

Aplicación clínica del diagnóstico molecular en trastornos mieloides: recomendaciones para implementar una estrategia común en los centros españoles

Clinical application of molecular diagnostics in myeloid disorders: recommendations for implementing a common strategy in Spanish centers

Marta Pratcorona¹, M. Carmen Chillón², María José Calasanz³, Maite Gómez Casares⁴, Eva Barragán⁵, Beatriz Bellosillo⁶, Rosa Ayala⁷, Jorge Sierra¹ y Ramón García Sanz⁸

¹Servicio de Hematología, Instituto de Investigación Biomédica (IIB-SP) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau e Instituto de Investigación Josep Carreras (IJC) Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona; ²Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL/CSIC); CIBERONC; Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, Salamanca; ³Unidad de Diagnóstico Genético Hematológico de la Universidad de Navarra, CIBERONC, Pamplona; ⁴Servicio de Hematología y Unidad de Investigación, Hospital Universitario Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria; ⁵Unidad de Biología Molecular, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ⁶Departamento de Patología, Hospital del Mar, Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM), CIBERONC, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona; ⁷Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación i+12, Universidad Complutense de Madrid, Madrid. España

Resumen

Introducción: La estandarización del diagnóstico y monitorización molecular en neoplasias mieloides es un desafío aún no resuelto en España. Se precisa armonizar los estudios genéticos y moleculares en estas enfermedades para que todos los pacientes tengan acceso a un diagnóstico completo con independencia del área en la que se encuentren.

Material y métodos: Desde la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) se ha promovido el proyecto Precision Medicine Alliance in Hematology en patología mieloide. Se utilizó metodología de Laboratorio de ideas (Think Tank) con nueve expertos clínicos y moleculares pertenecientes a los principales grupos cooperativos (SEHH, PETHEMA, CETLAM, GBMH y GECGH). Hubo tres reuniones de consenso de caracterización en leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD) y neoplasias mieloproliferativas (NMP), para facilitar su uniformidad y accesibilidad en todo el país. **Resultados:** Sin alcanzar una estandarización completa en España para utilizar una misma tecnología, sí se consensuaron los estudios mínimos necesarios en pacientes con LMA, SMD y NMP. El consenso incluye determinaciones iniciales y de secuenciación de nueva generación, así como criterios mínimos de calidad y tiempos de respuesta. **Conclusiones:** Se ha llegado a un consenso en el estudio molecular de LMA, SMD y NMP, avalado por la SEHH y sus grupos más representativos.

Palabras clave: Leucemia mieloide aguda. Síndromes mielodisplásicos. Neoplasias mieloproliferativas. Diagnóstico molecular. Estudios genéticos. Panel mieloide.

Correspondencia:

*Ramón García Sanz
E-mail: rgarcias@usal.es

Fecha de recepción: 08-11-2021

Fecha de aceptación: 30-03-2022

DOI: 10.24875/SANGRE.21000005

Disponible en internet: 16-06-2022

Sangre. 2022;41(1):27-38

www.revistasangre.com

0036-4355 / © 2022 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

Introduction: The standardization of diagnosis and molecular monitoring in myeloid disorders is a challenge that has not yet been resolved in Spain. It is necessary to harmonize genetic and molecular studies in these diseases so that all patients have access to a complete diagnosis regardless of the area in which they are. **Material and methods:** The Spanish Society of Hematology and Hemotherapy (SEHH) has promoted the project Precision Medicine Alliance in Hematology in myeloid pathology. The project followed the Think Tank methodology, with nine clinical and molecular experts from the main cooperative groups (SEHH, PETHEMA, CETLAM, GBMH and GECGH). There were three consensus meetings addressing characterization in acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndromes (MDS) and myeloproliferative neoplasms (MPN), to facilitate uniformity and accessibility throughout the country. **Results:** Without achieving a total standardization in Spain in which all centers use the same technology, the minimum necessary studies were agreed in patients with AML, MDS and MPN. The consensus includes initial and next-generation sequencing determinations, as well as the minimum quality criteria and response times. **Conclusions:** A consensus has been reached in the molecular study of AML, MDS and MPN, endorsed by the SEHH and its most representative groups.

Keywords: Acute myeloid leukemia. Myelodysplastic syndromes. Myeloproliferative neoplasms. Molecular diagnosis. Genetic studies. Myeloid panel.

Introducción

El diagnóstico de las neoplasias hematológicas se ha basado clásicamente en la citología e histología. Sin embargo, los avances técnicos han hecho que tenga que ser complementado con una caracterización genética, molecular e inmunológica que ha determinado un creciente aumento del nivel de complejidad de los estudios diagnósticos¹. El planteamiento y desarrollo de estrategias de armonización y consenso a nivel nacional tiene como objetivo asegurar el acceso a un correcto diagnóstico de todos los pacientes, con independencia del centro o área donde sean atendidos. Solo así se garantizará un tratamiento óptimo y ajustado a las características moleculares de las neoplasias de cada paciente. Bajo esta perspectiva se ha desarrollado el proyecto *Precision Medicine Alliance in Hematology* en patología mieloide siguiendo una metodología de Laboratorio de ideas (*Think Tank*) para la generación de ideas en un grupo de trabajo formado por expertos en el diagnóstico de estas enfermedades, con el propósito de consensuar los procesos implicados en su caracterización molecular para asegurar una accesibilidad uniforme en el diagnóstico de la leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD) y neoplasias mieloproliferativas (NMP) en todo el territorio nacional. La disponibilidad de un documento de posicionamiento con la presentación y justificación de un panel mieloide necesario para su uso en la práctica clínica puede ser la base para la aprobación e inclusión formal de dichos procedimientos diagnósticos y de seguimiento en la cartera de servicios del Sistema Nacional de Salud.

Métodos

La metodología usada se ha basado en el método del Laboratorio de ideas, que consiste en la reunión de un grupo de expertos, en este caso, de expertos en el diagnóstico de patología mieloide, para discutir cuáles son las pruebas imprescindibles para el correcto diagnóstico de cada una de las distintas patologías. Esta reunión fue coordinada por la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH).

Para facilitar el trabajo de propuesta y aprobación de estas variables, se organizaron tres grupos de trabajo: LMA, SMD y NMP, que se reunieron en diversas ocasiones hasta conseguir una propuesta final. Las recomendaciones en relación con la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), aun tratándose de un síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo, se englobaron dentro del grupo de los SMD.

Finalmente, las conclusiones de cada uno de los grupos se expusieron en una reunión común para consensuar el trabajo realizado y el formato de las distintas tablas resumen correspondientes a cada una de las patologías. El objetivo de estas tablas era que fueran de máxima utilidad para el trabajo diario de los distintos laboratorios de diagnóstico hematológico.

Leucemia mieloide aguda

El diagnóstico de la LMA es un proceso multidisciplinario que integra los resultados de diferentes técnicas incluyendo la citomorfología, citometría de flujo, citogenética y biología molecular². Concretamente, los estudios citogenéticos y moleculares son el pilar fundamental para determinar los grupos de riesgo,

orientar el tratamiento y definir los marcadores de seguimiento con el fin de detectar enfermedad residual medible en los pacientes de alto riesgo.

Diagnóstico y estratificación pronóstica

Los sistemas de clasificación de la LMA han incorporado nuevas entidades basadas en criterios moleculares, tales como la LMA con el gen *NPM1* mutado³, LMA con mutaciones bialélicas de *CEBPA*⁴ y LMA con *RUNX1* mutado⁵, habiéndose creado, además, la categoría de «neoplasias mieloides con predisposición hereditaria», asociada a mutaciones germinales en los genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *ANKRD26*, *ETV6*, *SRP72* y *TP53*⁶⁻⁹.

Los primeros marcadores moleculares incorporados en la estratificación pronóstica propuesta por el grupo *European Leukemia Net* (ELN)² fueron *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*. Las duplicaciones internas en tándem (ITD) en el gen *FLT3* (*FLT3*-ITD) confieren mal pronóstico en los pacientes con LMA con cariotipo normal y se correlacionan con resistencia al tratamiento de inducción, aparición de recaídas y menor supervivencia¹⁰⁻¹². También es relevante determinar el ratio o cociente *FLT3*-ITD (alelo mutado/alelo no mutado), ya que ratios bajas (< 0,5) no parecen conferir este pronóstico adverso si coexiste una mutación favorable^{13,14}. De forma más concreta, las mutaciones en *NPM1*^{11,14} en ausencia de *FLT3*-ITD o en su presencia pero con cociente bajo (< 0,5) perfilan un grupo de pronóstico favorable, al igual que las mutaciones bialélicas en *CEBPA*^{2,15}.

El desarrollo de técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS) ha permitido identificar nuevos marcadores moleculares con impacto pronóstico. La última clasificación genética de la ELN de 2017 incluye, entre otros genes con impacto pronóstico, las mutaciones en *RUNX1* y *ASXL1* que se relacionan con un pronóstico desfavorable², especialmente cuando ambas mutaciones están presentes^{5,16}. Las mutaciones en el gen *TP53* se asocian a cariotipo complejo o monosómico y confieren muy mal pronóstico¹⁷, que empeora aún más cuando coexisten alteraciones citogenéticas y moleculares^{18,19}.

El detalle de los estudios recomendables para el diagnóstico genético/molecular de las LMA se presenta en la **tabla 1**.

Terapias dirigidas

Las nuevas terapias que actúan de manera dirigida atacando selectivamente a las células leucémicas

constituyen un importante avance en el tratamiento de la LMA más allá de los esquemas quimioterápicos estándar. Los estudios moleculares permiten una selección más precisa de los pacientes que cumplen criterios para la indicación de estos tratamientos. Los inhibidores de *FLT3* en combinación con la quimioterapia han sido aprobados para pacientes con LMA *FLT3* mutado (ITD y dominio tirosina cinasa [TKD]) de nuevo diagnóstico²¹, y en monoterapia para pacientes con recaída o LMA refractaria²². Los inhibidores ivosidenib²⁴ y enasidenib²⁵ han recibido recientemente aprobación para pacientes LMA con mutaciones en *IDH1* e *IDH2* en recaída/refractariedad.

Monitorización de la enfermedad mínima residual

La disponibilidad actual de técnicas de inmunofenotipado y/o marcadores moleculares permite determinar la cinética de desaparición de la enfermedad, diseñar estrategias individualizadas de tratamiento post-remisión y detectar precozmente las recaídas²⁶. La detección molecular de enfermedad residual medible (ERM) se realiza clásicamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) cuantitativa (RT-qPCR) por la sensibilidad de esta técnica (10⁻⁴-10⁻⁶). En el momento presente, la detección de los reordenamientos *RUNX1-RUNX1T1*, *CEBFB-MYH11*, *PML-RARA* y la mutación *NPM1* mediante RT-qPCR son los únicos marcadores obligatorios de ERM en las recomendaciones de la ELN²⁶ y las del presente consenso. En la **tabla 1** se incluyen los estudios obligatorios y los recomendados para la monitorización de la enfermedad, que se han consensuado y que el grupo de biología molecular en hematología y la SEHH hacen suyos.

Algoritmo diagnóstico

El tratamiento de la LMA es un proceso complejo que requiere la combinación de diferentes técnicas. Ello es debido a la disponibilidad de un número creciente de marcadores genéticos y moleculares con valor diagnóstico y pronóstico, así como la necesidad de obtener información rápida para identificar a los candidatos a las terapias dirigidas. Para estar en condiciones de superar estos desafíos, el laboratorio clínico debe adaptarse tecnológicamente, complementando las técnicas convencionales con la implementación de nuevas tecnologías como la NGS que permitan optimizar el diagnóstico molecular.

Tabla 1. Estudios para el diagnóstico genético-molecular y monitorización en la leucemia mieloide aguda (LMA)

Estudios genéticos/moleculares	Técnica	Obligado o recomendado	Tiempo de entrega del resultado	Observaciones*
<p>Diagnóstico</p> <ul style="list-style-type: none"> – Cariotipo en al menos 20 metafases – t (15;17) <i>PML-RARA</i> (si morfología o clínica es sugerente de M3 o variante) – inv (16) <i>CBFB-MYH11k</i> (8;21) <i>RUNX1-RUNX1T1</i> (en todas) – Si cariotipo normal o no informativo y no resuelto por análisis molecular: <ul style="list-style-type: none"> • del (5q), del (7q), trisomía 8, 11q23, del (17p) • t (9;22) <i>BCR-ABL1</i> 	<p>Análisis citogenético</p> <p>FISH/RT-qPCR</p> <p>FISH/RT-qPCR</p> <p>FISH/RT-qPCR</p> <p>RT-qPCR</p>	<p>Obligado</p> <p>Obligado</p> <p>Obligado</p> <p>Obligado</p> <p>Recomendado</p>	<p>7 a 10 días</p> <p>< 3 días</p> <p>< 4 días</p> <p>3 días</p> <p>3 días</p>	<p>Cada centro selecciona la técnica que más le convenga en función de los tiempos de entrega requeridos para el diagnóstico</p> <p>Cada centro selecciona la técnica que más le convenga en función de los tiempos de entrega requeridos para el diagnóstico</p> <p>Cada centro selecciona la técnica que más le convenga en función de los tiempos de entrega requeridos para el diagnóstico</p> <p>Cada centro selecciona la técnica que más le convenga en función de los tiempos de entrega requeridos para el diagnóstico</p>
<ul style="list-style-type: none"> – Estudios moleculares: <ul style="list-style-type: none"> • <i>FLT3-ITD</i> (ratio) • <i>FLT3-TKD</i> • <i>NPM1</i> • <i>CEBPA</i> • <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> • <i>ASXL1</i>, <i>CEBPA</i>, <i>FLT3</i>, <i>IDH1</i>, <i>IDH2</i>, <i>NPM1</i>, <i>RUNX1</i>, <i>TP53</i> • <i>BCOR</i>, <i>BRAF</i>, <i>CARL</i>, <i>CBL</i>, <i>CSF3R</i>, <i>DNMT3A</i>, <i>ETV6</i>, <i>EZH2</i>, <i>GATA2</i>, <i>HRAS</i>, <i>LAK2</i>, <i>KIT</i>, <i>KRAS</i>, <i>MPL</i>, <i>NRAS</i>, <i>PHF6</i>, <i>PTPN11</i>, <i>SETBP1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SH2B3</i>, <i>SRSF2</i>, <i>TET2</i>, <i>U2AF1</i>, <i>WT1</i>, <i>ZRSR2</i> 	<p>PCR y electroforesis capilar</p> <p>HRM/Sanger</p> <p>PCR y electroforesis capilar/Sanger</p> <p>PCR y electroforesis capilar/Sanger</p> <p>HRM/Sanger</p> <p>Secuenciación masiva (NGS)</p> <p>Secuenciación masiva (NGS)</p>	<p>Obligado</p> <p>Obligado</p> <p>Obligado</p> <p>Recomendado</p> <p>Obligado</p> <p>Obligado</p> <p>Recomendado</p>	<p>3 días</p> <p>3 días</p> <p>< 7 días</p> <p>< 7 días</p> <p>< 7 días</p> <p>15 a 20 días</p> <p>15 a 20 días</p>	<p>FLT3-ITD: duplicaciones internas en tándem (ITD). La cuantificación de la ratio de ITD (alelo mutado/alelo salvaje) es obligatoria, ya que condiciona la clasificación pronóstica. Las ITD con ratio $\geq 0,5$ en ausencia de mutaciones en <i>NPM1</i> definen un grupo de alto riesgo². FLT3-TKD: mutaciones puntuales en el dominio tirosina cinasa (TKD). El impacto pronóstico de estas mutaciones no está bien definido</p> <p>Genes obligados por su implicación en guías clínicas, terapias dirigidas y/o estratificación de riesgo. <i>FLT3</i> tiene valor pronóstico (ITD) y, además, los pacientes con <i>FLT3</i> mutado (ITD o TKD) podrían beneficiarse del tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa²⁰. <i>CEBPA</i> y <i>NPM1</i> tienen valor diagnóstico, definen categorías de LMA según la OMS 2016²⁰ y se asocian con mejor pronóstico²¹. <i>ASXL1</i>, <i>RUNX1</i> y <i>TP53</i> clasifican a los pacientes en el grupo de riesgo adverso². <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> pueden constituir dianas terapéuticas^{23,24}</p>

(continúa)

Tabla 1. Estudios para el diagnóstico genético-molecular y monitorización en la leucemia mieloide aguda (LMA) (continuación)

Estudios genéticos/moleculares	Técnica	Obligado o recomendado	Tiempo de entrega del resultado	Observaciones*
<ul style="list-style-type: none"> <i>RUNX1, CEBPA, GATA2, DDX41, ANKRD26, ETV6, SRP72, TP53</i> Genotipado HLA (si el paciente es candidato a trasplante) 	Secuenciación masiva (NGS)	Recomendado	15 a 20 días	Genes recomendados dependiendo del diseño del panel de cada laboratorio (además se incluyen genes SMD y SMP para las LAM secundarias)
Monitorización <ul style="list-style-type: none"> t (15;17) <i>PML-RARA</i> inv (16) <i>CBFB-MYH11</i> t (8;21) <i>RUNX1-RUNX1T1</i> <i>NPM1</i> Sobreexpresión de <i>WT1</i> 	PCR-rSSO/Luminex	Recomendado	< 7 días	
	RT-qPCR	Obligado	< 4 días	Marcadores moleculares recomendados para la monitorización fiable de enfermedad residual medible ²²¹
	RT-qPCR	Obligado	< 4 días	
	RT-qPCR	Obligado	< 4 días	
	RT-qPCR	Obligado	< 4 días	
	RT-qPCR	Recomendado	< 4 días	Si no existe otro marcador para el seguimiento

*Los superíndices indican las principales referencias bibliográficas.
 FISH: hibridación fluorescente *in situ*; HLA: antígeno leucocitario humano; OMS: Organización Mundial de la Salud; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; rSSO: RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa.

La estrategia adoptada mayoritariamente consiste en la combinación de técnicas citogenéticas y moleculares con cribado rápido por PCR de un número limitado de genes, seguido de caracterización molecular exhaustiva mediante NGS, tal como se indica a continuación:

- Diagnóstico dirigido mediante PCR para detectar mutaciones en los genes *NPM1*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2* y los reordenamientos más frecuentes *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11*. Ello permite conocer de forma rápida, en el plazo de 1 a 7 días, y con un coste asumible las principales alteraciones que van a influir en las decisiones del manejo inicial de la enfermedad.
- Diagnóstico mediante NGS para detectar mutaciones recurrentes en un panel de genes relacionados con las neoplasias mieloides. Permite completar la caracterización molecular en 2-3 semanas y resulta de gran utilidad para refinar la estratificación del riesgo y adaptar la terapia post-remisión.

Otras consideraciones

El uso de las técnicas de NGS ha permitido identificar una enorme diversidad de mutaciones genéticas, aunque solo seis genes (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53*) ya se han incorporado a las categorías de riesgo propuestas por la ELN². En este contexto, la secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS) y la secuenciación del exoma completo (*whole exome sequencing*, WES) pueden permitir una correcta caracterización genética de la LMA, detectando variantes patogénicas ya conocidas u otras nuevas en genes relevantes. Sin embargo, ambos procedimientos de secuenciación presentan limitaciones que dificultan su incorporación en la práctica clínica, tales como el requisito de un potente análisis informático para filtrar e interpretar la gran cantidad de variantes generadas por paciente, algo no siempre disponible. Además, estas técnicas genómicas a gran escala pueden no detectar mutaciones clínicamente relevantes en variantes con frecuencias alélicas bajas (mutaciones subclonales), como en *FLT3* o *TP53*^{27,28}. En lo que respecta a la capacidad para identificar reordenamientos dentro de los genes, la WGS ofrece un enfoque similar a la citogenética convencional, pero está limitada por la mayor complejidad analítica y la baja disponibilidad, mientras que la WES tiene una capacidad reducida para detectar dichos reordenamientos²⁹.

Teniendo en cuenta las limitaciones actuales de la NGS, muchos laboratorios han desarrollado estrategias que incluyen cariotipo, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), PCR y RT-PCR, secuenciación Sanger y NGS dirigida en varios pasos, lo que permite desarrollar algoritmos de diagnóstico asequibles para un gran número de pacientes^{2,30-32}. Estas estrategias intentan reducir la complejidad y duración de las técnicas analíticas, así como los costes globales. En la actualidad existe un interés creciente en desarrollar algoritmos que cubran no solo todos los diagnósticos posibles, sino también herramientas de pronóstico, así como parámetros válidos para la predicción de respuesta tras el uso de terapias específicas, lo que se ha conjugado bajo el término de «medicina de precisión». Algunos grupos han tratado de resolver la necesidad de este enfoque mediante el uso exclusivo de técnicas de NGS, pero aún no está establecida la herramienta de diagnóstico definitiva, debido especialmente a dificultades tecnológicas y problemas de interpretación.

Síndromes mielodisplásicos

El diagnóstico de los SMD es un proceso multidisciplinario que requiere de la integración de técnicas de citomorfología y de citogenética y biología molecular. La presencia de marcadores cromosómicos proporciona información relevante desde el punto de vista diagnóstico (p. ej., síndrome 5q-) y pronóstico (la citogenética se incluye en el *Revised International Prognostic Scoring System* [IPSS-R] y permite estratificar el riesgo del paciente). También es un elemento muy capaz para predecir la respuesta (p. ej., delección 5q y respuesta al tratamiento con lenalidomida). Además, en los últimos años, los estudios de NGS han permitido identificar varias mutaciones genéticas en pacientes con SMD, que pueden contribuir a mejorar la información diagnóstica, pronóstica y la elección del tratamiento. Existen iniciativas para la inclusión de las técnicas de NGS en la práctica asistencial, y se han publicado previamente guías de recomendación para su correcto uso³³.

Se han identificado más de 40 mutaciones recurrentes presentes en más del 80% de los pacientes³. Los genes *TET2*, *SF3B1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *RUNX1*, *TP53*, *U2AF1*, *EZH2*, *ZRSR2*, *STAG2*, *CBL*, *NRAS*, *JAK2*, *SETBP1*, *IDH1*, *IDH2* y *ETV6* son los que presentan mutaciones con más frecuencia. Respecto al diagnóstico, las mutaciones en el gen *SF3B1* aportan información de un subtipo específico de SMD, la anemia

refractaria con sideroblastos en anillo (ARS). Algunas de estas mutaciones también se asocian con datos clínico-biológicos desfavorables como cariotipo complejo (*TP53*), SMD con exceso de blastos (*RUNX1*, *NRAS* y *TP53*) y trombocitopenia severa (*RUNX1*, *NRAS*, y *TP53*). Los estudios para el diagnóstico genético y molecular de los SMD se resumen en la **tabla 2**.

En cuanto a su valor pronóstico, las mutaciones en los genes *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* y *ASXL1* se asocian a una menor supervivencia global en los modelos ajustados por IPSS e IPSS-R en distintas cohortes^{36,37}. Las mutaciones en el gen *ASXL1* se han descrito como factor independiente de riesgo adverso en la LMMC³⁸. Además, independientemente del gen mutado, el número de mutaciones *driver* se ha consolidado como un factor pronóstico desfavorable en la mayoría de las series publicadas, ya que tres o más mutaciones confieren un pronóstico adverso³⁹. Los estudios genéticos y moleculares con valor pronóstico en los SMD también están resumidos en la **tabla 2**.

Finalmente, aunque se dispone de un menor volumen de evidencia, en cuanto al valor de las mutaciones como marcadores predictivos de respuesta, las mutaciones en el gen *TET2* se han asociado con mejores respuestas a tratamiento con agentes hipometilantes⁴⁰. También los pacientes con del(5q), tanto de forma aislada como en pacientes con cariotipo complejo, tienen una frecuencia alta de mutaciones en *TP53* y estas mutaciones se asocian con peor respuesta al tratamiento con lenalidomida y mayor riesgo de recaída⁴¹. Los estudios genéticos y moleculares de marcadores diana incluidos en los algoritmos terapéuticos de los SMD se describen en la **tabla 3**.

Neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas

Las NMP Ph negativas clásicas, policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria (MFP), se caracterizan por la presencia de alteraciones moleculares conductoras o *driver* de la enfermedad que afectan a la vía de señalización JAK-STAT y a los receptores de crecimiento celular hematopoyético. Los genes implicados incluyen *JAK2*, *CALR* y *MPL* y su presencia se ha incorporado como criterio diagnóstico de estas entidades⁴⁴.

Adicionalmente pueden existir alteraciones en otros genes implicados en patología mielode, como genes

Tabla 2. Estudios genéticos–moleculares para el diagnóstico y pronóstico de los síndromes mielodisplásicos (SMD)

Estudios genéticos–moleculares	Técnica	Obligado o recomendado	Tiempo de entrega del resultado	Observaciones*
Diagnóstico				
– Cariotipo en al menos 20 metafases	Análisis citogenético	Obligado	7 a 10 días	Estudio citogenético en médula ósea por cariotipo estándar.
– 5q, 20q, 7, 8	FISH	Obligado	3 días	Si cariotipo (≥ 20 metafases) no se puede obtener, utilizar técnicas de FISH u otros estudios moleculares propuestos. Si cariotipo normal con datos de displasia morfológica, utilizar técnicas de FISH y otros estudios moleculares propuestos.
– Genes mutados en más del 5% en SMD: <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>TP53</i> , <i>STAG2</i> , <i>NRAS</i>	Secuenciación masiva (NGS)	Recomendado	15 a 20 días	En médula ósea o sangre periférica se recomienda valorar mutaciones asociadas a SMD usando paneles de genes correspondientes a genes mutados en más o menos del 5% de SMD. Estas mutaciones genéticas pueden establecer la presencia de clonalidad de la hematopoyesis, lo que puede excluir causas benignas de citopenias en casos sin diagnóstico morfológico, pero no establecer un diagnóstico de SMD en ausencia de criterios clínicos diagnósticos.
– Genes mutados en menos del 5% en SMD: <i>CBL</i> , <i>NF1</i> , <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i> , <i>ETV6</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>SETBP1</i> , <i>PHF6</i> , <i>BCOR</i> , <i>CSF3R</i>	Secuenciación masiva (NGS)	Recomendado	15 a 20 días	En médula ósea o sangre periférica se recomienda valorar mutaciones asociadas a SMD usando paneles de genes correspondientes a genes mutados en más o menos del 5% de SMD. Estas mutaciones genéticas pueden establecer la presencia de clonalidad de la hematopoyesis, lo que puede excluir causas benignas de citopenias en casos sin diagnóstico morfológico, pero no establecer un diagnóstico de SMD en ausencia de criterios clínicos diagnósticos.
– <i>ANKRD26</i> , <i>CEBPA</i> , <i>DDX41</i> , <i>ETV6</i> , <i>GATA2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>TERC</i> , <i>TP53</i>	Secuenciación masiva (NGS)	Recomendado	15 a 20 días	En algunos pacientes hay que sospechar síndromes de fallo medular congénito en pacientes con citopenias con o sin SMD, como pediátricos, jóvenes o con síndromes predisponen a SMD/LMA. Estudio de variantes germinales en genes asociados a neoplasias mieloides hereditarias con alto nivel de evidencia: <i>ANKRD26</i> , <i>CEBPA</i> , <i>DDX41</i> , <i>ETV6</i> , <i>GATA2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>TERC</i> , <i>TERT</i> , <i>TP53</i> ³⁴
Pronóstico				
– Marcadores citogenéticos	Análisis citogenético	Obligado	7 a 10 días	Marcadores citogenéticos incluidos en los <i>scores</i> pronósticos (IPSS–R) ³⁵
– <i>TP53</i>	Sanger/ secuenciación masiva (NGS)	Obligado	15 a 20 días	
– SMD: <i>TP53</i> , <i>RUNX1</i> , <i>ETV6</i> , <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i>	Secuenciación masiva (NGS)	Recomendado	15 a 20 días	Marcadores pronósticos recomendados aunque no están incluidos en los <i>scores</i> pronósticos utilizados actualmente (IPSS e IPSS–R).
– LMMC: <i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> , <i>SETBP1</i>	Secuenciación masiva (NGS)	Recomendado	15 a 20 días	<i>ASXL1</i> incluido en los <i>scores</i> pronósticos y terapéuticos de la LMMC; <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> y <i>SETBP1</i> incluidos en los <i>scores</i> pronósticos de LMMC.
– <i>SF3B1</i>	Sangre/ secuenciación masiva (NGS)	Obligado	15 a 20 días	En sospecha de ARS aunque no cumpla los criterios diagnósticos clásicos (número de sideroblastos).

*Los superíndices indican las principales referencias bibliográficas.

ARS: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; FISH: hibridación fluorescente *in situ*; IPSS: *International Prognostic Scoring System*; IPSS–R: *Revised International Prognostic Scoring System*; LMA: leucemia mieloide aguda; LMMC: leucemia mielomonocítica crónica.

Tabla 3. Estudios genéticos-moleculares de marcadores diana o incluidos en algoritmos terapéuticos en los síndromes mielodisplásicos (SMD)

Estudios genéticos-moleculares	Técnica	Obligado o recomendado	Tiempo de entrega del resultado	Observaciones*
– del (5q)	Cariotipo/FISH	Obligado	3 a 10 días	Predice respuesta a lenalidomida ⁴²
– <i>SF3B1</i>	Sangre/secuenciación masiva (NGS)	Obligado	15 a 20 días	Predice respuesta a la combinación de eritropoyetina y factor estimulante de colonias de granulocitos (EPO+G-CSF) o luspatercept ⁴²
– <i>TET2</i> , <i>ASXL1</i>	Secuenciación masiva (NGS)	Recomendado	15 a 20 días	Mutación de <i>TET2</i> y ausencia de mutaciones en <i>ASXL1</i> predicen respuesta a azacitidina ³⁶
– <i>TP53</i>	Sangre/secuenciación masiva (NGS)	Obligado	15 a 20 días	<i>TP53</i> , vías RAS, JAK2 permite ajuste para régimen de acondicionamiento en el trasplante alogénico ⁴³
– Vías RAS, JAK2	Secuenciación masiva (NGS)/PCR/qPCR/HRM	Recomendado	5 a 20 días	<i>TP53</i> , vías RAS, JAK2 permite ajuste para régimen de acondicionamiento en el trasplante alogénico ⁴³
– Si selección de donante para trasplante alogénico, estudio en centros de referencia mediante un panel de genes	Secuenciación masiva (NGS)	Obligado	15 a 20 días	Mutaciones genéticas asociadas a neoplasias mieloides hereditarias. Se recomienda el estudio en centros de referencia

*Los superíndices indican las principales referencias bibliográficas.

HRM: *high resolution melting*; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

implicados en la metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*), modificación de histonas (*ASXL1*, *EZH2*) y en los mecanismos de corte-empalme de ARN (*SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SF3B1*). Otras alteraciones moleculares incluyen genes involucrados en la regulación de la transcripción (*RUNX1*, *TP53*, *CEBPA*, *ETV6*, *SETBP1*), en la transducción de señal (*KRAS*, *NRAS*, *KIT*, *CBL*, *SH2B3*, *NF1*) o en las cohesinas (*RAD21*, *STAG2*). Estas alteraciones desempeñan un papel en la modificación del fenotipo de la enfermedad, pudiendo contribuir a la progresión de la enfermedad y a la evolución clonal. Son mutaciones cooperantes que no son exclusivas de las NMP y también están presentes en otras neoplasias, hematopoyéticas o no, como se ha visto en las secciones anteriores. Algunas se han asociado a lo que se conoce como hematopoyesis clonal de significado incierto o hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP), detectándose en aproximadamente el 5% de los individuos sanos⁴⁵⁻⁵⁴. Los estudios genéticos y moleculares para el diagnóstico y monitorización de las NMP Ph negativas se presentan en la **tabla 4**.

Se pueden establecer las siguientes recomendaciones:

- Estudio dirigido mediante PCR para detectar mutaciones en los genes *JAK2*, *CALR* y *MPL*- incorporados en los criterios diagnósticos de la clasificación

vigente de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Permite conocer de forma rápida y con un coste aceptable las principales alteraciones diagnósticas de estas entidades.

- Estudio amplio de genes con valor pronóstico mediante NGS: para detectar mutaciones recurrentes en un panel de genes relacionados con las neoplasias mieloides. Permite completar la caracterización molecular en 4-6 semanas y resulta de gran utilidad para refinar la estratificación del riesgo, especialmente en la MFP, así como para el diagnóstico de casos que no presenten mutaciones en *JAK2*, *CALR* y *MPL* (triple negativos).

Síndromes mielodisplásicos/ mieloproliferativos

La clasificación de la OMS de 2016 definió un grupo de enfermedades mixtas mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP) con características solapantes entre ambas entidades, ya que pueden presentar un curso clínico de tipo tanto mielodisplásico (citopenias y displasia de una o varias líneas celulares) como mieloproliferativo (síntomas constitucionales, recuento elevado de alguna de las líneas celulares o infiltración de órganos extramedulares)⁴⁴. Entre ellas se incluyen la

Tabla 4. Estudios para el diagnóstico genético/molecular y monitorización de las neoplasias mieloproliferativas (NMP) Filadelfia (Ph) negativas

Estudios genéticos–moleculares	Técnica	Obligado o recomendado	Tiempo de entrega del resultado	Observaciones*
Diagnóstico				
– Cariotipo en al menos 20 metafases	Análisis citogenético	Recomendado	1 mes	
– Descartar reordenamientos asociados a eosinofilia <i>PCM1/JAK2; PDGFRA/PDGFRB/FGFR1</i>	FISH	Recomendado	1 mes	
– <i>JAK2V617F</i>	PCR/qPCR/HRM	Obligado	7 a 10 días	Clasificación de la OMS, revisión 2016 ⁴⁴
– Descartar <i>BCR-ABL1</i>	PCR	Obligado	7 a 10 días	Clasificación de la OMS, revisión 2016 ⁴⁴
– <i>JAK2</i> exón 12 (si <i>V617F</i> negativo, sospecha policitemia vera)	HRM/Sanger	Obligado	1 mes	Clasificación de la OMS, revisión 2016 ⁴⁴
– Vías RAS, JAK2 y TP53	Secuenciación masiva (NGS)/PCR/qPCR/HRM	Recomendado	5 a 20 días	TP53, vías RAS y JAK2 permiten ajustar el régimen de acondicionamiento en el trasplante alogénico ⁴³
– <i>CALR</i> (si <i>JAK2V617F</i> negativo, sospecha trombocitemia esencial o mielofibrosis primaria)	PCR y electroforesis capilar/HRM	Obligado	1 mes	Clasificación de la OMS, revisión 2016 ⁴⁴
– <i>MPL</i> (si <i>JAK2V617F</i> negativo, sospecha trombocitemia esencial o mielofibrosis primaria)	HRM/Sanger	Obligado	1 mes	Clasificación de la OMS, revisión 2016 ⁴⁴
– <i>KIT</i> (si eosinofilia)				
– <i>CSF3R</i> , <i>SETBP1</i> (si sospecha leucemia neutrofílica crónica/leucemia mieloide crónica atípica)	PCR	Obligado	1 mes	Clasificación de la OMS, revisión 2016 ^{20,44}
– Triple negativo: <i>JAK2</i> (gen completo), <i>MPL</i> (mínimo exones 4 y 10)	Sangre	Obligado	1 mes	En triple negativo, leucemia neutrofílica crónica/leucemia mieloide crónica atípica para buscar clonalidad de la hematopoyesis y apoyar el diagnóstico ⁴⁴ . Se han descrito mutaciones no canónicas en regiones de <i>MPL</i> o <i>JAK2</i> que también se consideran <i>drivers</i> ^{55,56}
– Triple negativo/mielofibrosis/leucemia neutrofílica crónica/leucemia mieloide crónica atípica: <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>CBL</i> , <i>CEBPA</i> , <i>CSF3R</i> , <i>CUX1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ETV6</i> , <i>EZH2</i> , <i>GNAS</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>KRAS</i> , <i>NF1</i> , <i>NRAS</i> , <i>PHF6</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RAD21</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SETBP1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SH2B3</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>TET2</i> , <i>TP53</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>	Secuenciación masiva (NGS)	Obligado	2 meses	En triple negativo, leucemia neutrofílica crónica/leucemia mieloide crónica atípica para buscar clonalidad de la hematopoyesis y apoyar el diagnóstico ⁴⁴ . Se han descrito mutaciones no canónicas en regiones de <i>MPL</i> o <i>JAK2</i> que también se consideran <i>drivers</i> ^{55,56}

(continúa)

Tabla 4. Estudios para el diagnóstico genético/molecular y monitorización de las neoplasias mieloproliferativas (NMP) Filadelfia (Ph) negativas (*continuación*)

Estudios genéticos-moleculares	Técnica	Obligado o recomendado	Tiempo de entrega del resultado	Observaciones*
– Sospecha de evolución a SMD/LMA: panel consensuado en mieloides y mielodisplasia	Secuenciación masiva (NGS)	Obligado	2 meses	En mielofibrosis, para definir el riesgo según el MIPSS70 o MIPSS70-plus versión 2.0, o según el GIPSS: MIPSS70 o MIPSS70-plus versión 2. Incluye como categorías de alto riesgo molecular (HMR) la existencia de mutaciones en los genes <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>IDH1/2</i> ⁶³ y también incluyendo a <i>U2AF1</i> -. Estos <i>scores</i> también incluyen como categorías de muy alto riesgo citogenético alteraciones del cariotipo con la siguiente estratificación de riesgo: favorable: cariotipo normal o alteraciones aisladas del 13q-, +9, 20q-, traslocación/duplicación del cromosoma 1 o alteraciones a nivel de cromosomas sexuales que incluyen -Y; desfavorable: el resto de las alteraciones que no son las incluidas en favorable ⁵⁷ . Hay disponible una página web para calcular el riesgo: http://www.mipss70score.it/ GIPSS incluye como categoría de muy alto riesgo (VHR): cariotipo desfavorable, ausencia de la mutación tipo 1 o similar de <i>CALR</i> , y la presencia de mutaciones en <i>ASXL1</i> , <i>SRSF2</i> o <i>u2af1 Q157</i> ⁵⁷
Monitorización – Carga alélica <i>JAK2</i>	RT-qPCR	Recomendado	1 mes	Pacientes con tratamientos citorreductores con disminución de carga alélica en los que se considere necesario realizar monitorización (interferón) o casos de policitemia vera con sospecha de progresión a MF

*Los superíndices indican las principales referencias bibliográficas.

FISH: hibridación fluorescente *in situ*; GIPSS: *Genetically Inspired Prognostic Scoring System*; HRM: *High Resolution Melting*; LMA: leucemia mieloide aguda; MF: mielofibrosis; MIPSS70: *Mutation-enhanced International Prognostic Score System for transplantation-age patients with primary myelofibrosis*; OMS: Organización Mundial de la Salud; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa; SMD: síndrome mielodisplásico.

LMMC, la leucemia mieloide crónica atípica, la leucemia mielomonocítica juvenil, los SMD/NMP con sideroblastos en anillo y trombocitosis (SMD/NMP-SA-T), y los SMD/NMP inclasificables.

En los SMD/NMP el cariotipo suele ser normal o muestra anomalías comunes con los SMD (aneuploidías +8, +9, -7 y deleciones parciales 7q-, 13q-, 20q-). Mediante NGS se detectan mutaciones en una alta proporción de casos, y suelen ser mutaciones en receptores de factores de crecimiento (CSF3R), en reguladores epigenéticos (TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, EZH2 y DNMT3A) y en vías de señalización (JAK2, NRAS, KRAS, PTPN11, CBL, NF1).

Los genes más comúnmente mutados en la LMMC son *SRSF2*, *TET2* y/o *ASXL1* (> 80% de los casos)³⁸. Las mutaciones en las vías de señalización también son frecuentes en la LMMC y serían las responsables

de las características mieloproliferativas, constituyendo eventos secundarios que pueden llevar a la progresión a LMA. Las mutaciones en *ASXL1* predicen un comportamiento agresivo de la enfermedad y se han incorporado en los índices pronósticos y terapéuticos para la LMMC junto con el cariotipo y otros parámetros clinicopatológicos³⁸. En la LMMC se recomienda valorar al diagnóstico el estudio de mutaciones en *ASXL1*, *NRAS*, *SETBP1* y *RUNX1* por su relevancia sobre el pronóstico y de *IDH1*, *IDH2*, *FLT3* y *JAK2* por la posibilidad de administrar un tratamiento dirigido a estas dianas⁴².

Los SMD/NMP-SA-T presentan activación de la vía JAK-STAT en un 80% de los casos, por lo que en los pacientes con trombocitosis y/o fibrosis hay indicación de estudio de la mutación JAK2 V617V o de mutaciones en MPL.

En el material suplementario se describen las familias de genes comunes en LMA, SMD y NMP Ph negativa.

Discusión y observaciones finales

El objetivo del presente documento es contribuir a la armonización de los estudios genéticos-moleculares entre los diferentes laboratorios en las patologías mieloides. Más allá de las consideraciones específicas descritas para LMA, SMD y NMP Ph negativas, es necesario establecer un sistema de control de calidad comparando muestras para ser analizadas antes y durante el proceso de diagnóstico y monitorización de los pacientes con estas enfermedades. Por otra parte, también es necesario desarrollar un programa de formación impulsado por la SEHH por medio de sus grupos cooperativos como el Grupo de Biología Molecular en Hematología (GBMH) y el Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH), de modo que se mejore el conocimiento sobre por qué y cuándo se deben realizar los estudios NGS en la práctica clínica estándar. Asimismo, se debe establecer una red de laboratorios de referencia para apoyar a aquellos hospitales que no realizan esta técnica molecular *in situ*. Finalmente, algunos temas de interés y necesidades pendientes en cada una de las tres enfermedades, LMA, SMD y NMP Ph negativas, incluyen: a) la definición de los datos mínimos esenciales para el diagnóstico, los tiempos de entrega de los resultados y las implicaciones de la línea germinal; b) el establecimiento de los datos mínimos esenciales para el pronóstico y herramientas para evaluar la enfermedad residual medible, y c) el desarrollo de sistemas para contribuir en las posibles aplicaciones de la medicina de precisión, tratamientos combinados inteligentes y el avance de nuevas terapias dirigidas basadas en perfiles genómicos.

Material suplementario

El material suplementario se encuentra disponible en SANGRE online (10.24875/SANGRE.21000005). Este material es provisto por el autor de correspondencia y publicado online para el beneficio del autor. El contenido del material suplementario es responsabilidad única de los autores.

Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y de

Novartis Farmacéutica, S.A., la coordinación de BCNscience, Barcelona, y la ayuda editorial en la redacción del manuscrito de la Dra. Marta Pulido.

Financiación y conflicto de intereses

Este trabajo ha contado con participación de Novartis Oncology en España. Los autores declaran no tener ningún otro conflicto de interés.

Bibliografía

- Westermann J, Bullinger L. Precision medicine in myeloid malignancies. *Semin Cancer Biol.* 2021 Apr 22:S1044-579X(21)00084-5. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.03.034. Online ahead of print.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129:424-47.
- Falini B, Maciejewski K, Weiss T, Bacher U, Schnittger S, Kern W, et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). *Blood.* 2010;115:3776-86.
- Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood.* 2009;113:3088-91.
- Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Röck J, Paschka P. *RUNX1* mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol.* 2011;29:1364-72.
- University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood.* 2016;128:1800-13.
- Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and somatic defects in *DDX41* in myeloid neoplasms. *Cancer Cell.* 2015;27:658-70.
- Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, et al. Germline *ETV6* mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet.* 2015;47:180-5.
- Harutyunyan AS, Giambruno R, Krendl C, Stukalov A, Klampfl T, Berg T, et al. Germline *RBBP6* mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;127:362-5.
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of *FLT3*: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.* 2001;61:7233-9.
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood.* 2002;99:4326-35.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358:1909-18.
- Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden *FLT3*-ITD mutation and concomitant *NPM1* mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood.* 2013;121:2734-8.
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood.* 2005;106:3740-6.
- Lin LI, Chen CY, Lin DT, Tsay W, Tang JL, Yeh YC, et al. Characterization of *CEBPA* mutations in acute myeloid leukemia: most patients with *CEBPA* mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1372-9.
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. *ASXL1* mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica.* 2015;100:324-30.
- Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the *TP53* gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia.* 2008;22:1539-41.

18. Papaemmanuil E, Döhner H, Campbell PJ. Genomic classification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;375:900-1.
19. Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, Patel Y, Allen C, Green C, et al. *TP53* gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*. 2009;23:203-6.
20. Stone RM, Mandrekas SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med*. 2017;377:454-64.
21. Heuser M, Ofran Y, Boissel N, Brunet Mauri S, Craddock C, Janssen J, et al. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020;31:697-712.
22. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable remissions with ivosidenib in *IDH1*-mutated relapsed or refractory AML. *N Engl J Med*. 2018;378:2386-98.
23. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant *IDH2* relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130:722-31.
24. TIBSOVO® (ivosidenib tablets). Highlights of prescribing information [Internet]. EE.UU.: Food and Drug Administration [consultado: 27 de marzo de 2022]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/211192_s008lbl.pdf
25. IDHIFA® (enasidenib). Highlights of prescribing information [Internet]. EE.UU.: Food and Drug Administration [consultado: 27 de marzo de 2022]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209606s000lbl.pdf
26. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131:1275-91.
27. Welch JS. Mutation position within evolutionary subclonal architecture in AML. *Semin Hematol*. 2014;51:273-81.
28. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of *TP53* mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2015;518:552-5.
29. Tran AN, Taylan F, Zachariadis V, Ivanov Öfverholm I, Lindstrand A, Vezzi F, et al. High-resolution detection of chromosomal rearrangements in leukemias through mate pair whole genome sequencing. *PLoS One*. 2018;13:e0193928.
30. Pollyea DA, Bixby D, Perl A, Bhatt VR, Altman JK, Appelbaum FR, et al. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19:16-27.
31. Voso MT, Ferrara F, Galimberti S, Rambaldi A, Venditti A. Diagnostic workup of acute myeloid leukemia: what is really necessary? An Italian Survey. *Front Oncol*. 2022;12:828072.
32. Haferlach T, Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;188:36-48.
33. Palomo L, Ibáñez M, Abáigar M, Vázquez I, Álvarez S, Cabezón M, et al. Spanish guidelines for the use of targeted deep sequencing in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;188:605-22.
34. Rio-Machin A, Vulliamy T, Hug N, Walne A, Tawana K, Cardoso S, et al. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. *Nat Commun*. 2020;11:1044.
35. 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.
36. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364:2496-506.
37. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28:241-7.
38. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31:2428-36.
39. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gündem G, van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122:3616-27.
40. Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, et al. *TET2* mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014;124:2705-12.
41. Mallo M, del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoz MJ, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol*. 2013;162:74-86.
42. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology v1.2021. Myelodysplastic syndromes [Internet]. National Comprehensive Cancer Network; 2020 [consultado: 10 de octubre 2021]. Disponible en: <http://www.nccn.org/>
43. Lindsley RC, Saber W, Mar BG, Redd R, Wang T, Haagenson MD, et al. Prognostic mutations in myelodysplastic syndrome after stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2017;376:536-47.
44. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-405.
45. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrell R, et al. Classification and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2018;379:1416-30.
46. Marneth AE, Mullally A. The molecular genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10:a034876.
47. Zuo Z, Li S, Xu J, You MJ, Khoury JD, Yin CC. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: laboratory workup in the era of next-generation sequencing. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14:376-85.
48. Skov V. Next generation sequencing in MPNs. Lessons from the past and prospects for use as predictors of prognosis and treatment responses. *Cancers (Basel)*. 2020;12:2194.
49. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016;1:21-30.
50. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Coltro G, Finke CM, Loscocco GG, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Br J Haematol*. 2020;189:291-302.
51. Grupo Español de Enfermedades Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas (GEMFIN). Manual de Recomendaciones en Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas. 3.ª edición [Internet]. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia; 2020 [consultado: 10 de octubre 2021]. Disponible en: <https://www.sehh.es/publicaciones/manuales-publicaciones/124757-manual-de-recomendaciones-en-neoplasias-mieloproliferativas-cronicas-filadelfia-negativas>.
52. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gündem G, Wedge DC, et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med*. 2013;369:2391-405.
53. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27:1861-9.
54. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356:459-68.
55. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127:333-42.
56. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and *JAK2* mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127:325-32.
57. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, Gangat N, Begna KH, et al. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: analysis based on 1002 informative patients. *Leukemia*. 2018;32:1189-99.