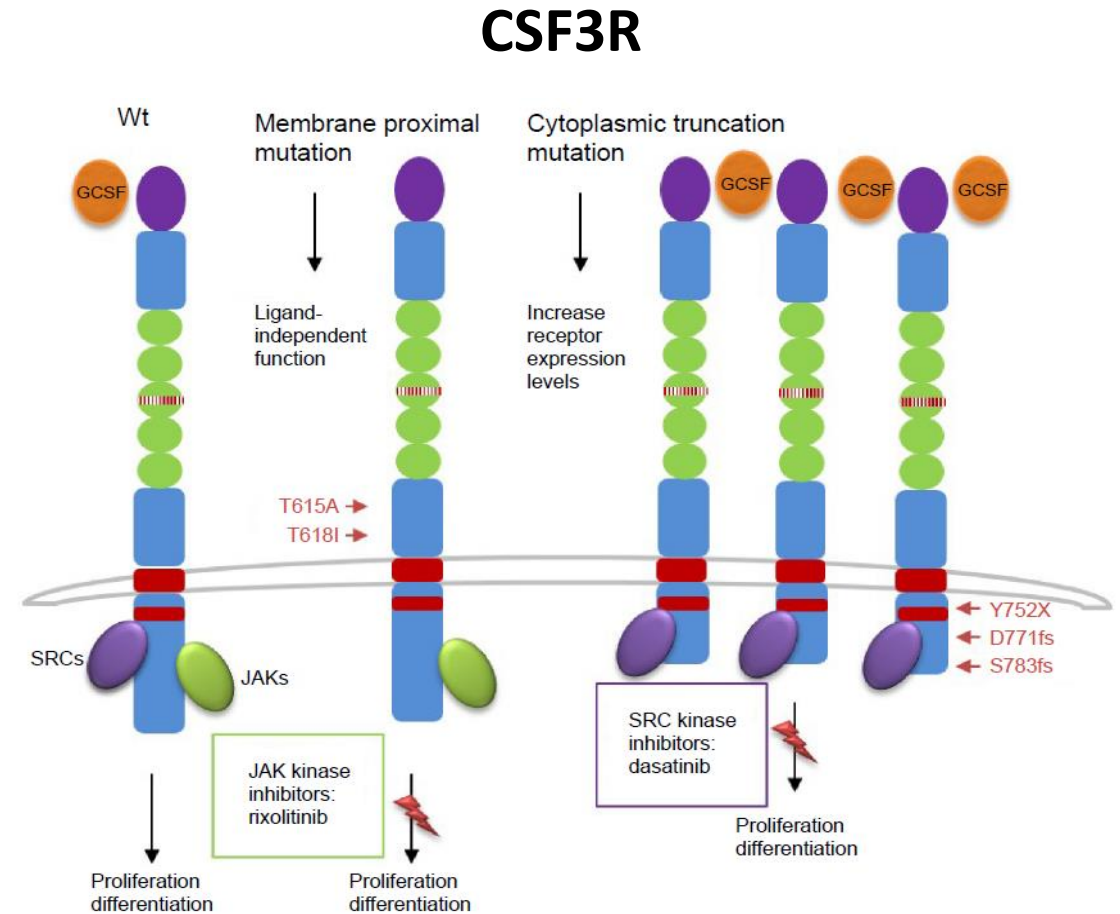
- ✓ Las mutaciones recientemente identificadas en este gen se han definido como el evento genético común en los pacientes con LNC, siendo un marcador potencialmente útil para el diagnóstico y como blanco terapéutico.
- ✓ Codifica para el receptor transmembrana del factor estimulador de los granulocitos, CSF3, el cual provee las señales de proliferación a los granulocitos y contribuye también con su diferenciación y función.
- ✓ Se han descrito dos tipos de mutaciones, las que generan un **corrimiento en el marco de lectura** y en consecuencia se produce una proteína que se trunca prematuramente en la cola citoplasmática, y las mutaciones **puntuales** en el dominio extracelular, donde la más frecuente es la mutación **T618I**.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Neutrofílica Crónica – LNC

La señalización downstream se da a través de las rutas de señalización que involucran a las tirosín quinasa JAK y SRC.

Las mutaciones en CSF3R que truncan la proteína operan a través de la ruta SRC, siendo sensibles a los inhibidores de esta quinasa; mientras que las mutaciones próximas a la membrana activan la ruta JAK/STAT, siendo sensibles a los inhibidores de JAK.



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) y neoplasmas mieloproliferativos crónicos no clasificables

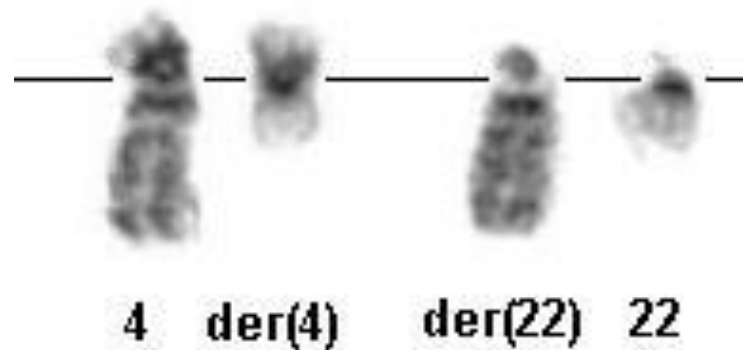
- ✓ La LEC es una subcategoría dentro de los NMP en la cual la población eosinófila es la principal característica. La presencia de marcadores clonales permite distinguirla de los síndromes hipereosinofílicos idiopáticos.
- ✓ Los últimos avances en biología molecular han demostrado que gran parte de los cuadros que eran interpretados como síndromes hipereosinofílicos idiopáticos, estarían asociados a mutaciones genéticas que desregulan receptores con actividad tirosina quinasa. Los receptores involucrados son: receptores de factores de crecimiento derivado de plaquetas, **PDGFR alfa**, **PDGFR beta** y el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos, **FGFR1**. Estos avances han permitido comprender mejor la patogénesis de la enfermedad y desarrollar nuevas modalidades terapéuticas como inhibidores de tirosina quinasa por ejemplo.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) y neoplasmas mieloproliferativos crónicas no clasificables

- ✓ Alteraciones genéticas en *PDGFR alfa*:

Detectables por estudios citogenéticos: translocación entre el cromosoma 4 y el 22, $t(4;22)(q12;q11)$, la proteína quimérica contiene el extremo amino terminal del gen *BCR* y el dominio completo con actividad tirosina quinasa del gen *PDGFRA*.

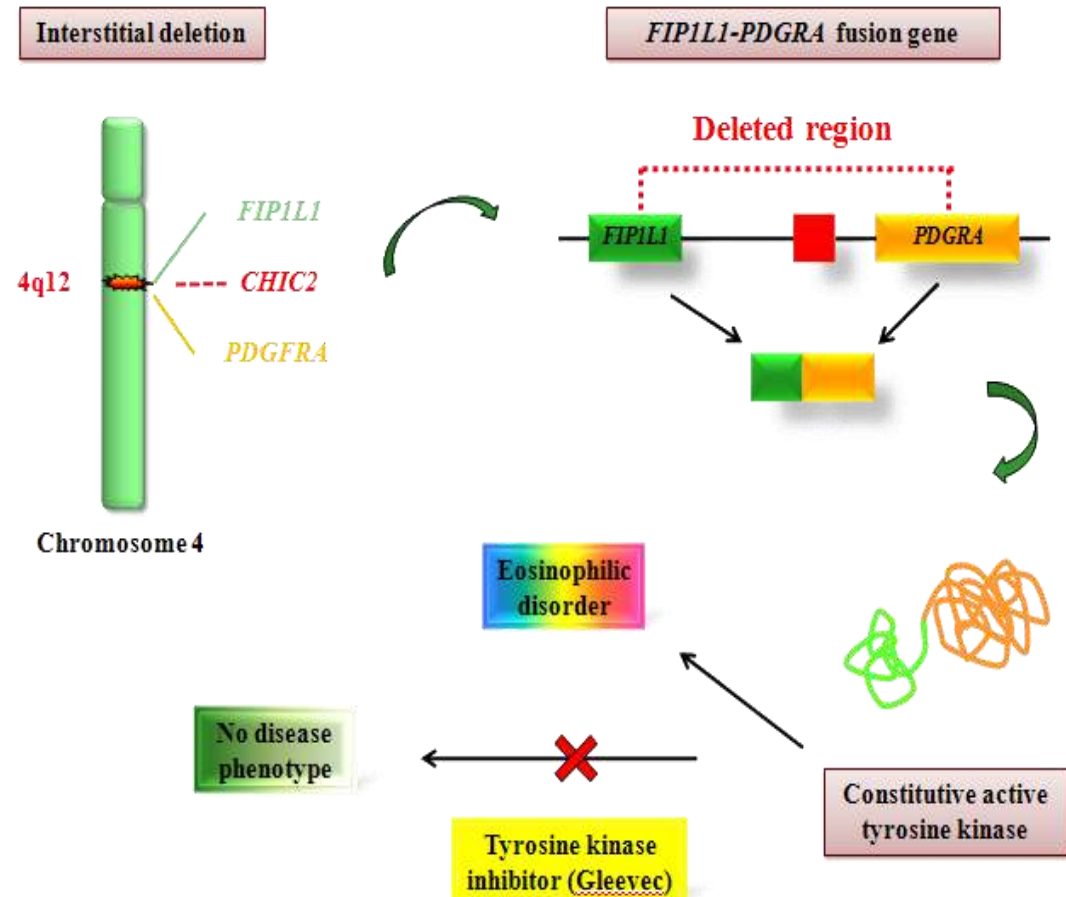


Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) y neoplasmas mieloproliferativos crónicas no clasificables

✓ Alteraciones genéticas en *PDGFR alfa*:

No detectables por estudios citogenéticos: deleción de 800 kb que involucra al cromosoma 4 y resulta en la yuxtaposición del extremo 3' del gen *PDGFRA* con el extremo 5' del gen *FIP1L1*, dando como resultado el gen de fusión ***FIP1L1 – PDGFRA*** que codifica para una proteína tirosina quinasa constitutivamente activa.

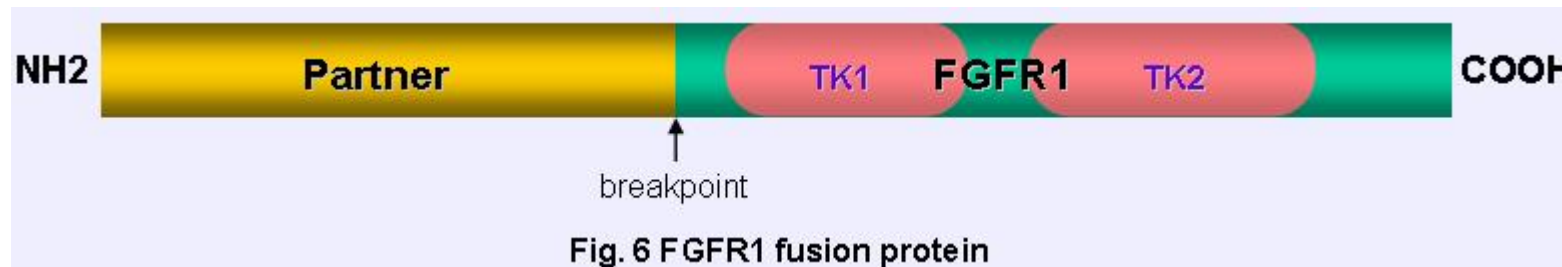


Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) y neoplasmas mieloproliferativos crónicas no clasificables

✓ Alteraciones genéticas en *FGFR1*:

FGFR1 está ubicado en el cromosoma 8 y su activación constitutiva se produce por la formación de proteínas de fusión a través de translocaciones con otros cromosomas.



Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) y neoplasmas mieloproliferativos crónicas no clasificables

- ✓ Estudios recientes realizados mediante NGS permitieron demostrar marcadores clonales en pacientes que de otro modo hubieran sido clasificados con hipereosinofilia idiopática, demostrando el valor de los estudios genómicos en estos pacientes.
- ✓ A la fecha no hay marcadores para los NMP no clasificables pero es posible que las nuevas tecnologías de secuenciación masiva colaboren en un mejor entendimiento de estas patologías.

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

Conclusiones

- ✓ *La revisión 2016 de la OMS para la clasificación de neoplasmas mieloproliferativos ha incorporado el testeo de “mutaciones driver” como un componente esencial en el algoritmo diagnóstico.*
- ✓ *La presencia del marcador BCR-ABL1 define la LMC, pero tiene que excluirse en el caso de NMP.*
- ✓ *En la actualidad el abordaje de estas patologías se hace mediante la combinación de técnicas citogenéticas y moleculares (FISH, RT PCR, q RT PCR, secuenciación sanger y NGS) y se espera que en el corto plazo sean reemplazadas por avances en el estudio genómico de las mismas como la secuenciación del RNA.*

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva



Genómica de las leucemias agudas

Clasificación de leucemias agudas según la OMS

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

AML with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*

AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

APL with *PML-RARA*

AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*

AML with t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*

AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*

AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*

Provisional entity: AML with BCR-ABL1

AML with mutated *NPM1*

AML with biallelic mutations of *CEBPA*

Provisional entity: AML with mutated RUNX1

AML with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

AML, NOS

AML with minimal differentiation

AML without maturation

AML with maturation

Acute myelomonocytic leukemia

Acute monoblastic/monocytic leukemia

Pure erythroid leukemia

Acute megakaryoblastic leukemia

Acute basophilic leukemia

Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma

Myeloid proliferations related to Down syndrome

Transient abnormal myelopoiesis (TAM)

Myeloid leukemia associated with Down syndrome

Acute leukemias of ambiguous lineage

Acute undifferentiated leukemia

Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*

MPAL with t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged

MPAL, B/myeloid, NOS

MPAL, T/myeloid, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); *ETV6-RUNX1*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) *IL3-IGH*

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like

Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21

T-lymphoblastic leukemia/lymphoma

Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia

Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

Genómica de las leucemias agudas

- **Leucemia Mieloide Aguda**
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva

Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Mieloide Aguda – LMA

- ✓ Las LMAs resultan de la proliferación clonal de células precursoras hematopoyéticas anormales con diferentes grados de diferenciación que infiltran la médula ósea y en ocasiones, otros órganos y sistemas.
- ✓ Representan entre el 15 y 20% de las leucemias agudas en niños y adolescentes, y hasta el 80% en adultos.

Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Mieloide Aguda – LMA

Estudio citogenético – molecular

- ✓ El estudio citogenético convencional (bandeo G) es mandatorio en la evaluación diagnóstica permitiendo su clasificación y definiendo subgrupos de riesgo.
- ✓ Aproximadamente el 55% de los pacientes presentan alteraciones citogenéticas, y en niños hasta el 80-85%.

Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Mieloide Aguda – LMA

Factores pronósticos

El cariotipo y determinadas alteraciones moleculares son los factores pronósticos más importantes para predecir la probabilidad de obtener una respuesta completa. Se definen tres grupos: favorable, intermedio y adverso.

Grupo genético	Subtipos
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11 NPM1 mutado in FLT3-ITD/FLT3-ITD BAJO CEBPA mutación bialélica
Intermedio	NMP1 mutado y FLT3-ITD ^(alto) NPM1 no mutado sin FLT3-ITD/FLT3-ITD bajo (sin alt. genéticas de riesgo adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o desfavorables.
Adverso	inv(3)(q21.3;q26.2);t(3;3)(q21.3;q26.2);GATA2, MECOM t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23.3); KMT2A (MLL) reordenado t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 -5 o del(5q); -7; -17/alt(17p); cariotipo complejo, cariotipo monosomal NMP1 no mutado y FLT3-ITD ^(alto) RUNX1 mutado ASXL mutado TP53 mutado

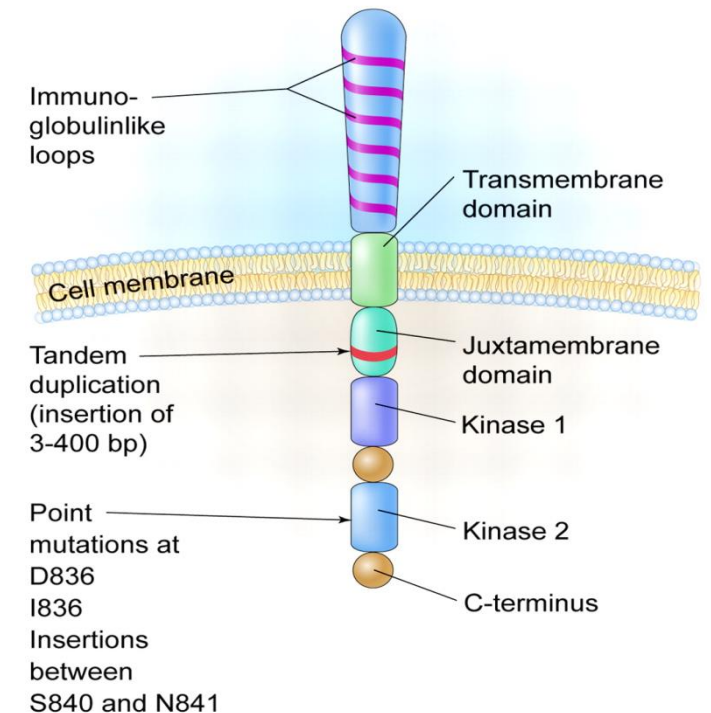
Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Mieloide Aguda – LMA

Factores pronósticos

En el grupo de pacientes con cariotipo normal, la identificación de mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*, predice la respuesta a los tratamientos quimioterapéuticos de inducción y consolidación.

FLT3 es un receptor tirosina quinasa cuya activación juega un rol crítico en la hematopoyesis normal y en el crecimiento celular. Las mutaciones en FLT3 se encuentran entre las de mayor prevalencia en LMA. La **duplicación interna en tándem (ITD)** de la secuencia codificante del dominio yuxtamembrana y mutaciones sin sentido en el loop de activación (**TKD**) del dominio tirosina quinasa, están asociadas con un alto riesgo de recaída y peor pronóstico.



Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Mieloide Aguda – LMA

Factores pronósticos

La nucleofosmina (**NPM1**) es una proteína de localización nucleocitoplasmática. Entre sus funciones se destacan la prevención de la agregación proteica en el nucleolo y la regulación del ensamblaje y transporte de partículas pre-ribosomales a través de la membrana nuclear. Se ha demostrado que la presencia de mutaciones en el gen *NPM1* que conllevan a una localización citoplasmática de la proteína, es característica de un tipo de LMA que **responde bien a la quimioterapia de inducción**. Es por ello que el análisis del estado mutacional de *NPM1* es útil como factor pronóstico.

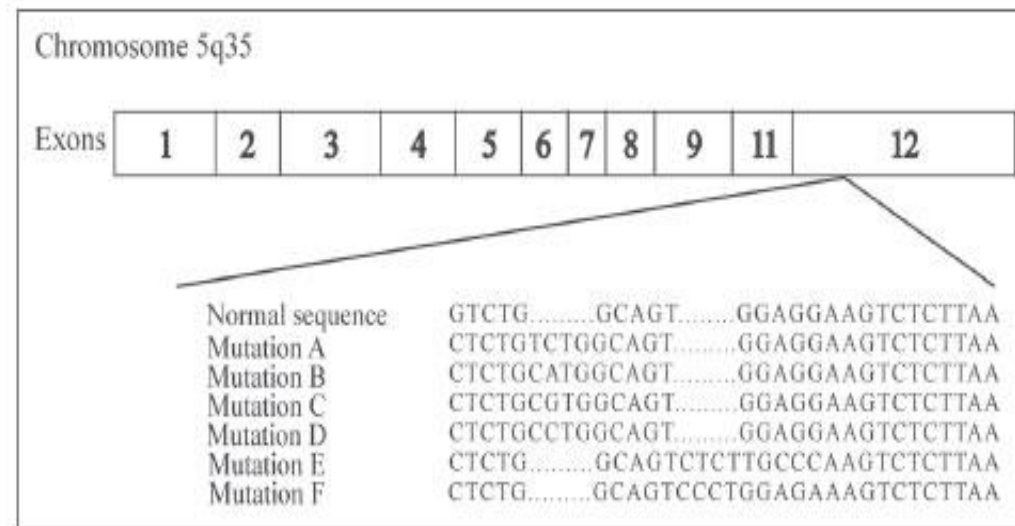


Figure 1. Diagram of the NPM1 gene mutations. Adapted from Grisendi et al.⁽¹⁹⁾

Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Mieloide Aguda – LMA

Factores pronósticos

CEBPA es un factor de transcripción expresado exclusivamente en el linaje mielocítico. Se encuentra implicado en la diferenciación granulocítica y maduración de neutrófilos.

Mutaciones descritas en el mismo, se asocian con un **buen pronóstico en pacientes con LMA**.

Las mutaciones en el gen *CEBPA* asociadas a LMA pueden ser divididas en dos grupos,

- inserciones en la región *bZIP* que contiene los dominios de dimerización y de unión al DNA,
- inserciones y deleciones en la porción N-terminal de la proteína que afectan a los dominios reguladores, TAD 1 y TAD 2, resultando en una proteína acortada.

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

Genómica de las leucemias agudas

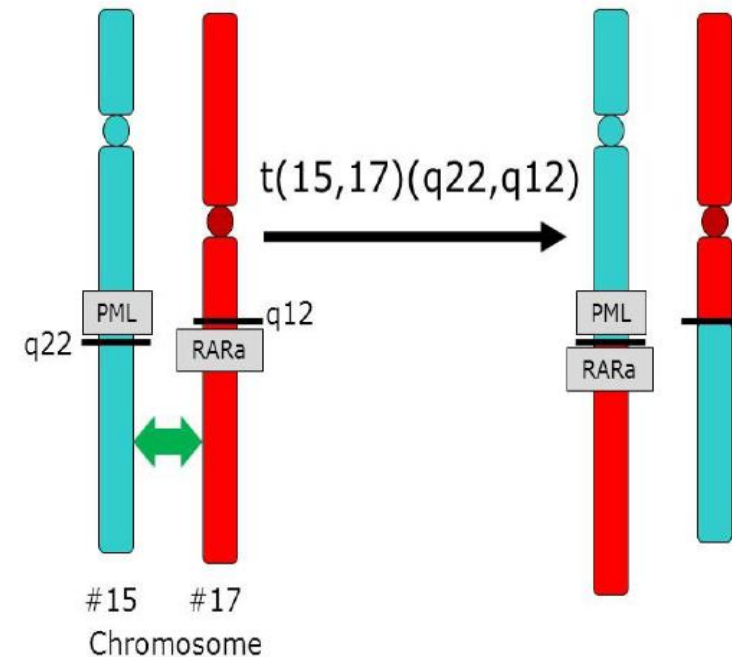
- Leucemia Mieloide Aguda
- **Leucemia Promielocítica Aguda**

Secuenciación masiva

Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Promielocítica Aguda – LPA

La LPA es un subtipo de LMA caracterizada por la translocación del gen *PML* en el cromosoma 15 con el gen *RAR* en el cromosoma 17, generando una proteína de fusión PML-RAR, y en consecuencia un bloqueo en la diferenciación mieloide y una acumulación de promielocitos leucémicos.



Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Promielocítica Aguda – LPA

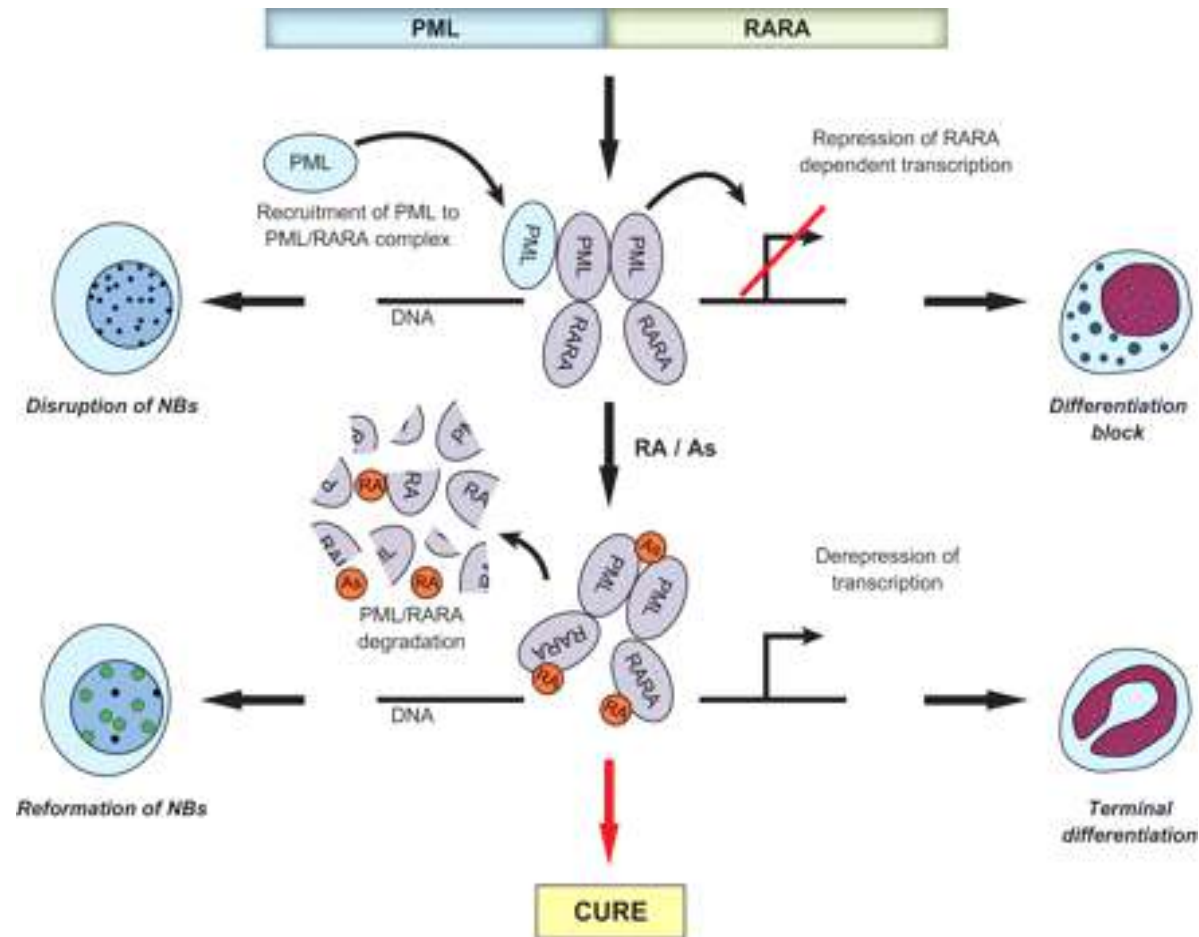
Es una patología muy agresiva por su evolución hiperaguda potencialmente fatal que constituye una neoplasia única en cuanto a que con tratamientos dirigidos suele curarse.

Representa una emergencia médica con alta mortalidad temprana por hemorragia.

Según la clasificación de la OMS se encuentra en el subgrupo de LMA con anomalías genéticas recurrentes y de riesgo bajo de recaída.

Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Promielocítica Aguda – LPA



Genómica de las leucemias agudas

Leucemia Promielocítica Aguda – LPA

Estudios citogenéticos y moleculares

La frecuencia de la translocación $t(15;17)(q22;q21)$ que causa la fusión del gen *RAR* (receptor del ácido retinoico) en el cromosoma 17 y el gen *PML* (promyelocytic leukaemia) en el cromosoma 15, es superior al 98% en los pacientes con LPA.

Esta alteración puede detectarse mediante un cariotipo, FISH o RT PCR.

Un 10% de los casos presenta formas crípticas que no pueden ser detectadas por estudios citogenéticos y deben estudiarse mediante FISH o RT PCR.

La presencia de alteraciones citogenéticas adicionales a la $t(15;17)$ no modifican el pronóstico.

Existen otras variantes citogenéticas que se pueden detectar por estudios citogenéticos y FISH:

- $t(11;17)(q23;q21)$ genera el transcritto PLZF-RAR resistente a ATRA
- $t(11;17)(q13;q21)$ genera el transcritto NuMA-RAR con respuesta variable al ATRA
- $t(5;17)(q35;q21)$ genera el transcritto NPM1-RAR con respuesta variable al ATRA

Programa

Introducción

Genómica de los neoplasmas mieloproliferativos

- Leucemia Mieloide Crónica
- Neoplasmas mieloproliferativos crónicos clásicos
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis idiopática
- Neoplasmas mieloproliferativos atípicos
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Neoplasmas mieloproliferativos no clasificables

Genómica de las leucemias agudas

- Leucemia Mieloide Aguda
- Leucemia Promielocítica Aguda

Secuenciación masiva

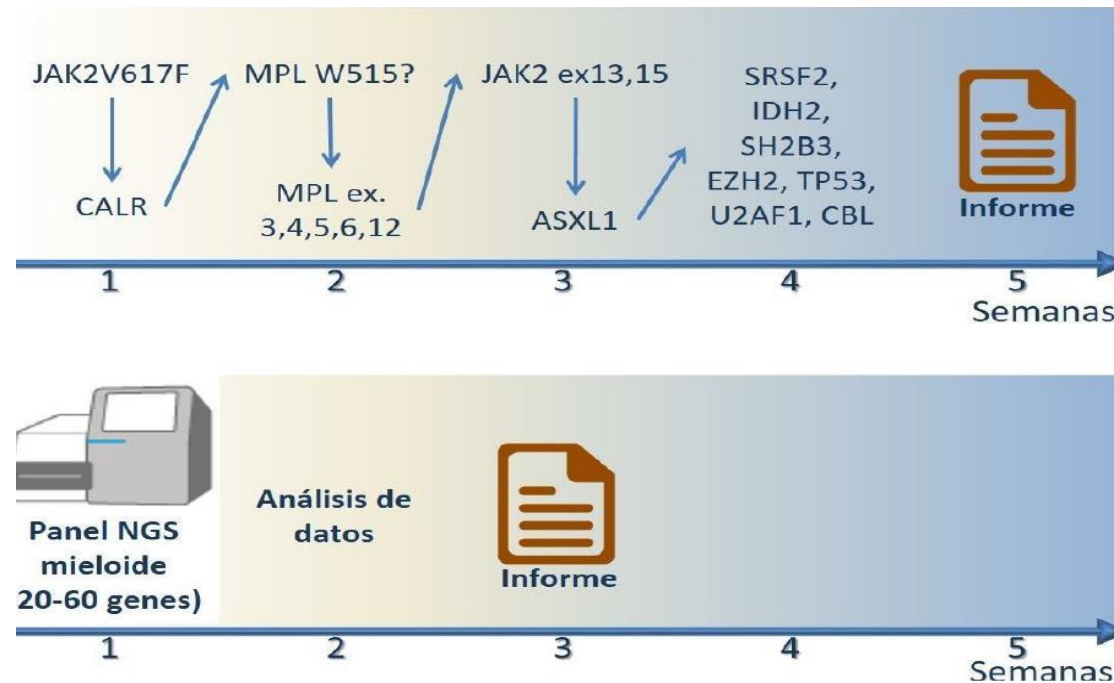
Secuenciación masiva en el diagnóstico integrado de neoplasmas hematológicos

- ✓ La cantidad de **nuevos datos moleculares** disponibles gracias al uso de las **técnicas de secuenciación** han transformado la comprensión de la fisiopatología de las neoplasias hematológicas, abriendo una puerta para la implementación de nuevos marcadores a los algoritmos actuales, transformando el diagnóstico genético en genómico.



Secuenciación masiva en el diagnóstico integrado de neoplasmas hematológicos

- ✓ En la actualidad existen paneles capaces de analizar simultáneamente regiones de 20 – 60 genes seleccionados en base a la relevancia en la patología a estudiar, haciendo el proceso menos costoso y reduciendo los tiempos de respuesta, además de permitir la detección de clones emergentes que pueden colaborar en el seguimiento y pronóstico de la enfermedad, como también detectar cambios asociados a resistencia al tratamiento.



Secuenciación masiva en el diagnóstico integrado de neoplasmas hematológicos

Variant List

Seraseq™ Myeloid Reference Materials

23 mutations in the Seraseq Myeloid Mutation DNA Mix

Gene ID	HGVS	Prot	COSMIC ID	RAF	Variant Type
ABL1	C24642>T	p.T315I	12640	50%	SNV
ASXL1	c.19302_30298G>T	p.R6159*E	36765	50%	Deletion
ASXL1	c.21994_20289del	p.G4661*F	24791	50%	Deletion
B2M1	c.11957T>A	p.Y399N	476	50%	SNV
CALR	c.10242_14336del	p.L3377*H46	178955	5%	Deletion
CBL	c.10290A>G	p.R402Q	14077	5%	SNV
CBL	c.10317C>G	p.L380P	14055	50%	SNV
CEBPA	c.6183G>C	p.R2047*H8	18922	5%	Insertion
CEBPA	c.951_940insAAG	p.R131_Y149insK	18959	5%	Insertion
CFP1	c.1863C>T	p.R58I	175962	5%	SNV
FLT3	c.1559_3005del	N/A	N/A	5%	Internal tandem duplication
FLT3	duplication of (GTTT)316-320-330-330-337T (PheT)4, TAGCCCCC between duplicated and native seq.	N/A	N/A	50%	Internal tandem duplication + 5 bp insert
FLT3	c.1559delT	p.R529Y	781	50%	SNV
JAK2	c.1554C>T	p.R476C	20181	5%	SNV
JAK2	c.15460T>C	p.R507H	13200	5%	SNV
JAK2	c.13242_13288delATGAA	p.R4142_E4148del	24440	50%	Deletion
MPL	c.15440C>T	p.R475L	1699	5%	SNV
MYD88	c.17917C>G	p.L525P	83940	50%	SNV
NPM1	c.861_844delCTG	p.W208*H72	17559	5%	Insertion
SP1B1	c.2008A>G	p.R700K	84677	5%	SNV
SP1B1	c.1996G>T	p.R699K	18927	5%	SNV
SS181	c.134_107delAAG	p.P5L_D103del	14239	5%	Deletion
UGAP1	c.1301C>T	p.S34F	16366	50%	SNV

Nine RNA fusions in the Seraseq

Gene ID	HGVS
BCR-ABL1	BCR[NM_004327.2]:1-1275-ABL[NM_005319.2]:341-1
ETV6-ABL1	ETV6[NM_005087.4]:1-142-ABL[NM_005319.2]:1552-2
ETV6-ABL1 (truncated)	ETV6[NM_005087.4]:1-1000-ABL[NM_005319.2]:1552-2
PDGFRA-PDGFRB	PDGFRA[NM_002097.3]:1-1022-PDGFRB[NM_002066.2]:1-13
MYST1-CREBBP1	MYST1[NM_003626.4]:1-1713-CREBBP1[NM_004823.2]:1-14
POU1F1-JAK2	POU1F1[NM_004971.3]:1-184-JAK2[NM_004492.3]:153-4
PNK1-DAB2	PNK1[NM_002828.2]:1-1024-DAB2[NM_000964.3]:1-179
RUN1-ALU10T1	RUN1[NM_001584.2]:1-14-RUN1T1[NM_004548.3]:1-1
TOP2A-TOP2B	TOP2A[NM_001200.3]:1-124-TOP2B[NM_002846.3]:246-1

Serasesq myeloid reference materials commonly available myeloid assays

- Thermo Fisher OncoPrint® assay
- Archer® VariantPlex® and FusiC
- Illumina TruSight® Myeloid Seq
- Qiagen QIAseq® Targeted DN

Note that there may be difference due to specific assay characteristics and protocols and specifications

[Learn more at www.serasq.com](http://www.serasq.com)



ARCHER® VariantPlex® Myeloid Kit

Home / VariantPlex Assays / VariantPlex Myeloid Kit

Introduction

The Archer® VariantPlex® Myeloid sequencing panel for AML, MPN, malignancy markers. Powered by (AMP™) chemistry, the panel encodes amplification of molecular barcodes for sequencing.



Flexible NGS assays for hematopathology applications

TruSight™ Myeloid Sequencing Panel

Using expert-defined content and proven next-generation sequencing (NGS) technology to identify somatic mutations in hematologic malignancies.

- myelodysplastic syndromes (MDS)
- Non-Hodgkin and other B-cell lymphomas

Click your application of interest to view tech notes, videos and other supporting content or to contact a member of the Archer team for more technical information.

FLT3-ITDs



Superior coverage + powerful bioinformatics enable detection of traditionally difficult regions like internal tandem duplications.

Heme fusions



AMP chemistry utilizes open-ended targeted amplification to identify gene fusions whether or not the fusion partner is known.

Clonality



MDS assays that uniquely tag and amplify V(D)J rearrangements for clonality and other immune repertoire applications.



OncoPrint Comprehensive Assay v3

Empower your oncology research with proven Ion Torrent technology

GENOMIC TESTING

FOUNDATIONONE® HEME

CANCER TYPE
Hematologic Malignancies, Sarcomas

Assay for hematologic malignancies and sarcomas including but not limited to: Leukemias, Myelodysplastic Syndromes, Myeloproliferative Neoplasms, Lymphomas, Multiple Myeloma, Ewing Sarcoma, and Leiomyosarcoma

OncoHeme Next-Generation Sequencing (NGS), Hematologic Neoplasms

Overview Specimen Clinical and Interpretive Performance Fees and Coding Test Setup

Useful For

Evaluation of hematologic neoplasms at the time of diagnosis, to assist in appropriate classification and prognosis

Determining the presence of new clinically important gene mutation changes at relapse

Genetics Test Information

This test includes next-generation sequencing to evaluate for the following 35 genes and intronic regions: ASXL1, BCOR, BRAF, CALR, CBL, CEBPA, CSF3R, DNMT3A, ETV6, EZH2, FLT3, GATA1, GATA2, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PHF6, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1,

PANEL DE NGS PARA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC)

LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC) CONSTITUYE UN TERCIO DE LAS LEUCEMIAS DE ADULTOS EN PAÍSES OCCIDENTALES



CENTRO DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO Y FENOTÍPICO INTEGRAL
COMPREHENSIVE GENETIC AND PHENOTYPIC DIAGNOSTIC CENTER

Secuenciación masiva en el diagnóstico integrado de neoplasmas hematológicos

TruSight™ Myeloid Sequencing Panel

Using expert-defined content and proven next-generation sequencing (NGS) technology to identify somatic mutations in hematologic malignancies.

Gene	Target Region (exon)	Gene	Target Region (exon)	Gene	Target Region (exon)	Gene	Target Region (exon)
<i>ABL1</i>	4-6	<i>DNMT3A</i>	full	<i>KDM6A</i>	full	<i>RAD21</i>	full
<i>ASXL1</i>	12	<i>ETV6/TEL</i>	full	<i>KIT</i>	2,8-11,13,17	<i>RUNX1</i>	full
<i>ATRX</i>	8-10,17-31	<i>EZH2</i>	full	<i>KRAS</i>	2,3	<i>SETBP1</i>	4 (partial)
<i>BCOR</i>	full	<i>FBXW7</i>	9-11	<i>MLL</i>	5-8	<i>SF3B1</i>	13-16
<i>BCORL1</i>	full	<i>FLT3</i>	14,15,20	<i>MPL</i>	10	<i>SMC1A</i>	2,11,16,17
<i>BRAF</i>	15	<i>GATA1</i>	2	<i>MYD88</i>	3-5	<i>SMC3</i>	10,13,19,23,25,28
<i>CALR</i>	9	<i>GATA2</i>	2-6	<i>NOTCH1</i>	26-28,34	<i>SRSF2</i>	1
<i>CBL</i>	8,9	<i>GNAS</i>	8,9	<i>NPM1</i>	12	<i>STAG2</i>	full
<i>CBLB</i>	9,10	<i>HRAS</i>	2,3	<i>NRAS</i>	2,3	<i>TET2</i>	3-11
<i>CBLC</i>	9,10	<i>IDH1</i>	4	<i>PDGFRA</i>	12,14,18	<i>TP53</i>	2-11
<i>CDKN2A</i>	full	<i>IDH2</i>	4	<i>PHF6</i>	full	<i>U2AF1</i>	2,6
<i>CEBPA</i>	full	<i>IKZF1</i>	full	<i>PTEN</i>	5,7	<i>WT1</i>	7,9
<i>CSF3R</i>	14-17	<i>JAK2</i>	12,14	<i>PTPN11</i>	3,13	<i>ZRSR2</i>	full
<i>CLX1</i>	full	<i>JAK3</i>	13				

Highlights

- Expert-defined content**
 Designed by a consortium of recognized experts to target 54 genes mutated frequently in myeloid malignancies
- Streamlined, comprehensive method**
 Single workflow includes library preparation, sequencing, data analysis, and data annotation
- Cost-effective, time-efficient solution**
 Assess multiple genes simultaneously for approximately the same cost as a single-gene assay
- High accuracy and analytical sensitivity**
 Limit of detection down to 5% mutant allele frequency with 500x minimum coverage of each region



Secuenciación masiva en el diagnóstico integrado de neoplasmas hematológicos

- ✓ En la actualidad, estamos atravesando un cambio de paradigma en el diagnóstico oncohematológico, con la incorporación del concepto de **medicina de precisión** o **medicina personalizada**, en donde la terapia es individualizada en base a las características genéticas y moleculares de los tumores.
- ✓ Hace tres décadas se vivió una situación similar con la incorporación del análisis citogenético. Actualmente tanto el cariotipo como el FISH son esenciales para el diagnóstico, clasificación, estratificación pronóstica y orientación terapéutica en las neoplasias hematológicas.
- ✓ **El nuevo reto es la incorporación de la secuenciación masiva al diagnóstico integrado de estas patologías.**



¡Muchas gracias!

aseravalle@cibic.com.ar



www.heritas.com.ar



info@heritas.com.ar



[Héritas](#)



[HeritasArg](#)