

# Medicina de precisión en onco-hematología: implementación de la secuenciación masiva en el diagnóstico integrado de neoplasias hematológicas

Fernandez-Mercado M<sup>1,2,3</sup>, Vazquez I<sup>3</sup>, Larrayoz MJ<sup>3</sup>, y Calasanz MJ<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Biomédica, Escuela de Ingenieros, Universidad de Navarra, San Sebastián

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián

<sup>3</sup> Laboratorio de Genética Hematológica, CIMA LAB Diagnostics, Universidad de Navarra, Pamplona

<sup>4</sup> Co-Directora científica de CIMA LAB Diagnostics, Universidad de Navarra, Pamplona

El diagnóstico de las neoplasias hematológicas ha cambiado sustancialmente en las últimas décadas, pasando de la evaluación morfológica como único criterio, a la integración de los hallazgos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares, que son la base de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los nuevos datos genéticos han transformado nuestra comprensión de la fisiopatología de las neoplasias hematológicas, implicando nuevas vías biológicas y proporcionando una nueva herramienta para deconstruir la complejidad de dichas patologías. En los últimos

años ha habido una explosión de nuevos datos moleculares gracias al uso de las técnicas de secuenciación masiva (*Next-Generation Sequencing*, NGS), tanto de genomas completos (WGS), exomas (WES), como paneles dirigidos al análisis de ciertos genes (Fernandez-Mercado, 2013; Dubois, 2016). La reciente *Special Series del Journal of Clinical Oncology* viene a reforzar esta visión de la importancia de la medicina genómica en oncología hematológica (Ebert, 2017).

Estamos presenciando de nuevo un momento crucial de cambio de paradigma en el diagnóstico onco-



Imagen: Darryl Leja y Ernesto Del Aguila III, *National Human Genome Research Institute*.

hematológico, con la incorporación del concepto de medicina de precisión (también llamada medicina personalizada). Ya vivimos una situación similar (de cambio profundo) hace tres décadas con la incorporación del análisis citogenético a nuestros laboratorios. Actualmente el cariotipo/FISH son esenciales para el diagnóstico, clasificación, estratificación pronóstica y orientación terapéutica en las hemopatías malignas. En este momento, el nuevo reto que tenemos por delante es la incorporación de la secuenciación masiva al diagnóstico integrado de las neoplasias hematológicas.

Es cierto que llevamos años realizando rutinariamente, además de técnicas citogenéticas convencionales (cariotipo y FISH), algunas pruebas moleculares que son necesarias tanto para el diagnóstico, como para la estratificación pronóstica en linfomas, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y otras neoplasias linfoides (Campo, 2011; Swerdlow, 2016; Rosenquist, 2016). Esto mismo sucede en patología mieloides, con el análisis de CEBPA, NPM1 y FLT3 en la leucemia mieloide aguda (LMA); aunque esta lista de pruebas moleculares podría alargarse en breve, ya que datos recientes apuntan a que hay mutaciones en otros genes que también podrían tener valor clínico en LMA (Papaemmanuil, 2016). En el caso de los síndromes mielodisplásicos (SMD), también se ha sugerido que el IPSS-R (*Revised International Prognostic Scoring System*, Greenberg, 2012) se podría mejorar mediante la incorporación de datos moleculares (Nazha, 2016). Como decimos, estos marcadores moleculares ya se están analizando con fines diagnósticos mediante técnicas de biología molecular clásica (secuenciación Sanger, ARMS-PCR, ASO-PCR o RT-qPCR), integrados con los datos de citomorfología, citometría y citogenética.

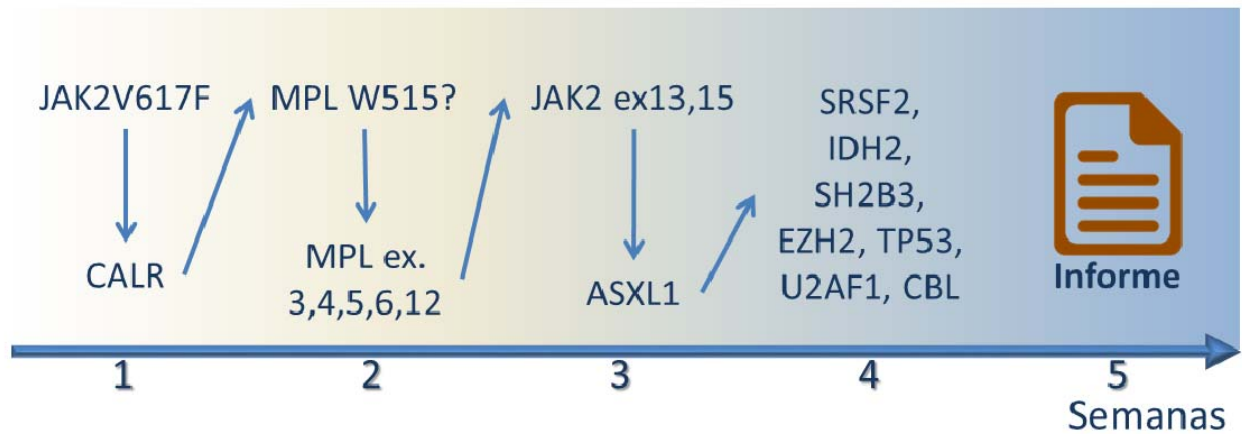
Sin embargo, la elevada cantidad de nuevos datos moleculares disponibles, junto con la accesibilidad de la NGS, ha abierto una nueva puerta a poder implementar los nuevos marcadores a los protocolos de los laboratorios diagnósticos de patología molecular, de modo que el diagnóstico *genético* que realizamos actualmente puede llegar a ser *genómico*. De hecho, diversas casas comerciales que incluyen secuenciación masiva en su cartera de productos están expandiendo su oferta de paneles NGS diseñados para ana-

## *La elevada cantidad de nuevos datos moleculares disponibles, junto con la accesibilidad de la NGS, ha abierto una nueva puerta a poder implementar los nuevos marcadores a los protocolos de los laboratorios diagnósticos de patología molecular*

lizar patologías específicas. Estos paneles dirigidos son capaces de analizar simultáneamente regiones de 20-60 genes, o incluso genes completos, seleccionados en base a la relevancia en la patología a estudiar. En términos económicos, la gran cantidad de información genómica que produce la tecnología de secuenciación masiva mediante paneles resultaría más cara y más laboriosa de obtener mediante secuenciación por el método de Sanger. Además, el análisis simultáneo de tan elevado número de genes permite reducir drásticamente (incluso a la mitad) los tiempos de respuesta, frente a los esquemas de análisis secuencial de genes que con frecuencia se aplican en los laboratorios moleculares (Figura 1). A las indudables ventajas en términos de tiempo y costes, se suma que esta tecnología posibilita la detección de clones emergentes que pueden ayudar en el seguimiento y pronóstico de la enfermedad, y detectar así un posible cambio de curso en su historia, quizá asociado a resistencia a tratamiento o a otros factores. Por último, disponer de una información molecular tan detallada permitirá la rápida identificación de pacientes que puedan beneficiarse de ensayos clínicos que contemplen dichas aberraciones moleculares en sus criterios de inclusión.

Sin embargo, hay algunos problemas que plantea la incorporación de la secuenciación masiva al diagnóstico, y que están retrasando la estandarización de su utilización. Por un lado, la complejidad de los datos

**A**



**B**



Figura 1. Flujos de trabajo hasta la emisión del informe de patología molecular al analizar una muestra sospechosa de mielofibrosis idiopática. (A) Esquema de análisis genético secuencial mediante técnicas de biología molecular clásica (ARMS-PCR y secuenciación Sanger). Cada prueba negativa precisa de un nuevo test molecular. El proceso completo puede llegar a requerir 5 semanas hasta emisión del informe. (B) Esquema de análisis genómico mediante NGS. Todos los genes relevantes asociados a la patología se secuencian a la vez. Tras el procesamiento informático de los datos de secuenciación, se emite el informe. El proceso completo puede llegar a requerir 15-20 días.

que generan los secuenciadores requiere de personal altamente cualificado en biología computacional, lo que por el momento sólo es posible en laboratorios diagnósticos que tengan un fuerte compromiso con la investigación. Por otro lado, la escasez de guías en el ámbito internacional para el diagnóstico onco-hematológico provoca que los laboratorios que han empezado a emplear esta técnica tengan que hacer un esfuerzo grande de visión de conjunto de los resultados que van generando, para detectar errores recurrentes en la secuenciación, discernir las posibles implicaciones de hallazgos incidentales, desarrollar líneas de análisis de datos adaptadas a cada panel, y elaborar informes que sean de verdadera utilidad clínica. Finalmente, desde el punto de vista técnico, tenemos experiencia de que no todos los genes se analizan con igual precisión por esta técnica. Por ejemplo, con frecuencia las inserciones y deleciones largas escapan a los análisis informáticos estándar

que se aplican sobre los datos de secuenciación; de modo similar, las regiones genómicas que están codificadas en sitios ricos en GC son difíciles de capturar en los pasos iniciales de preparación de la muestra antes de la secuenciación. Por estos motivos, preveemos un futuro próximo en el que probablemente la

*Preveemos un futuro próximo en el que probablemente la NGS no vaya a suplir a las técnicas moleculares ya instaladas en los laboratorios, sino que vaya a convivir con ellas, al menos durante unos años.*

*Estamos presenciando un momento histórico, un nuevo punto de inflexión en el diagnóstico hematológico. La NGS ya no es sólo una tecnología de los grandes grupos de investigación, sino que se está implementando en el diagnóstico de rutina.*

NGS no vaya a suplir a las técnicas moleculares ya instaladas en los laboratorios, sino que vaya a convivir con ellas, al menos durante unos años.

Además, las plataformas de secuenciación masiva generan tal cantidad de datos, que junto a las variantes de las que se conoce su relación con la enfermedad, se identifican otras de significado dudoso. Los laboratorios que incorporen la NGS al diagnóstico integrado de las neoplasias hematológicas se beneficiarán del trabajo coordinado con otros laboratorios que empleen las mismas técnicas, ya que juntos será más sencillo construir la masa crítica de datos de secuenciación masiva que permita interpretar el significado de las variantes genéticas de significado incierto (variants of uncertain significance, VUS). Por el momento, el recurso es acudir a bases de datos de variantes con datos de frecuencia poblacional para inferir si las VUS detectadas pueden guardar relación con la patología o no.

Por otro lado, es posible que esta tecnología no se extienda indiscriminadamente a todos los laboratorios de diagnóstico que en la actualidad realizan pruebas moleculares, sino que se restrinja a unos pocos laboratorios de referencia repartidos por el territorio nacional. Esto se podría deber, no sólo a la elevada inversión inicial en equipamiento y en la necesidad de disponer de personal altamente cualificado, sino también a que para poder garantizar buenos

tiempos de respuesta y precios asequibles ha de haber un flujo de muestras suficiente.

Estamos presenciando un momento histórico, un nuevo punto de inflexión en el diagnóstico hematológico. La NGS ya no es sólo una tecnología de los grandes grupos de investigación, sino que se está implementando en el diagnóstico de rutina. Somos conscientes de que esto requerirá de intensa colaboración entre los especialistas en nuestro país en cuestiones como la estandarización de las técnicas (avalada por la SEHH), la formación de los profesionales o la acreditación de los procedimientos. Clínicos, anatomopatólogos, bioinformáticos y genetistas tenemos que trabajar más coordinados que nunca para que esta nueva tecnología de enorme potencial llegue a implementarse como nueva técnica diagnóstica, y sea de verdadero beneficio clínico.

### Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento a todo el equipo de CIMA LAB Diagnostics. MFM agradece también financiación de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), la Diputación Foral de Guipuzcoa (DFG15/011) y el Instituto de Salud Carlos III (PI16/00159).

### Referencias

- Campo E et al. *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. Blood. 2011 May 12;117(19):5019-32. doi: 10.1182/blood-2011-01-293050
- Dubois S et al. *Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study*. Clin Cancer Res. 2016 Jun 15;22(12):2919-28. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2305
- Ebert B and Friedberg JW. *Introduction to Genomics in Hematologic Malignancy*. Journal of Clinical Oncology. 2017 [in press] doi: 10.1200/JCO.2017.72.2827
- Fernandez-Mercado M et al. *Targeted re-sequencing analysis of 25 genes commonly mutated in myeloid disorders in del(5q) myelodysplastic syndromes*. Haematologica. 2013 Dec;98(12):1856-64. doi: 10.3324/

haematol.2013.086686

Artículo publicado 15-03-2017

Greenberg PL et al. *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. Blood. 2012 Sep 20;120(12):2454-65 doi: 10.1182/blood-2012-03-420489

Nazha A et al. *Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia. 2016 Nov;30(11):2214-2220. doi: 10.1038/leu.2016.138

Papaemmanuil E et al. *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med. 2016 Jun 9;374(23):2209-2. doi: 10.1056/NEJMoa1516192

Rosenquist R et al. *Clinical impact of recurrently mutated genes on lymphoma diagnostics: state-of-the-art and beyond*. Haematologica. 2016 Sep;101(9):1002-9. doi: 10.3324/haematol.2015.134510

Swerdlow SH et al. *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Blood. 2016 May 19;127(20):2375-90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569