

Mapeo óptico del genoma: fundamentos tecnológicos y aplicaciones en neoplasias hematológicas

Optical genome mapping: technical basis and applications in hematological malignancies

Anna Puiggros^{1,2}, Mar Mallo^{3,4}, Álvaro Díaz-González⁵, Gayane Avetisyan⁵, Adela Cisneros⁶, Rosa Collado⁷, María García-Hoyos⁸, Rocío García-Serra^{7,9}, Cristian García-Ruiz⁵, Eulàlia Genescà¹⁰, Ana Gómez-García¹¹, Celia González¹⁰, Mariam Ibáñez⁷, Joanna Kamaso^{1,2}, Manuel Ramírez-Orellana¹², María Rodríguez-Rivera^{1,2}, Marta Salido^{1,2}, Esperanza Such^{5,13,14}, Francesc Solé⁴, Sara Álvarez-De Andrés⁸, Isabel Granada⁶ y Blanca Espinet^{1,2*}, en nombre del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y de la Comisión de Genética Oncohematológica de la Asociación Española de Genética Humana (AEGH)

¹Laboratorio de Citogenética Molecular, Servicio de Patología, Hospital del Mar, Barcelona; ²Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, Programa de Recerca en Càncer, Institut de Recerca Hospital del Mar (IMIM), Barcelona; ³Unidad de Microarrays, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Instituto Catalán de Oncología-Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; ⁴Grupo de SMD, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Instituto Catalán de Oncología-Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; ⁵Grupo de Investigación en Hematología y Hemoterapia, Instituto de Investigación La Fe, Valencia; ⁶Laboratorio de Citogenética, Servicio de Laboratorio de Hematología, Hospital Germans Trias i Pujol, Instituto Catalán de Oncología, Barcelona; ⁷Servicio de Hematología, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia; ⁸Departamento Médico, NIMGenetics, Madrid; ⁹Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, Valencia; ¹⁰Equipo LLA-T-Grupo de LLA, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Instituto Catalán de Oncología-Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; ¹¹Laboratorio de Oncohematología, Sección de Citogenética, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid; ¹²Servicio de de Oncohematología, Unidad de Terapias Avanzadas, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid; ¹³Servicio de Hematología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia; ¹⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid. España

Resumen

El estudio citogenómico de las neoplasias hematológicas requiere la aplicación de diferentes técnicas para la detección de alteraciones cromosómicas. El mapeo óptico del genoma (OGM) es una nueva tecnología basada en el análisis de moléculas largas de ADN marcadas fluorescentemente en secuencias específicas que generan un patrón único, permitiendo la detección simultánea de alteraciones numéricas y estructurales con una mayor sensibilidad (5%) y precisión que el cariotipo. El objetivo de esta revisión es describir las bases metodológicas y analíticas del OGM, presentar los hallazgos más relevantes publicados y plantear los retos futuros para su implementación en los laboratorios de diagnóstico. Numerosos estudios han demostrado que el OGM potencialmente permitirá realizar el abordaje citogenético de los pacientes en un único test, ofreciendo una mayor resolución (5 Kb vs. 5-10 Mb) y una mejor caracterización de las alteraciones que las técnicas convencionales. Esta técnica no está exenta de limitaciones, como la sensibilidad limitada al 20% para las alteraciones del número de copias y la incapacidad de detectar reordenamientos centroméricos o teloméricos. Su implementación requerirá una estandarización de los criterios de análisis y la validación de nuevas alteraciones, así como estudios prospectivos para definir en qué afecciones y situaciones podrá complementar o reemplazar a los métodos actuales.

Palabras clave: Mapeo óptico del genoma. Citogenética. Hibridación in situ fluorescente. Microarrays genómicos. Citogenómica. Neoplasias hematológicas.

*Correspondencia:

Blanca Espinet
E-mail: bespinet@psmar.cat

Fecha de recepción: 26-06-2023
Fecha de aceptación: 26-07-2023
DOI: 10.24875/SANGRE.23000013

Disponible en internet: 14-12-2023
Sangre. 2023;42(2):83-98
www.revistasangre.com

0036-4355 / © 2023 Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Publicado por Permanyer. Éste es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abstract

Cytogenomic analyses of hematological malignancies require the application of different techniques, isolated or combined, for the detection of chromosomal alterations. Optical genomic mapping (OGM) is a new technology based on the analysis of long DNA molecules fluorescently labelled in specific sequences that generate a unique pattern, allowing the simultaneous detection of numerical and structural alterations with higher sensitivity (up to 5%) and precision than karyotyping. The aim of this review is to describe the methodological and analytical basis of OGM, to present the most relevant published findings and to raise future challenges for its implementation in diagnostic laboratories. Multiple studies have shown that OGM will potentially allow cytogenetic approach of patients in a single test offering higher resolution (5 Kb vs. 5-10 Mb) and better characterization of alterations than conventional techniques. This technique also presents some limitations such as a sensitivity limited to 20% for copy number alterations, or the incapacity to detect rearrangements affecting centromeric and/or telomeric regions. Its implementation in routine diagnosis will require standardization of analysis criteria, validation of many of the new alteration identified by the technique, as well as comparative prospective studies to define in which entities and situations it can complement and/or replace current methods.

Keywords: Optical genome mapping. Cytogenetics. Fluorescence in situ hybridization. Genomic microarrays. Hematological malignancies.

Introducción

El estudio citogenómico de las neoplasias hematológicas se basa en la aplicación de diferentes técnicas, de forma aislada o combinada, para la detección de alteraciones cromosómicas con valor diagnóstico, pronóstico o predictivo de respuesta a tratamiento. El cariotipo continúa siendo la técnica estándar en muchas de las neoplasias hematológicas, dado que permite obtener una visión global del genoma y detectar alteraciones tanto numéricas (aneuploidías) como estructurales¹. No obstante, las limitaciones del cariotipo requieren el uso de estudios complementarios con técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) o de *microarrays* genómicos (SNP-array o CGH-array), pero estas también presentan limitaciones, como el análisis parcial del genoma en el caso de FISH, o la imposibilidad de detectar reordenamientos equilibrados y la baja sensibilidad en el caso de los *microarrays* genómicos².

El mapeo óptico del genoma (OGM, *optical enoma mapping*) es una tecnología basada en la obtención de imágenes de moléculas de ADN de alto peso molecular que, marcadas mediante fluorescencia en secuencias específicas, generan un patrón de marcaje único en cada región del genoma. Así, la comparación del patrón de marcaje de cada molécula de ADN con un genoma de referencia permite la detección simultánea de alteraciones numéricas y estructurales (balanceadas y no balanceadas) con una mayor sensibilidad y precisión que el cariotipo (Tabla 1). La tecnología de mapeo óptico fue desarrollada inicialmente por el grupo de Schwartz et al.³, de la Universidad de Wisconsin-Madison, en 1993, y ha sido adaptada en su versión actual por Bionano Genomics®, que ha desarrollado tanto la

química como la tecnología de captura de imágenes hasta alcanzar los niveles de resolución y productividad actuales⁴. Cabe destacar que el OGM no es una técnica de secuenciación y no permite la identificación de cambios en la secuencia de ADN (SNV, *single nucleotide variants*, y pequeñas inserciones o deleciones [indels]).

La tecnología de OGM ha sido probada con éxito en el análisis citogenómico de diferentes neoplasias hematológicas⁵⁻¹³. Numerosos estudios de validación han demostrado que, con una cobertura mínima de 400X, el OGM puede llegar a alcanzar una sensibilidad máxima cercana al 1%, una especificidad del 100% y un valor predictivo positivo superior al 80%. En consecuencia, el OGM se postula como una tecnología con potencial para complementar o reemplazar a las pruebas citogenéticas clásicas en un futuro próximo¹⁴.

El objetivo de esta revisión es describir de forma práctica las bases metodológicas y analíticas del OGM, presentar los hallazgos más relevantes publicados hasta la fecha en las distintas neoplasias hematológicas y plantear los retos futuros para su implementación en los laboratorios de diagnóstico hematológico. Ha sido elaborada de forma consensuada por los miembros del grupo de trabajo de OGM creado en el seno del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia.

Consideraciones técnicas para los estudios de mapeo óptico del genoma

Requisitos preanalíticos

El principal requisito de la técnica de OGM es la extracción de ADN de alto peso molecular (UHMW,

Tabla 1. Sensibilidad máxima y tamaño mínimo detectable según el tipo de alteración

Tipo de alteración	Sensibilidad máxima	Tamaño mínimo detectable	
		Análisis de ADN de línea germinal	Análisis de ADN de muestras tumorales
Inserciones	1%	> 500 pb	> 5 Kb
Deleciones	1%	> 700 pb	> 7 Kb
Duplicaciones	3%	> 30 Kb	> 150 Kb
Inversiones	1%	> 30 Kb	> 70 Kb
Translocaciones balanceadas y no balanceadas	5%	> 70 Kb	> 70 Kb
Variantes de número de copias (> 500 Kb)*	3%	> 500 Kb	> 500 Kb

*Incluye aneuploidías.

ultra-high molecular weight), lo que requiere una cuidadosa preservación y procesamiento inicial de la muestra para evitar la fragmentación del ADN. En general, para asegurar al máximo la viabilidad de las células, es crucial procesar las muestras con la mayor celeridad posible, siendo especialmente relevante en las muestras de médula ósea, en las que es muy importante que sea dentro de las primeras 24 horas posteriores al aspirado de médula ósea. Aunque es posible realizar la extracción del ADN a partir de muestras en fresco, en la práctica la mayoría de los centros optan por congelar (a -80°C) o criopreservar las muestras hasta su procesamiento. En caso de congelar la muestra a -80°C , algunos tipos de muestra (por ejemplo, médula ósea o sangre periférica anticoagulada con heparina) requieren la adición de un reactivo estabilizador del ADN. Una limitación destacable del OGM es que no se puede utilizar ADN previamente extraído por otros métodos, y no se recomienda la extracción de ADN a partir de células congeladas en forma de *pellets* celulares sin previa adición del reactivo estabilizador.

En cuanto a las características de la muestra, es imprescindible disponer de un mínimo de 1,5 millones de células, calculado preferiblemente con contador automático. Cuando se parte de células criopreservadas, además, es importante valorar la viabilidad de dicha muestra, siendo recomendable que sea superior al 50% para minimizar la presencia de ADN degradado procedente de células muertas. Un factor adicional de la técnica que hay que tener en cuenta es la sensibilidad para la detección de mosaicismos, que se sitúa en aproximadamente un 5% para las alteraciones estructurales y un 15-20% para los cambios en el número de copias (CNV, *copy number variations*). Por ello, es recomendable

utilizar muestras con una infiltración superior a estos porcentajes o, cuando sea posible, enriquecer la muestra mediante la selección de la población leucémica.

Procesamiento técnico del mapeo óptico del genoma

El protocolo técnico del OGM se divide en tres etapas: 1) extracción de ADN de alto peso molecular, 2) marcaje enzimático del ADN y 3) captura de las imágenes de ADN marcado (Fig. 1). A continuación, se describe más detalladamente cada una de ellas.

EXTRACCIÓN DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR

Es el punto más crítico de la técnica. El protocolo de extracción incluye los pasos comunes en la extracción de ADN genómico (lisis celular, obtención del ADN, lavados y elución), pero utiliza unos nanodiscos paramagnéticos que previenen la fragmentación y permiten obtener ADN de un tamaño medio superior a 150 Kb. La solución obtenida tiene una alta viscosidad, debido a la presencia de estas moléculas de ADN de cadena larga, siendo necesario realizar un pipeteo cuidadoso durante todo el proceso para evitar su fragmentación. Dada la alta fragilidad del ADN extraído, se recomienda evitar su transporte. En ocasiones, puede ser necesario dejar el ADN a temperatura ambiente 3 días para asegurar su homogenización.

MARCAJE ENZIMÁTICO DEL ADN

Se realiza con un fluoróforo, utilizando enzimas de restricción que reconocen una secuencia específica de 6 pb (CTTAAG) repetida con una periodicidad de aproximadamente 15 veces cada 100 Kb en el genoma

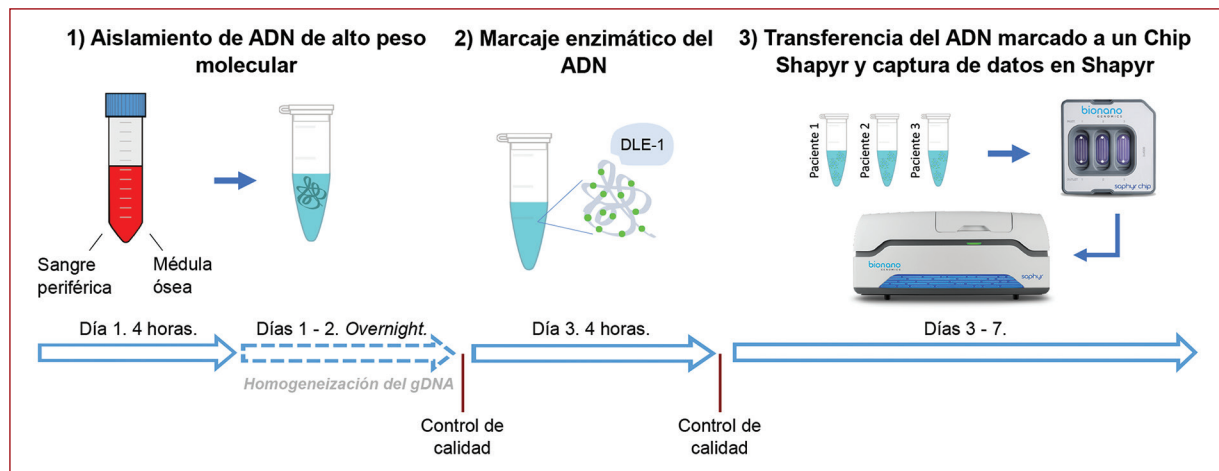


Figura 1. Esquema del procesamiento técnico del mapeo óptico del genoma.

humano (cada 6,6 Kb en promedio, que es la resolución teórica). Este marcaje genera un patrón de etiquetas único, similar al bandeo cromosómico, que permitirá identificar inequívocamente la localización genómica de cada una de las moléculas marcadas. Tras una serie de lavados se realiza una contratinción de las moléculas de ADN con un fluoróforo adicional que permite su visualización durante el escaneo. Aunque la viscosidad elevada de las soluciones de trabajo puede ser un buen indicador, actualmente el protocolo no incluye ningún control de calidad que permita asegurar la longitud de las moléculas antes del escaneo de las muestras.

CAPTURA DE LAS IMÁGENES DEL ADN MARCADO

La última etapa del proceso consiste en introducir las muestras de ADN marcado en un chip Saphyr® para ser escaneado mediante el instrumento Saphyr® (Bionano Genomics). Cada chip contiene tres pocillos (*flowcells*), uno para cada muestra, que contienen nanocanales que permiten el paso de una sola molécula de ADN linealizada a través de un proceso de electroforesis. De esta manera, el instrumento captura imágenes de las moléculas marcadas para construir un mapa del genoma preciso. En cada experimento se programa la cantidad de datos a capturar (en Gb de ADN total) según la cobertura que se desee alcanzar en cada muestra. En general, el objetivo recomendado en muestras hematológicas es la recopilación de 1500 Gb de datos para poder detectar alteraciones con una frecuencia alélica (VAF, *variant allele frequency*) de hasta el 5%.

En la actualidad, la preparación de muestras para OGM se realiza de forma manual, pero ya está en fase de desarrollo la automatización de algunas partes del

protocolo. Por este motivo, y debido a la fragilidad del ADN de cadena larga, no se recomienda procesar más de 3-6 muestras en cada una de las etapas de extracción y marcaje, con un tiempo de procesamiento aproximado de entre 3 y 7 días. En cuanto a la captura de imágenes, el equipo Saphyr® permite cargar hasta 2 chips (6 muestras) que se escanean de manera consecutiva en una carrera. El tiempo de escaneo requerido para cada muestra depende de la calidad del ADN extraído y del marcaje, y oscila entre unas pocas horas (aproximadamente 8 h) y un máximo de 65 horas.

Análisis de los resultados del mapeo óptico del genoma

Controles de calidad de la técnica

Al finalizar el procedimiento técnico, el programa Bionano Access (Bionano Genomics) compara las imágenes capturadas en el instrumento Saphyr con un genoma de referencia para generar un archivo de moléculas digitales. Durante este proceso se obtienen distintos parámetros de calidad que deben ser revisados para asegurar que los datos obtenidos son óptimos para el análisis (Tabla 2). Aunque es posible realizar el análisis de la muestra cuando alguno de los valores se encuentra fuera de rango, es responsabilidad de cada laboratorio establecer el rango aceptable de estos valores, asumiendo su impacto en la sensibilidad o en la especificidad.

Algoritmos de análisis de resultados

El análisis puede realizarse mediante dos algoritmos bioinformáticos que, con estrategias diferentes, establecen

Tabla 2. Parámetros de calidad y valores recomendados para el análisis de mapeo óptico del genoma en muestras de neoplasias hematológicas

Parámetro	Definición	Valores recomendados
Total DNA (≥ 150 kbp)	Cantidad total de moléculas de ≥ 150 Kb mapeadas	1.300 Gb
Map rate	Porcentaje de moléculas de ≥ 150 Kb mapeadas contra el genoma de referencia	> 70%
Effective coverage of reference (X)	Cobertura efectiva (cantidad total de ADN alineado dividida por el tamaño del genoma de referencia multiplicado por el map rate)	> 300x
N50 (≥ 150 kbp)	Longitud media ponderada de las moléculas de ≥ 150 Kb	> 230 Kb
N50 (≥ 20 kbp)	Longitud media ponderada de las moléculas de ≥ 20 Kb	> 150 Kb
Average label density (≥ 150 kbp) (/100 kbp)	Número promedio de etiquetas por cada 100 Kb en las moléculas de ≥ 150 Kb	14-17
Negative label variance (NLV)	Porcentaje de etiquetas del genoma de referencia ausentes en las moléculas mapeadas	0-15%
Positive label variance (PLV)	Porcentaje de etiquetas identificadas en las moléculas mapeadas ausentes en el genoma de referencia	0-10%

la presencia de alteraciones estructurales basándose en las diferencias entre el patrón de moléculas digitales de la muestra y el genoma de referencia. El algoritmo recomendado para el estudio de neoplasias hematológicas es el RVA (*Rare Variant Analysis*), diseñado específicamente para la detección de alteraciones en mosaico. Existe otro tipo de análisis, el cual permite identificar variantes estructurales de menor tamaño y regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterozygosity*), denominado *de novo assembly*, pero está diseñado para el estudio de alteraciones constitucionales, ofrece una sensibilidad limitada (15-20%) y su uso debe ser restringido a casos particulares. De forma adicional, ambos algoritmos permiten inferir la presencia de CNV o de aneuploidías a partir de la oscilación en la cobertura alcanzada para cada intervalo genómico, llegando a una sensibilidad, en ambos casos, del 15-20%.

Filtrado, análisis e interpretación de las variantes

El análisis y la posterior clasificación de las alteraciones identificadas por los algoritmos bioinformáticos se realiza mediante el programa Bionano Access. El primer paso del análisis consiste en eliminar variantes polimórficas o artefactos propios de la técnica (con baja fiabilidad). Para ello se utiliza la base de datos de población sana multiétnica incluida en el propio programa, o bases de datos con variantes polimórficas descritas en población sana (como la DGV, *Database of Genomic Variants*),

así como los índices de confianza calculados para cada una de las variantes identificadas y los valores máximos recomendados según el fabricante para cada uno de ellos. Además, también es posible filtrar fácilmente las alteraciones según su solapamiento con regiones que contengan genes o que puedan ser relevantes en la patología de estudio utilizando archivos BED (*Browser Extensible Data*) que incluyan dichas regiones, y que están diseñados para focalizar el análisis en las regiones con relevancia clínica. Este filtrado es automático y dinámico, es decir, puede ser modificado durante el análisis de cada muestra. En una segunda fase es necesaria una revisión visual de las alteraciones para descartar posibles falsos positivos, eliminar duplicados y fusionar alteraciones de CNV que puedan estar fragmentadas (Fig. 2).

En cuanto a la información conseguida de cada una de las alteraciones, aparte de los parámetros de calidad obtenidos en el algoritmo de OGM y la posición cromosómica, el programa también indica los genes que se solapan con cada alteración, así como posibles genes de fusión asociados. Cabe destacar que algunos reordenamientos, como los que implican a los genes de las inmunoglobulinas (IGH [14q32], IGL [22q11] e IGK [2p12]), a los genes de los receptores de célula T o a genes como MYC (8q24), BCL2 (18q21) y BCL6 (3q27), se caracterizan por tener una arquitectura de puntos de rotura compleja, tanto por delante como por detrás del gen de interés. En estos casos, los genes que el OGM identifica en el punto de rotura no siempre son los que realmente tienen impacto en el proceso neoplásico. Es

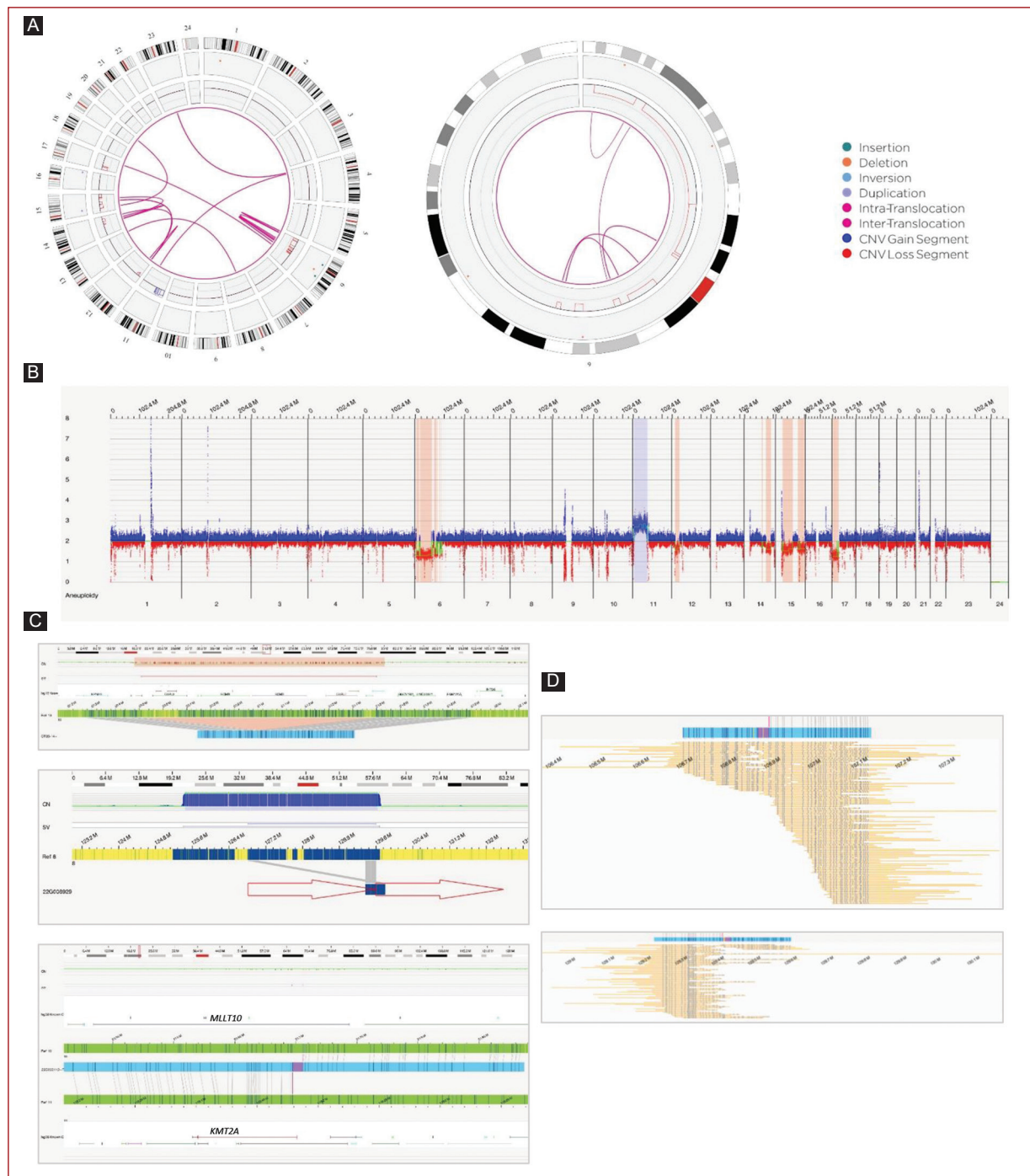


Figura 2. Ejemplos de visualización de resultados de mapeo óptico del genoma mediante el programa Bionano Access. **A:** *circos plot* de las alteraciones detectadas en el genoma entero o en un cromosoma seleccionado. De fuera adentro muestra las bandas cromosómicas, la localización de las variantes estructurales identificadas (puntos con un código de colores para cada una), CNV (pérdidas en rojo y ganancias en azul), líneas moradas que unen los puntos de rotura de las translocaciones detectadas. **B:** visión global del genoma para la visualización de CNV (pérdidas en rojo y ganancias en azul). **C:** detalle de las alteraciones identificadas en regiones concretas. De arriba abajo: pérdida por CNV/delección, ganancia/duplicación y translocación intercromosómica. En cada región se muestran dos pistas con los CNV o las alteraciones estructurales identificadas, así como el patrón de marcaje en el genoma de referencia (verde) y el de las moléculas mapeadas en la muestra (azul). **D:** visualización de las moléculas individuales utilizadas para definir una alteración. El número de moléculas y la cantidad de marcas mapeadas contra el genoma de referencia permiten distinguir translocaciones con alta fiabilidad (arriba) o falsos positivos potenciales (abajo).

importante tener en cuenta que los genes o las regiones reguladoras implicadas en la alteración pueden localizarse hasta a 1 Mb del punto de rotura^{15,16}.

Debido a la reciente incorporación de la metodología en los laboratorios diagnósticos, aún están en desarrollo las guías internacionales de consenso para el análisis y la interpretación de los resultados. No obstante, como sucede con otras técnicas citogenómicas y moleculares, los informes de los resultados de OGM deben incluir las variantes consideradas clínicamente relevantes (alteraciones patogénicas o probablemente patogénicas) en cada una de las neoplasias hematológicas, es decir, aquellas con un valor diagnóstico, pronóstico o predictivo reconocido en las clasificaciones o las guías actuales. Por otra parte, respecto a las alteraciones adicionales (alteraciones de significado incierto), es importante que cada laboratorio establezca los criterios para decidir cuáles se incluirán en el informe final. Asimismo, cabe destacar que en la actualidad los datos retrospectivos de OGM son limitados. A medida que esta tecnología sea implementada en los laboratorios, será esencial la creación de bases de datos que recojan información detallada de las alteraciones detectadas, permitiendo a su vez identificar alteraciones citogenómicas estructurales que representen polimorfismos poblacionales no identificados como tales con las técnicas de referencia utilizadas hasta el momento.

Situación actual del mapeo óptico del genoma en el estudio de alteraciones citogenómicas con valor clínico establecido

Diversas publicaciones recientes han demostrado que el OGM es una buena alternativa como prueba de primera línea para la detección de alteraciones cromosómicas en diferentes neoplasias hematológicas^{7,11,14}, principalmente en la leucemia mieloide aguda (LMA)^{8,12}, los síndromes mielodisplásicos (SMD)^{8,17}, la leucemia linfoblástica aguda (LLA)^{5,6,10} y la leucemia linfática crónica (LLC)^{9,13} (Tabla 3). No obstante, todavía no se han publicado guías internacionales que especifiquen cuándo sería recomendable priorizar esta tecnología frente a los métodos convencionales (cariotipo, FISH, *microarrays* genómicos) y en qué afecciones la aplicación del OGM supondría una mejora en el manejo de los pacientes.

A continuación, se describe el potencial de la aplicación del OGM en las diferentes neoplasias hematológicas teniendo en cuenta los resultados publicados, las variantes consideradas clínicamente relevantes y la experiencia propia de los autores.

Neoplasias mieloides

En los SMD, la detección de alteraciones genéticas recurrentes es esencial para establecer el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de los pacientes^{18,19}. En este sentido, además de permitir establecer la clonalidad en los pacientes con citopenias en sangre periférica, el análisis del cariotipo es esencial para la estratificación del riesgo de los pacientes según el *International Prognostic Scoring System* revisado (IPSS-R)^{20,21}. Asimismo, algunas alteraciones estructurales, como la delección en 5q o la inactivación bialélica de *TP53*, son definitorias de categorías diagnósticas según las nuevas clasificaciones^{18,19}. Sin embargo, aproximadamente el 50% de los SMD presentan un cariotipo normal y algunos casos, sin metafases valorables en el cultivo de citogenética, requieren análisis de FISH o *microarrays* genómicos adicionales. Los estudios de OGM publicados han demostrado que su aplicación no solo permite aumentar el porcentaje de pacientes con resultados citogenéticos informativos, sino también caracterizar mejor algunas alteraciones con impacto en la estratificación pronóstica de los pacientes¹⁷. Por lo que se refiere a las LMA, actualmente su diagnóstico no se basa únicamente en el recuento de blastos en médula ósea o en sangre periférica, sino que depende del tipo de anomalías genómicas identificadas^{18,19}. En este sentido, el estudio citogenético es esencial para el diagnóstico de las afecciones incluidas en las LMA con alteraciones genéticas definitorias, como los reordenamientos *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *DEK::NUP214*, *RBM15::MRTFA*, *BCR::ABL1*, o aquellos que afectan a los genes *KMT2A*, *MECOM* y *NUP98*. También es necesario identificar alteraciones recurrentes en los SMD (por ejemplo, delección 5q, alteraciones del cromosoma 7 [-7/7q], delecciones 11q, 12p y 17p, o cariotipos complejos, entre otros) para el diagnóstico de las LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia. Los trabajos de OGM publicados en pacientes con LMA han demostrado que la técnica no solo es útil para identificar alteraciones conocidas, sino que también permite detectar alteraciones crípticas en el cariotipo (como los reordenamientos de *NUP98*) y caracterizar las parejas de reordenamiento de genes como *KMT2A*, que pueden tener impacto en el pronóstico de los pacientes y ser útiles para el seguimiento de la enfermedad^{8,12,22}.

Respecto a las neoplasias mieloproliferativas, aunque la experiencia publicada es limitada¹¹, el OGM tiene un alto potencial en el estudio de la mielofibrosis primaria, ya que la presencia de fibrosis medular característica de esta enfermedad conlleva que hasta un 50% de los

Tabla 3. Resumen de los principales estudios publicados de mapeo óptico del genoma en neoplasias hematológicas

Referencia	Enfermedad estudiada	n	Concordancia con las técnicas de referencia	Nuevas alteraciones identificadas por OGM	Nueva información con valor pronóstico
Lestringant et al. ⁶ , 2021	LLA	10 (6 LLA-B y 4 LLA-T)	90%	Detección de 12 alteraciones adicionales (7 confirmadas por técnicas convencionales), incluyendo 3 reordenamientos IGH::CEBPB, MYC::TRB y translocaciones complejas de LM02::TRA y TLX1::TRA	
Lühmann et al. ⁵ , 2021	LLA	12	100%	Detección de múltiples alteraciones, incluyendo redefinición de SV conocidas y otras de significado desconocido. Detección de un nuevo gen de fusión JAK2::NPAT	
Kriegova et al. ⁵⁵ , 2021	MM	11	98%	Detección de alteraciones adicionales en todos los pacientes	
Puiggròs et al. ⁹ , 2022	LLC y LBM	42 (39 LLC y 3 LBM)	90%	El OGM aportó información adicional en el 55% de los casos, cohorte enriquecida en cariotipos complejos. Detección de complejidad superior que las técnicas convencionales	La detección de mayor complejidad por OGM (≥ 10 alteraciones) se asoció a peor pronóstico
Valkama et al. ¹³ , 2023	LLC	18	100%	El OGM aportó información adicional en 8/16 alteraciones previamente identificadas por FISH. Identificación de alteraciones no cubiertas por el panel de FISH de LLC en el 78% de pacientes	
Balducci et al. ²² , 2022	SMD y LMA	68 (27 SMD y 41 LMA)	85%	Detección de alteraciones clínicamente relevantes en el 33% de SMD y en el 53% de LMA	Cambio en la categoría de riesgo según el IPSS-R en el 22% de SMD y según la escala 2017 ELN en el 5% de LMA
Gerding et al. ⁸ , 2022	SMD y LMA	27 (6 SMD y 21 LMA)	93%	Detección de alteraciones adicionales que clarificaron en cariotipo en el 67% de los casos	Cambio de la estrategia terapéutica en un paciente y del riesgo pronóstico en otro
Levy et al. ¹² , 2023	LMA	100	98%	Detección de alteraciones clínicamente relevantes en el 13% de los casos	Cambio en la categoría de riesgo según la escala 2022 ELN en 5 pacientes (5%)
Suttorp et al. ⁵⁶ , 2022	LA (pediátrica)	24 (22 LMA y 2 LA de fenotipo mixto)	63%	Detección de alteraciones adicionales en el 63% de los casos	Cambio en la categoría de riesgo en un paciente (5%) según los criterios de AML-BFM

(Continúa)

Tabla 3. Resumen de los principales estudios publicados de mapeo óptico del genoma en neoplasias hematológicas (continuación)

Referencia	Enfermedad estudiada	n	Concordancia con las técnicas de referencia	Nuevas alteraciones identificadas por OGM	Nueva información con valor pronóstico
Yang et al. ¹⁷ , 2022	SMD	101	97%	Detección de 383 alteraciones crípticas por métodos convencionales, siendo clínicamente relevantes en el 34% de los pacientes	Cambio en la categoría de riesgo según el CCSS y el IPSS-R en un 21% y un 17% de pacientes, respectivamente
Gao et al. ³³ , 2022	LLA-B (pediátricas)	46 (41 LLA-B y 5 pre LLA-B)	100%	Descripción de 2 nuevos genes de fusión (<i>LMNB1::PPP2R2B</i> y <i>TMEM272::KDM4B</i>)	
Rack et al. ¹⁰ , 2022	LLA (pediátricas y adultos)	41 (29 LLA-B [12 adultos y 17 pediátricas] y 12 LLA-T [3 adultos y 9 pediátricas])	97%	Detección de 10 alteraciones adicionales (casos con cariotipo normal o no informativo). Identificación de los reordenamientos TRA/D, TRB, TLX3 y su pareja (3/7 no identificados por FISH)	Asignación de una categoría de riesgo citogenético a un 30% más de pacientes (de 23 a 32 pacientes)
Soler et al. ⁵⁷ , 2023	LLA y LMA	29 (2 LLA-B, 3 LLA-T y 24 LMA)	73%	Detección de alteraciones clínicamente relevantes en 5 pacientes (17%)	Los hallazgos del OGM no implicaron cambio del riesgo citogenético según la OMS o la ELN en ningún paciente
Vieler et al. ⁵⁸ , 2023	LLA	11 (9 LLA-B y 2 LLA-T)	100%	El OGM aportó información adicional en el 64% de los casos (alteraciones adicionales en 7 pacientes y redefinición del cariotipo en 2)	

AML-BFM: acute myeloid leukemia-Berlin-Frankfurt-Münster; CCSS: comprehensive cytogenetic scoring system; ELN: european leukemia net; FISH: hibridación fluorescente *in situ*; LBM: linfocitosis B monoclonal; LLA: leucemia linfóide aguda; LLC: leucemia linfocítica crónica; LMA: leucemia mieloide aguda; MM: mieloma múltiple; OGM: mapeo óptico del genoma; OMS: Organización Mundial de la Salud; R-IPSS: Revised International Prognostic Scoring System; SMD: neoplasias mielodisplásicas; SV: variante estructural.

cariotipos de médula ósea sean no valorables²³. Un estudio evaluó la utilidad de realizar el análisis del OGM en muestras de sangre periférica y demostró la reproducibilidad de la técnica en este tipo de muestras, en comparación con médula ósea, y además ha sido capaz de resolver los cariotipos no valorables, lo que ha permitido en última instancia disponer de toda la información citogenética necesaria para aplicar escalas pronósticas como DIPSS-PLUS, GIPSS y MIPSS70v2, mejorando así el manejo de estos pacientes²⁴. Por lo que se refiere a los pacientes con hipereosinofilia, el OGM también permitiría mejorar el diagnóstico diferencial al ayudar a distinguir las proliferaciones benignas no clonales (eosinofilias secundarias) de las proliferaciones clonales neoplásicas (eosinofilias primarias)^{25,26}. Actualmente este proceso requiere el análisis de múltiples sondas de FISH o cariotipo, y en cambio el OGM

permitiría identificar o descartar en un único ensayo las neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia asociada a la fusión de genes de la vía tirosina cinasa que podrían beneficiarse de tratamientos dirigidos con inhibidores de la tirosina cinasa (reordenamientos de *PDGFRA* [4q12]), *PDGFRB* (5q32), *ETV6::ABL1* [t(9;12) (q34.1;p13.2)], inhibidores de *FGFR* [reordenamientos de *FGFR1* (8p11.2)], inhibidores de JAK2 [reordenamientos de *JAK2* (9p24.1)] e inhibidores de FLT3 (reordenamientos de *FLT3* [13q12.2])^{18,19}.

Neoplasias linfoides

La LLA de célula B (LLA-B) es una enfermedad compleja de analizar por su diversidad genética y por su dificultad para hallar la alteración primaria, o *driver*, tanto en casos pediátricos como en adultos. Actualmente,

con el cariotipo es posible detectar las alteraciones que se observan con mayor frecuencia, como por ejemplo, las translocaciones t(9;22)(q34;q11.2) [*BCR::ABL1*], t(4;11)(q21;q23) [*KMT2A::AFF1*] y t(1;19)(q23;p13) [*TCF3::PBX1*]. Sin embargo, en muchos casos el cariotipo no es suficiente y es necesario utilizar técnicas complementarias: la FISH permite identificar la t(12;21)(p13;q22) [*ETV6::RUNX1*], la *iAMP21* (amplificación de *RUNX1*) y otras alteraciones crípticas (reordenamientos de *CRLF2*, *PAX5*, *ZNF384*, *DUX4* o *MEF2D*, entre otros) que pueden llegar a representar aproximadamente un 30% de los casos^{27,28}; y la técnica de SNP-array permite detectar microdeleciones secundarias con mal pronóstico (como *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *BTG1*, *ETV6*, *EBF1*, *RB1* y la región *PAR1*), algunas de las cuales implican decisiones terapéuticas, e identificar correctamente los subgrupos de LLA-B con aneuploidías que presentan pronósticos bien establecidos, como son los grupos *near-haploidy/near-diploidy* (23-29 cromosomas/50-58 cromosomas), *low-hypodiploidy/near-triploidy* (30-39 cromosomas/60-78 cromosomas) y *high-hyperdiploidy* (51-67 cromosomas)^{18,29-32}. Por todo ello, el OGM representa una tecnología ideal para poder detectar con una única prueba todos los tipos de alteraciones descritas en esta enfermedad^{5,6,10,33}.

Respecto a la LLA de célula T (LLA-T), al igual que la LLA-B, también presenta una elevada heterogeneidad genética³⁴. Utilizando la citogenética convencional se observa un alto porcentaje de casos con cariotipos no evaluables (30%) o con resultado normal (30%) que pueden contener alteraciones crípticas³⁵. Existen pocos estudios que hayan utilizado OGM en esta enfermedad, pero todos ellos confirman que aporta mucha más información que las técnicas citogenómicas convencionales. Asimismo, estos estudios han permitido identificar genes de fusión, como *TRA::LMO2*, *TRB::MYC*, *IGH::TAL1*, *TCF7::SPI1*, *TRA::NKX2-1*, *BCL11B::TLX3*, *TRA::ZEB2*, *TRB::HIBADH*, *TRB::TLX1*, con un gran potencial clínico^{6,10}.

La LLC es una neoplasia linfoproliferativa clínicamente heterogénea debido, en parte, a los factores genéticos. Las guías del International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia recomiendan analizar, antes de iniciar cualquier tratamiento, las del (11q), +12, del (13q) y del (17p) mediante FISH^{10,36}. Además, en los últimos años se ha evidenciado el valor pronóstico del cariotipo complejo en esta enfermedad, que cada vez está más presente en las guías clínicas de tratamiento, como las de la European Society for Medical Oncology, la National Comprehensive Cancer Network o las guías del grupo alemán de LLC. Sin embargo, el

verdadero papel de la complejidad genómica en la LLC analizado por citogenética convencional o bien por técnicas de *microarrays* sigue estando limitado por los aspectos metodológicos³⁷. En este sentido, el empleo del OGM en la LLC permite, además de identificar las anomalías estudiadas actualmente por FISH, una mejor definición de las alteraciones citogenéticas: la descripción correcta de alteraciones estructurales, como cromosomas marcadores o material adicional de origen desconocido; la identificación de reordenamientos crípticos y la detección exacta de los puntos de rotura (por ejemplo, *IGH::BCL3*, grupo con especial mal pronóstico); y la identificación de dos patrones de cromotripsis (definida como la presencia de CNV con un patrón alternante de al menos 7-10 segmentos, en un brazo o cromosoma entero), dependiendo de la afectación inter- o intracromosómica. Asimismo, el OGM permite una mejor definición de la complejidad genómica y se muestra como una técnica útil en la estratificación pronóstica de los pacientes^{9,13,38}.

El mieloma múltiple (MM) representa el ejemplo de neoplasia hematológica que más se podría beneficiar del uso del OGM. Es una afección extremadamente heterogénea a nivel citogenético y se caracteriza por la presencia de anomalías cromosómicas en el 90% de los pacientes. Las actuales guías internacionales de estadificación del MM, como el *Revised International Staging System* (R-ISS) y el *Second Revision of the International Staging System* (R2-ISS)^{39,40}, incluyen alteraciones citogenéticas asociadas a pronóstico desfavorable, entre las cuales destacan del (17p) (*TP53*), t(4;14)(p16;q32) [*IGH::FGFR3*], t(14;16)(q32;q23) [*IGH::MAF*] y las ganancias o amplificaciones de 1q (3 copias o ≥ 4 copias). Debido a la dificultad de obtener metafases de las células plasmáticas, la técnica de referencia para la detección de las alteraciones de alto riesgo es la FISH en células CD138+ aisladas, que permite detectar tanto pérdidas o ganancias como reordenamientos, por lo que es necesario realizar múltiples determinaciones dirigidas. Este abordaje implica el desconocimiento del conjunto de la heterogeneidad genética del MM, sin poder analizar la contribución de otras alteraciones cromosómicas en el pronóstico o en la evolución de estos pacientes. Por ello, el OGM es una técnica muy prometedora en el MM, aunque está en fase de estandarización en células CD138+ seleccionadas¹¹. Con la aplicación del OGM será posible identificar todos los reordenamientos de 14q32 (*IGH*) y a sus parejas, principalmente genes de las familias de las *CYCLIN D* (11q13-*CYCLIN D1*; 12p13-*CYCLIN D2*; 6p25-*CYCLIN D3*) y de las *MAF* (16q23-*MAF*;

20q12-MAFB; 8q24.3-MAFA), 4p16-MMSET/(FGFR3), así como aneuploidias o reordenamientos que impliquen otras regiones cromosómicas de interés, como por ejemplo 8q24.21 (MYC), 2p11.2 (IGK) o 22q11.2 (IGL).

Nueva información genética aportada por el mapeo óptico del genoma

La capacidad de detección de nuevas alteraciones o de redefinición de reordenamientos complejos con la técnica de OGM ha sido documentada en la mayoría de los estudios publicados sobre neoplasias hematológicas^{7,9-12,14,17}. A continuación, se describen algunas consideraciones respecto a la información adicional que se obtiene utilizando esta tecnología.

Caracterización y reinterpretación de alteraciones conocidas

La técnica de OGM destaca por la capacidad de definir los puntos de rotura y los genes implicados en los reordenamientos. Esto es especialmente relevante en la caracterización de aquellos que afectan a genes con múltiples parejas de reordenamiento (por ejemplo, *KMT2A*, *IGH*, *MYC* y *BCL6*, entre otros), de las cuales no se dispone de sondas FISH específicas. Además, la mayor resolución del OGM permite detectar reordenamientos y deleciones clínicamente relevantes que pueden ser crípticos por los métodos estándar (por ejemplo, reordenamientos de *MECOM* (3q26), *NUP98* (11p15), *KMT2A-PTD*, o deleciones de *TET2*, *ETV6* y *TP53*), y caracterizar alteraciones complejas que involucran a genes esenciales en la leucemogénesis, como por ejemplo *JAK2* y *RUNX1*^{5,8}. Por otra parte, se ha demostrado que el OGM también permite redefinir determinadas alteraciones citogenéticas que con las técnicas convencionales se habían interpretado de forma incorrecta. Entre estos casos se halla el fenómeno denominado *mimicking* (imitación), por el cual algunas alteraciones citogenéticas definidas por bandas G podrían no ser tales a nivel molecular, cuando se analizan con más detalle. Algunos ejemplos descritos en la literatura son t(9;22)(q34;q11.2), que no implica *BCR::ABL1* o bien t(4;12)(q12;p13) con supuesto reordenamiento *ETV6::PDGFRA* que en realidad no afecta a *PDGFRA*. En estos casos, el OGM permitió identificar con mayor resolución estas anomalías y poder explicar el comportamiento clínico inesperado de los pacientes que no respondían al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa⁴¹.

Reclasificación de los pacientes e identificación de nuevas dianas terapéuticas

Cabe destacar que la mejor definición de las alteraciones mediante OGM tiene un impacto directo en el manejo clínico de los pacientes, permitiendo reclasificar a los pacientes en nuevas categorías diagnósticas, así como clasificarlos en distintos grupos pronósticos o predictivos de respuesta a tratamientos. En este sentido es especialmente interesante el trabajo de Yang et al.¹⁷, en el cual se analizó por OGM una serie de 101 pacientes con SMD de nuevo diagnóstico. Los autores demostraron que el OGM permitió modificar el riesgo según la categoría de riesgo citogenético y el IPSS-R en el 17% de los pacientes. En la mayoría de los casos el cambio representaba la asignación a un grupo de mayor riesgo, aunque también se describieron casos en los que el cambio era en sentido contrario gracias a la caracterización de pacientes sin cariotipo valorable, o debido a la identificación de alteraciones de muy buen pronóstico (como la deleción de 11q) no detectadas con las técnicas convencionales¹⁷. Estos resultados están en consonancia con la reestratificación descrita en estudios de cohortes más pequeñas, como el trabajo de Balducci et al.²², quienes describieron un cambio de IPSS-R en el 22% de los SMD y de la estratificación pronóstica según la European Leukemia Net (ELN) 2022 en el 5% de las LMA²², o la mayor asignación de pacientes con LLA a grupos de riesgo citogenético establecidos (de 23 a 32) descrita por Rack et al.¹⁰ en su estudio. Por otro lado, el elevado número de nuevas variantes estructurales identificadas expande el conocimiento de posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas. Asimismo, la identificación de reordenamientos crípticos por las técnicas convencionales facilita la inclusión de pacientes en ensayos clínicos con fármacos a los que, de otro modo, no tendrían acceso. Por ejemplo, en la caracterización de los SMD mediante OGM se han identificado reordenamientos que implican a *MECOM*, *NUP98* y *KMT2A*, así como la translocación *KMT2A-PTD*, que permiten seleccionar pacientes para ensayos clínicos dirigidos en LMA¹⁷.

Definición de cariotipo complejo mediante OGM

El concepto de cariotipo complejo (CK, *complex karyotype*) está directamente relacionado con el valor pronóstico desfavorable, por lo cual el riesgo asociado a la complejidad genómica necesita ser definido para

cada tipo de neoplasia hematológica. En 1981, Berger et al.⁴² definieron CK en LMA como la presencia de ≥ 3 alteraciones citogenéticas diferentes en el clon tumoral. Sin embargo, en los últimos años ha habido nuevas propuestas y el número de alteraciones para considerar un CK ha ido variando según las enfermedades y los grupos de estudio, con puntos de corte entre 3 y 5 alteraciones⁴³. Por ejemplo, en la LMA, la ELN considera CK ≥ 3 ⁴⁴, mientras que el UK Medical Research Council sitúa el punto de corte en ≥ 4 alteraciones⁴⁵. Asimismo, en la LLC se considera un paciente con CK con ≥ 3 alteraciones citogenéticas, y con CK de alto riesgo ≥ 5 alteraciones⁴⁶. En el caso de la LLA-T, el punto de corte de CK utilizado de forma clásica ha sido el mismo que en la LLA-B: ≥ 5 alteraciones⁴⁷. No obstante el análisis de una serie larga de pacientes con LLA-T adultos tratados homogéneamente según los protocolos PETHEMA demostró que un CK ≥ 3 alteraciones identificaba a los pacientes con peor supervivencia y mayor tasa de recaída³⁵. La técnica de OGM permite la detección de más alteraciones citogenómicas, tanto SV como CNV, por lo que el número de alteraciones necesarias para categorizar un caso como CK mediante esta técnica deberá ser revisado. En la mayoría de las publicaciones que incluyen pacientes estudiados con OGM se identifican casos con CK. El número de alteraciones necesarias para considerar un caso como CK es variable entre ellos: ≥ 3 ^{12,17}, ≥ 4 ¹¹ y ≥ 5 ⁷; no obstante, la mayoría no debaten sobre estos criterios relativamente arbitrarios, quizá debido al número limitado de pacientes incluidos, y la ausencia de correlación con datos clínicos^{7,10-12,17}. En este ámbito es destacable el estudio de Puiggròs et al.⁹ sobre la complejidad genómica en la LLC, en el cual se demuestra que el OGM permite la estratificación de los pacientes en distintos grupos de riesgo. Los autores proponen un punto de corte de ≥ 10 anomalías para considerar los casos con alta complejidad, aunque subrayan que la cifra es arbitraria y que son necesarios estudios con cohortes más amplias y no seleccionadas para definir unos criterios estándar de complejidad genómica mediante OGM.

Caracterización e implicación clínica del fenómeno de cromoaanagénesis

El fenómeno de cromoaanagénesis agrupa distintos tipos de eventos catastróficos, por los cuales se generan múltiples alteraciones genéticas y reordenamientos cromosómicos, que se han asociado históricamente al desarrollo de distintos tipos de neoplasias. Entre ellos

se encuentran la cromotripsis, la cromoaanagénesis y la cromoplexia. La cromotripsis se define como la fragmentación y la reorganización localizada de uno o varios segmentos cromosómicos durante un evento catastrófico de un solo paso, con la reparación incompleta de las roturas de doble cadena mediante la unión de extremos no homólogos. La cromoaanagénesis se produce tras la replicación errónea del ADN, con fallos de la horquilla de replicación y cambios en la hebra patrón utilizada durante el proceso, dando lugar a múltiples ganancias en el número de copias (duplicaciones y triplicaciones) en combinación con deleciones. Por último, la cromoplexia es un fenómeno caracterizado por la presencia de múltiples translocaciones inter- e intracromosómicas encadenadas y complejas que implican hasta ocho cromosomas distintos y que presumiblemente ocurren de forma simultánea, dando lugar a pocas o ninguna alteración en el número de copias⁴⁸⁻⁵¹. Hasta la actualidad, estos fenómenos solo se podían identificar utilizando técnicas de *whole genome sequencing* o bien *microarrays* genómicos, que proporcionaban una información sesgada por aportar únicamente datos de alteraciones en el número de copias. Con la técnica de OGM es posible obtener información relacionada con estos fenómenos mucho más completa y detallada. Hasta la actualidad existen pocos estudios que hayan profundizado en el impacto clínico de estos fenómenos, debido a la reciente y progresiva implementación del OGM^{17,38}. Estos son una representación de la complejidad genómica que en el futuro deberá tenerse en cuenta en los laboratorios.

Limitaciones del mapeo óptico del genoma en el estudio de las neoplasias hematológicas

Los estudios publicados hasta el momento han puesto de manifiesto el alto rendimiento del OGM en el estudio citogenómico de las neoplasias hematológicas. No obstante, esta tecnología también presenta algunas limitaciones, que a continuación se comentan.

Sensibilidad y clonalidad

Aunque una de las ventajas del OGM es su alta sensibilidad, que permite detectar la mayoría de las alteraciones estructurales en clones con una infiltración de tan solo el 5% de la muestra, el porcentaje sube hasta el 15-20% para la detección de CNV. Esta limitación puede ser relevante en los pacientes con LLC y clones minoritarios con deleción de *TP53*, asociados a

pronóstico adverso e identificados actualmente por FISH. En este sentido, aunque el OGM es una técnica útil en la LLC, no se ha demostrado que pueda sustituir a la FISH para el análisis de este biomarcador^{9,13}. De forma similar, el OGM presenta un bajo rendimiento para la detección de CNV en muestras de médula ósea total de pacientes con neoplasias de células plasmáticas, debido a la variabilidad en la infiltración por células plasmáticas tumorales de las muestras obtenidas⁵². Por este motivo, de manera equivalente a las recomendaciones actuales para el análisis de FISH, la implementación del OGM en la caracterización citogenética deberá ser optimizada en muestras de células CD138+ seleccionadas. Además, se ha demostrado que la tasa de detección de alteraciones del OGM frente al cariotipo se ve comprometida en los linfomas de célula B con expresión periférica y una infiltración por citometría de flujo inferior al 20%⁵³. En estos casos, el enriquecimiento de la muestra mediante la selección de células mononucleadas por gradiente de densidad o de separación inmunomagnética de células CD19+ mejoraría los resultados del OGM.

Finalmente, cabe destacar que, siguiendo los protocolos estándar, el OGM analiza el ADN total de la muestra y no es capaz de proporcionar información sobre la arquitectura clonal del paciente. Aunque los resultados incluyen información sobre la frecuencia alélica de cada una de las alteraciones identificadas, no es posible distinguir la evolución clonal de la presencia de clones independientes portadores de distintas alteraciones.

Alteraciones en regiones repetitivas

Las regiones repetitivas, tales como regiones (peri)-centroméricas, teloméricas, los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos o tramos constitutivos de heterocromatina, no están bien cubiertas por la tecnología de OGM por falta de un mapa de referencia de marcaje en dichas regiones. Por este motivo, el OGM no permite detectar alteraciones con puntos de rotura dentro de estas regiones. Esta limitación supone que algunas alteraciones únicamente pueden ser intuidas de manera indirecta por OGM, infiriendo su presencia por las CNV asociadas a ellas. Algunos ejemplos son los isocromosomas o cromosomas dicéntricos con afectación de 17p13 (*TP53*) en la LLC, o las translocaciones desequilibradas del cromosoma 1q en las neoplasias mieloides, siendo la más frecuente el derivativo der(1;7)(q10;p10). Aun así, la implicación patogénica de la alteración sí es detectable por OGM por pérdida de

la *TP53* o la delección de 7q, respectivamente. Algo parecido sucede en las regiones subteloméricas de los cromosomas sexuales (Xp22.3/Yp11.3, región PAR1), donde se localiza el gen *CRLF2*. Los reordenamientos de *CRLF2* [la microdelección que induce el reordenamiento *P2RY8::CRLF2* o el reordenamiento *IGH::CRLF2* asociado a t(X;14)(p22;q32) o t(Y;14)(p11;q32)] son alteraciones incluidas en el estudio inicial de la LLA-B, ya que los pacientes que las presentan constituyen un grupo con pronóstico adverso que puede beneficiarse de una intensificación del tratamiento. Por este motivo, se aconseja inspeccionar de forma manual las moléculas mapeadas en esta región o aplicar el algoritmo *de novo assembly* para detectarlas^{10,33}.

Asignación de la ploidía

A pesar de que el OGM permite identificar correctamente las aneuploidías (monosomías y trisomías), se ha demostrado que la asignación de la ploidía de la muestra no siempre es correcta^{6,10}. Esto es de especial relevancia en el análisis de pacientes con LLA-B, ya que la Organización Mundial de la Salud y la *International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias*^{18,30} consideran grupos con pronóstico variable según la ploidía.

En el caso de las neoplasias de células plasmáticas, las alteraciones que afectan a la ploidía son frecuentes a pesar de no estar incluidas en los índices pronósticos recomendados^{39,40}. Los cromosomas que más habitualmente son ganados o perdidos en cada una de las afecciones han sido descritos en extenso. Por este motivo, es importante interpretar correctamente los resultados del OGM según los cromosomas que estén afectados. De esta manera, ante la sospecha de una haploidía endorreduplicada (por ejemplo, en un MM con trisomía 18 e hipotriploidía) se aconseja aplicar el algoritmo *de novo assembly* para analizar las regiones con LOH y poder identificar manualmente este fenómeno.

Identificación de regiones con LOH

La importancia de las regiones con LOH y su implicación en el pronóstico de las neoplasias hematológicas es cada vez mayor. De hecho, la nueva clasificación molecular de los SMD incluye como factor pronóstico adverso la combinación de mutación en *TP53* y LOH en el mismo gen^{18,19}. De la misma forma, en una clasificación genómica de las neoplasias mieloproliferativas, la presencia de LOH localizadas en los cromosomas 9 o 17 tenía impacto en la evolución de

Tabla 4. Ventajas y limitaciones del mapeo óptico del genoma

Ventajas	Limitaciones
Permite el análisis de todo el genoma	Requiere un aparataje y unos reactivos específicos, y el coste económico por determinación es más alto que el de las técnicas convencionales
No depende de la división celular de las células tumorales	Es necesario partir de un ADN de cadena muy larga (> 150 Kb). No es apto para muestras con ADN extraído por métodos tradicionales, ni de tejido fijado en formol o incluido en parafina
Detecta todo tipo de alteraciones, tanto numéricas como estructurales, ya sean equilibradas o no equilibradas	No permite distinguir clones individuales al analizar el ADN de forma conjunta
Presenta una alta resolución de detección > 5 Kb (variable según el tipo de alteración)	No permite el análisis de alteraciones presentes en zonas repetitivas del genoma, como centrómeros y regiones subteloméricas, ni de alteraciones muy pequeñas como SNV o indels
Sensibilidad variable según el tipo de alteración analizada (estructural: 1-5%; número de copias: 15-20%)	No se pueden determinar las LOH utilizando el análisis para muestras tumorales (<i>Rare Variant Analysis</i>)

Indels: insertions-deletions; LOH: loss of heterozygosity; SNV: single nucleotide variants.

la enfermedad⁵⁴. Actualmente, la detección de LOH se realiza principalmente mediante *microarrays* genómicos de SNP y no está incluida en el algoritmo de análisis de OGM recomendado para el estudio de las neoplasias hematológicas, que es el RVA. Se ha demostrado que la aplicación del algoritmo *de novo assembly* permite identificar LOH en algunos casos, pero hay que destacar que este está optimizado para el análisis de alteraciones constitucionales y tiene una sensibilidad limitada. Así pues, aunque la detección de LOH es técnicamente posible, el algoritmo de análisis para muestras tumorales está todavía en fase de desarrollo.

Conclusiones

Actualmente, la detección de alteraciones cromosómicas con valor diagnóstico, pronóstico o predictivo de respuesta a tratamiento en neoplasias hematológicas se basa en el estudio del cariotipo, FISH o *microarrays* genómicos. Además, el estudio del perfil mutacional mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*) ha adquirido especial relevancia en las últimas clasificaciones.

El OGM es una técnica novedosa que potencialmente permitirá realizar el abordaje citogenético de los pacientes en un único test. Además, ofrece una mayor resolución que las técnicas convencionales, mejorando así la caracterización de las alteraciones conocidas y permitiendo la identificación de nuevas alteraciones crípticas. Sin embargo, los estudios publicados hasta el momento han demostrado que esta técnica no está exenta de limitaciones, como la incapacidad de

detectar regiones con LOH, distinguir clones individuales o una sensibilidad limitada al 15-20% para las alteraciones de ganancia y pérdida (Tabla 4).

En conclusión, el OGM es una técnica muy prometedora para el abordaje citogenómico de las neoplasias hematológicas, que posiblemente será incorporada como una herramienta complementaria a las técnicas actuales. No obstante, su implementación en la rutina diagnóstica requerirá una estandarización de los criterios de análisis, la validación de los resultados y la realización de estudios prospectivos comparativos para definir en qué afecciones y situaciones podrá complementar o reemplazar a las técnicas citogenómicas actuales. Además, será esencial que los profesionales que analicen los resultados de OGM tengan conocimientos de citogenética para poder interpretar correctamente los datos y proporcionar información robusta y contrastada a los profesionales sanitarios que se encarguen del diagnóstico integrado y del manejo de los pacientes. Es esperable que el análisis combinado de OGM y NGS facilite el diagnóstico y la toma de decisiones terapéuticas en estos pacientes.

Financiamiento

Trabajo realizado gracias a 2021SGR00560, 2021SGR00025, de la Generalitat de Catalunya. Soporte económico del programa CERCA de la Generalitat de Catalunya y de la Fundació Internacional Josep Carreras; PI19/01828, PI22/01880 y PI21/00022 del ISCIII; CGG de una beca de la SEHH (SEHH/2021); y RGS (ACIF/2021/169) de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad digital (Generalitat Valenciana) y el Fondo Social Europeo.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Uso de inteligencia artificial para generar textos. Los autores declaran que no han utilizado ningún tipo de inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito ni para la creación de figuras, gráficos, tablas o sus correspondientes pies o leyendas.

Bibliografía

- Granada I, Palomo L, Ruiz-Xivillé N, Mallo M, Solé F. Cytogenetics in the genomic era. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2020;33:101196.
- Espinet B, Blanco ML, Costa D, Cuatrecasas E, Ruiz-Xiville N. Análisis citogenómicos aplicados a neoplasias hematológicas. Recomendaciones preanalíticas, analíticas y postanalíticas. [consultado: 10 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.gcecg.org/analisis-citogenomicos-aplicados-a-neoplasias-hematologicas/>.
- Schwartz DC, Li X, Hernández LI, Ramnarain SP, Huff EJ, Wang YK. Ordered restriction maps of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes constructed by optical mapping. *Science*. 1993;262:110-4.
- Yuan Y, Chung CY-L, Chan T-F. Advances in optical mapping for genomic research. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:2051-62.
- Lühmann JL, Stelter M, Wolter M, Kater J, Lentjes J, Bergmann AK, et al. The clinical utility of optical genome mapping for the assessment of genomic aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2021;13:4388.
- Lestringant V, Duployez N, Penther D, Luquet I, Derrieux C, Lutun A, et al. Optical genome mapping, a promising alternative to gold standard cytogenetic approaches in a series of acute lymphoblastic leukemias. *Genes Chromosomes Cancer*. 2021;60:657-67.
- Neveling K, Mantere T, Vermeulen S, Oorsprong M, van Beek R, Kater-Baats E, et al. Next-generation cytogenetics: comprehensive assessment of 52 hematological malignancy genomes by optical genome mapping. *Am J Hum Genet*. 2021;108:1423-35.
- Gerding WM, Tembrink M, Nilius-Ellili V, Mika T, Dimopoulos F, Ladigan-Badura S, et al. Optical genome mapping reveals additional prognostic information compared to conventional cytogenetics in AML/MDS patients. *Int J Cancer*. 2022;150:1998-2011.
- Puiggros A, Ramos-Campoy S, Kamaso J, de la Rosa M, Salido M, Melero C, et al. Optical genome mapping: a promising new tool to assess genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancers (Basel)*. 2022;14:3376.
- Rack K, De Bie J, Amey G, Gielen O, Demeyer S, Cools J, et al. Optimizing the diagnostic workflow for acute lymphoblastic leukemia by optical genome mapping. *Am J Hematol*. 2022;97:548-61.
- Sahajpal NS, Mondal AK, Tvrdik T, Hauenstein J, Shi H, Deeb KK, et al. Clinical validation and diagnostic utility of optical genome mapping for enhanced cytogenomic analysis of hematological neoplasms. *J Mol Diagn*. 2022;24:1279-91.
- Levy B, Baughn LB, Akkari Y, Chartrand S, LaBarge B, Claxton D, et al. Optical genome mapping in acute myeloid leukemia: a multicenter evaluation. *Blood Adv*. 2023;7:1297-307.
- Valkama A, Vorimo S, Kumpula TA, Räsänen H, Savolainen ER, Pylkäs K, et al. Optical genome mapping as an alternative to FISH-based cytogenetic assessment in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2023; 15:1294.
- Smith AC, Neveling K, Kanagal-Shamanna R. Optical genome mapping for structural variation analysis in hematologic malignancies. *Am J Hematol*. 2022;97:975-82.
- Chong LC, Ben-Neriah S, Slack GW, Freeman C, Ennishi D, Mottok A, et al. High-resolution architecture and partner genes of MYC rearrangements in lymphoma with DLBCL morphology. *Blood Adv*. 2018;2:2755-65.
- López C, Burkhardt B, Chan JKC, Leoncini L, Mbulaiteye SM, Ogowang MD, et al. Burkitt lymphoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2022;8:78.
- Yang H, Garcia-Manero G, Sasaki K, Montalban-Bravo G, Tang Z, Wei Y, et al. High-resolution structural variant profiling of myelodysplastic syndromes by optical genome mapping uncovers cryptic aberrations of prognostic and therapeutic significance. *Leukemia*. 2022;36:2306-16.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140:1200-28.
- Khoury JD, Solary E, Abal O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1703-19.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120:2454-65.
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012; 30:820-9.
- Balducci E, Kaltenbach S, Villares P, Duroyon E, Zalmal I, Friedrich C, et al. Optical genome mapping refines cytogenetic diagnostics, prognostic stratification and provides new molecular insights in adult MDS/AML patients. *Blood Cancer J*. 2022;12:126.
- Pastor-Galán I, Hernández-Boluda JC, Correa JG, Alvarez-Larrán A, Ferrer-Marín F, Raya JM, et al. Clinico-biological characteristics of patients with myelofibrosis: an analysis of 1,000 cases from the Spanish Registry of Myelofibrosis. *Med Clin (Barc)*. 2020;155:152-8.
- Díaz-González Á, Mora E, Avetisyan G, Furió S, De la Puerta R, Gil JV, et al. Cytogenetic assessment and risk stratification in myelofibrosis with optical genome mapping. *Cancers*. 2023;15:3039.
- Kelemen K, Saft L, Craig FE, Orazi A, Nakashima M, Wertheim GB, et al. Eosinophilia/hypereosinophilia in the setting of reactive and idiopathic causes, well-defined myeloid or lymphoid leukemias, or germline disorders. *Am J Clin Pathol*. 2021;155:179-210.
- Podvin B, Roynard P, Boudry A, Guermouche H, Daudignon A, Terriou L, et al. Whole-genome optical mapping to elucidate myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and tyrosine kinase gene fusions. *Leuk Res*. 2022;123:106972.
- Schwab C, Harrison CJ. Advances in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia genomics. *Hemasphere*. 2018;2:e53.
- Zaliova M, Stuchly J, Winkowska L, Musilova A, Fiser K, Slamova M, et al. Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica*. 2019;104:1396-406.
- Molina O, Bataller A, Thampi N, Ribera J, Granada I, Velasco P, et al. Near-haploidy and low-hypodiploidy in B-cell acute lymphoblastic leukemia: when less is too much. *Cancers*. 2021;14:32.
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1720-48.
- Moorman AV, Barretta E, Butler ER, Ward EJ, Twentyman K, Kirkwood AA, et al. Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: a UKALL14 study. *Leukemia*. 2022;36:625-36.
- Ryan SL, Peden JF, Kingsbury Z, Schwab CJ, James T, Polonen P, et al. Whole genome sequencing provides comprehensive genetic testing in childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2023;37:518-28.
- Gao H, Xu H, Wang C, Cui L, Huang X, Li W, et al. Optical genome mapping for comprehensive assessment of chromosomal aberrations and discovery of new fusion genes in pediatric B-acute lymphoblastic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022;15:35.
- Gianni F, Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10:a035246.
- Genescà E, Morgades M, González-Gil C, Fuster-Tormo F, Haeflrich C, Megendorfer M, et al. Adverse prognostic impact of complex karyotype (≥ 3 cytogenetic alterations) in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leuk Res*. 2021;109:106612.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-6.
- Ramos-Campoy S, Puiggros A, Beà S, Bougeon S, Larráyoz MJ, Costa D, et al. Chromosome banding analysis and genomic microarrays are both useful but not equivalent methods for genomic complexity risk stratification in chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica*. 2022;107:593-603.
- Ramos-Campoy S, Puiggros A, Kamaso J, Beà S, Bougeon S, Larráyoz MJ, et al. TP53 abnormalities are underlying the poor outcome associated with chromothripsis in chronic lymphocytic leukemia patients with complex karyotype. *Cancers (Basel)*. 2022;14:3715.

39. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33:2863-9.
40. D'Agostino M, Cairns DA, Lahuerta JJ, Wester R, Bertsch U, Waage A, et al. Second revision of the International Staging System (R2-ISS) for overall survival in multiple myeloma: a European Myeloma Network (EMN) report within the HARMONY Project. *J Clin Oncol*. 2022;40:3406-18.
41. Mueller SB, Dal Cin P, Le LP, Dias-Santagata D, Lennerz JK, Iafrate AJ, et al. t(4;12)(q12;p13) ETV6-rearranged AML without eosinophilia does not involve PDGFRA: relevance for imatinib insensitivity. *Blood Adv*. 2022;6:818-27.
42. Berger R, Bernheim A, Daniel M, Valensi F, Flandrin G. [Induced leukemias. Cytogenetical and cytological aspects. Comparison with primitive leukemias]. *Nouv Rev Fr Hematol* (1978). 1981;23:275-84.
43. Nguyen-Khac F, Bidet A, Daudignon A, Lafage-Pochitaloff M, Ameye G, Bilhou-Nabéra C, et al. The complex karyotype in hematological malignancies: a comprehensive overview by the Francophone Group of Hematological Cytogenetics (GFCH). *Leukemia*. 2022;36:1451-66.
44. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140:1345-77.
45. 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;116:354-65.
46. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 2019;133:1205-16.
47. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109:3189-97.
48. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011;144:27-40.
49. Holland AJ, Cleveland DW. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med*. 2012;18:1630-8.
50. Pellestor F, Gaillard JB, Schneider A, Puechberty J, Gatinois V. Chromoanagenesis, the mechanisms of a genomic chaos. *Semin Cell Dev Biol*. 2022;123:90-9.
51. Pellestor F. Chromoanagenesis: cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. *Mol Cytogenet*. 2019;12:6.
52. Cisneros A, Mallo M, Tijero J, Sureda A, Clapés V, González-Montes Y. Mapeo óptico del genoma (OGM): validación y utilidad en el diagnóstico citogenético del mieloma múltiple (MM). Presentado en: LXIV Congreso Nacional de la SEHH; 6-8 octubre 2022; Barcelona, España. [consultado: 26 junio 2023]. Disponible en: https://www.hemato2022.com/wp-content/themes/maniva-meetup/pdfs/publicaciones/sangre_22_41_supl-2.pdf.
53. Salido M, Puiggròs A, Rodríguez-Rivera M, Melero C, Kamaso J, Satolaya I. Utilidad de la técnica de mapeo óptico del genoma en el estudio del linfoma de la zona marginal esplénico. Presentado en: LXIV Congreso Nacional de la SEHH; 6-8 Octubre 2022; Barcelona, España. [consultado: 26 junio 2023]. Disponible en: https://www.hemato2022.com/wp-content/themes/maniva-meetup/pdfs/publicaciones/sangre_22_41_supl-2.pdf.
54. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2018;379:1416-30.
55. Kriegova E, Fillerova R, Minarik J, Savara J, Manakova J, Petrackova A, et al. Whole-genome optical mapping of bone-marrow myeloma cells reveals association of extramedullary multiple myeloma with chromosome 1 abnormalities. *Sci Rep*. 2021;11:14671.
56. Suttrop J, Lüthmann JL, Behrens YL, Göhring G, Steinemann D, Reinhardt D, et al. Optical genome mapping as a diagnostic tool in pediatric acute myeloid leukemia. *Cancers*. 2022;14:2058.
57. Soler G, Ouedraogo ZG, Gourmy C, Lebecque B, Aspas Requena G, Ravinet A, et al. Optical genome mapping in routine cytogenetic diagnosis of acute leukemia. *Cancers*. 2023;15:2131.
58. Vieler LM, Nilius-Eliwi V, Schroers R, Vangala DB, Nguyen HP, Gerding WM. Optical genome mapping reveals and characterizes recurrent aberrations and new fusion genes in adult ALL. *Genes*. 2023;14:686.