

# Secuenciación masiva en el diagnóstico de las leucemias agudas

## Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

**INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN**



Red Española de Agencias de Evaluación  
de Tecnologías y Prestaciones del Sistema Nacional de Salud



**EUSKO JAURLARITZA**  
**GOBIERNO VASCO**

OSASUN SAILA  
DEPARTAMENTO DE SALUD



# Secuenciación masiva en el diagnóstico de las leucemias agudas

## Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

**INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN**



Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia

Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco

Vitoria-Gasteiz, 2023

Un registro bibliográfico de esta obra puede consultarse en el catálogo de la Red Bibliotekak del Gobierno Vasco:

<http://www.bibliotekak.euskadi.net/webOpac>

Edición: noviembre 2023

Internet: [www.euskadi.eus/publicaciones](http://www.euskadi.eus/publicaciones)

Edita: Ministerio de Sanidad  
Jauriaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia  
Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco  
c/ Donostia-San Sebastián, 1 - 01010 Vitoria-Gasteiz

Fotocomposición: Composiciones RALI, S.A.  
Costa, 12-14 – 48010 Bilbao

NIPO: 133-23-029-1 (Ministerio de Sanidad)

Secuenciación masiva en el diagnóstico de las leucemias agudas. Ibarгойen-Roteta N, Gutiérrez-Ibarluzea I, García Ruiz JC, Lawry C, Urruticoechea Ribate A, Galnares-Cordero L, Bayón Yusta JC. Vitoria – Gasteiz. Ministerio de Sanidad / Jaurkitzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia, Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco; 2023.

1 archivo pdf; (Informes, Estudios e Investigación)

NIPO: 133-23-029-1 (Ministerio de Sanidad)

Este documento ha sido realizado por OSTEBA en el marco de la financiación del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social para el desarrollo de actividades del *Plan anual de trabajo de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías y Prestaciones del SNS*, aprobado en el Pleno del Consejo Interterritorial del SNS de 4 de marzo de 2019 (conforme al Acuerdo del Consejo de Ministros de 13 de diciembre de 2019).

Para citar este informe:

**Ibarгойen-Roteta N, Gutiérrez-Ibarluzea I, García Ruiz JC, Lawry C, Urruticoechea Ribate A, Galnares-Cordero L, Bayón Yusta JC.** Secuenciación masiva en el diagnóstico de las leucemias agudas. Ministerio de Sanidad. Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco; 2023. **Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: OSTEBA.**



## Índice de autores

**Dra. Nora Ibarгойen Roteta.** Investigadora del Servicio Vasco de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (Osteba). Gestión del Conocimiento y Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (BIOEF). Barakaldo.

**Dr. Iñaki Gutiérrez Ibarluzea.** Coordinador de la Unidad de Gestión del Conocimiento y Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (BIOEF). Barakaldo.

**Dr. Juan Carlos García Ruíz.** Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Cruces, del Servicio Vasco de Salud (Osakidetza) y profesor asociado del Departamento de Medicina de la UPV/EHU. Coordinador del Grupo de Cáncer Hematológico del IIS Biocruces Bizkaia. Barakaldo.

**Dr. Charles Lawry.** Coordinador del Área de Oncología y responsable del Grupo de Investigación de Oncología Molecular del IIS Biodonostia. *Ikerbasque Research Professor.* Donostia- San Sebastián.

**Dr. Ander Urruticoechea Ribate.** Especialista en Oncología Médica. Director Científico de Onkologikoa (Instituto Oncológico de San Sebastián). Donostia- San Sebastián.

**Lorea Galnares Cordero.** Especialista en documentación sanitaria. Servicio Vasco de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (Osteba). Gestión del Conocimiento y Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (BIOEF). Barakaldo.

**Juan Carlos Bayón Yusta.** Economista e investigador del Servicio Vasco de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (Osteba). Gestión del Conocimiento y Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (BIOEF). Barakaldo.

## Colaboraciones expertas

**Ainhoa Fernandez.** Coordinadora de la Asociación de Madres y Padres de Niñas, Niños y Adolescentes con Cáncer de Bizkaia (ASPANOVAS).

**Begoña Barragán.** Presidenta de la Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia (AEAL).

## Revisión del Informe

**Dra. Itziar Astigarraga.** Jefa del Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Cruces. Dedicación a Hematología y Oncología Pediátricas. Profesora Asociada de Pediatría (UPV/EHU). Investigadora del cáncer infantil en IIS Biocruces Bizkaia.

**Dra. Ana Batlle López.** Médica especialista en Hematología, y coordinadora de la Unidad de Genética Oncohematológica. Hospital Marqués de Valdecilla. Santander.

## Agradecimientos

A Asun Gutiérrez, por haber trabajado y ayudado durante años en el desarrollo y edición de estos informes.

## Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés en relación con este informe de evaluación.

## Desarrollo del proyecto

**Desarrollo científico y coordinación técnica:** Nora Ibarгойen Roteta

**Documentación:** Lorea Galnares Cordero

**Coordinación y Gestión administrativa:** Nora Ibarгойen Roteta

**Edición y difusión:** Anaitz Leunda Iñurritegui y Lorea Galnares Cordero.

## Autor/a para correspondencia

Nora Ibarгойen Roteta

e-mail: [nibargoyen@bioef.eus](mailto:nibargoyen@bioef.eus)

El Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco (OSTEBA/BIOEF) asume la responsabilidad exclusiva de la forma y el contenido final de este informe. Las manifestaciones y conclusiones de este informe son las del Servicio de Evaluación y no necesariamente la de sus revisores externos.



# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abreviaturas</b>   | <b>15</b> |
| <b>Resumen Estructurado</b>   | <b>19</b> |
| <b>Laburpen egituratua</b>  | <b>21</b> |
| <b>Structured Summary</b>   | <b>24</b> |
| <b>I. Introducción</b>  | <b>26</b> |
| I.1. Qué es la leucemia aguda   | 26        |
| I.1.1. Leucemia aguda en la edad pediátrica   | 28        |
| I.1.2. Leucemia aguda en la edad adulta   | 28        |
| I.1.3. Clasificación de las leucemias agudas  | 30        |
| I.2. Estrategias moleculares en el diagnóstico de la leucemia aguda                           | 32        |
| I.2.1. Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación por método Sanger | 32        |
| I.2.2. Citogenética convencional y molecular  | 33        |
| I.3. Secuenciación masiva de nueva generación   | 35        |
| I.3.1. Tipos de secuenciación   | 36        |
| I.3.1.1. Secuenciación de ADN   | 36        |
| I.3.1.2. Secuenciación del ARN  | 38        |
| I.3.2. Etapas de la NGS   | 39        |
| I.3.1.1. Preparación de bibliotecas ( <i>library preparation</i> )                            | 39        |
| I.3.4. Marcado CE-IVD para el uso de la NGS en diagnóstico clínico                            | 45        |
| I.3.5. Secuenciación masiva de tercera generación   | 46        |
| I.4. Justificación de la elaboración del informe  | 46        |
| <b>II. Objetivos</b>  | <b>48</b> |
| II.1. Objetivo general  | 48        |
| II.2. Objetivos específicos   | 48        |
| <b>III. Metodología</b>   | <b>49</b> |
| III.1. Definición de las preguntas de investigación en formato PICO                           | 49        |
| III.2. Definición del marco de evaluación   | 50        |
| III.2.1. Validez analítica, validez clínica, utilidad clínica y utilidad personal             | 50        |
| III.2.2. Modelos de prestación  | 51        |
| III.2.2.1. Aspectos organizacionales  | 51        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| III.2.1.2. | Evaluación económica   | 52        |
| III.2.1.3. | Implicaciones éticas, legales y sociales   | 52        |
| III.2.1.4. | Perspectiva del paciente   | 52        |
| III.3.     | Revisión sistemática de la evidencia científica  | 52        |
| III.3.1.   | Definición de las medidas de resultado a evaluar   | 52        |
| III.3.2.   | Formulario de recogida y extracción de datos de los estudios                                     | 53        |
| III.3.2.1. | Estudios sobre validez y utilidad de la NGS en leucemias agudas                                  | 53        |
| III.3.2.2. | Estudios sobre barreras, valores y preferencias sobre NGS en leucemias agudas                    | 54        |
| III.3.2.3. | Estudios sobre eficiencia de la NGS en leucemias agudas  | 54        |
| III.3.3.   | Estrategia de búsqueda   | 55        |
| III.3.4.   | Criterios de inclusión y exclusión de estudios   | 56        |
| III.3.4.1. | Validez y utilidad de la NGS en el diagnóstico de leucemias agudas                               | 56        |
| III.3.4.2. | Eficiencia de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas                                   | 57        |
| III.3.4.3. | Barreras, valores y preferencias con relación a la NGS en leucemias agudas                       | 57        |
| III.3.5.   | Evaluación de la calidad de los estudios identificados y de la evidencia                         | 58        |
| III.3.5.1. | Validez analítica, clínica y utilidad clínica (Marco EGAPP)                                      | 58        |
| III.3.5.2. | Eficiencia de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas                                   | 61        |
| III.3.5.3. | Barreras, valores y preferencias sobre la NGS y su implementación                                | 61        |
| III.4.     | Proceso de revisión interna y externa  | 61        |
| <b>IV.</b> | <b>Resultados</b>  | <b>62</b> |
| IV.1.      | Resultados de las búsquedas realizadas   | 62        |
| IV.1.1.    | Validez y utilidad de la NGS   | 62        |
| IV.1.2.    | Estudios de costes relacionados con la NGS en leucemias agudas                                   | 64        |
| IV.1.3.    | Barreras, valores y preferencias con relación a la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas | 65        |
| IV.2.      | Análisis de la evidencia disponible  | 65        |
| IV.2.1.    | Estudios sobre validez y utilidad de la NGS  | 65        |
| IV.2.1.1.  | Estudios que combinan al NGS de ADN y ARN  | 65        |

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| IV.2.1.2.    | Estudios que realizan NGS de sólo ADN  | 70         |
| IV.2.1.3.    | Estudios que realizan NGS de sólo ARN  | 80         |
| IV.2.1.4.    | Validez externa de la NGS y comparación de diferentes paneles de genes en el diagnóstico de las leucemias agudas | 88         |
| IV.2.1.5.    | Resumen de los paneles incluidos en los estudios y sus características   | 96         |
| IV.2.2.      | Estudios sobre eficiencia de la NGS  | 96         |
| IV.2.3.      | Estudios sobre barreras, valores y preferencias  | 100        |
| <b>V.</b>    | <b>Discusión</b>   | <b>105</b> |
| V.1.         | Papel de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas  | 105        |
| V.2.         | Sobre la validez y utilidad de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas                                  | 106        |
| V.2.1.       | Tipo de NGS y de alteraciones a identificar  | 108        |
| V.2.2.       | Número de genes cubiertos por la NGS   | 110        |
| V.3.         | Implementación de la NGS en el diagnóstico de las agudas   | 111        |
| V.3.1.       | Aspectos organizativos   | 111        |
| V.3.2.       | Eficiencia   | 114        |
| V.3.3.       | Aspectos éticos y legales, valores y preferencias  | 115        |
| <b>VI.</b>   | <b>Conclusiones</b>  | <b>116</b> |
| <b>VII.</b>  | <b>Bibliografía</b>  | <b>118</b> |
| <b>VIII.</b> | <b>Anexos</b>  | <b>131</b> |
| Anexo I.     | Estrategias de búsqueda  | 131        |
| Anexo II.    | Diagramas de flujo de todas las búsquedas realizadas   | 142        |
| Anexo III.   | Estudios excluidos   | 145        |
| Anexo IV.    | Tablas de estudios individuales incluidos  | 152        |
| Anexo V.     | Evaluación de la calidad de los estudios siguiendo los criterios de la EGAPP                                     | 175        |
| Anexo VI.    | Tabla resumen de los paneles comerciales utilizados en los estudios incluidos                                    | 180        |



# Abreviaturas

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>ADN:</b>      | ácido desoxibirronucleico  |
| <b>APL:</b>      | leucemia promielocítica aguda ( <i>acute promyelocytic leukaemia</i> )   |
| <b>ARMS-PCR:</b> | sistema de mutación refractario a la amplificación por PCR ( <i>amplification refractory mutation system-PCR</i> )           |
| <b>ARN:</b>      | ácido ribonucleico   |
| <b>BCP-ALL:</b>  | leucemia linfoblástica aguda de célula B precursora ( <i>B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia</i> )                 |
| <b>CCA:</b>      | análisis citogenético convencional ( <i>conventional cytogenetic analysis</i> )  |
| <b>CE-IVD:</b>   | marcado de conformidad europea para el diagnóstico in vitro ( <i>Conformité Européenne for In Vitro Diagnostic</i> )         |
| <b>CEA:</b>      | <i>Cost-Effectiveness Analysis registry</i>  |
| <b>CEBNX:</b>    | flujo de trabajo basado en amplicones Nextera XT específico de CEBPA ( <i>CEBPA-specific Nextera XT amplicon workflow</i> )  |
| <b>CEBPA:</b>    | gen alfa de unión al potenciador CCAAT ( <i>CCAAT enhancer-binding protein alpha gen</i> )                                   |
| <b>CES:</b>      | secuenciación del exoma clínico ( <i>clinical exome sequencing</i> )   |
| <b>CGAT:</b>     | prueba de array genómico de cromosomas ( <i>chromosome genomic array testing</i> )   |
| <b>CGH:</b>      | hibridación genómica comparada ( <i>comparative genomic hybridization</i> )  |
| <b>CHIP:</b>     | hematopoyesis clonal de potencial indeterminado ( <i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i> )                   |
| <b>ChIP Seq:</b> | inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación ( <i>chromatin immunoprecipitation followed by sequencing</i> ) |
| <b>CMHs:</b>     | células madre hematopoyéticas  |
| <b>CMML:</b>     | leucemia mielógena crónica ( <i>chronic myelomonocytic leukemia</i> )  |

|                |  |
|----------------|--|
| <b>CN-LOH:</b> | pérdida de heterocigosidad copia neutro ( <i>copy neutral loss of heterozygosity</i> )   |
| <b>CNA:</b>    | alteraciones del número de copia ( <i>copy number alterations</i> )  |
| <b>CNV:</b>    | variantes del número de copia ( <i>copy number variation</i> )   |
| <b>ddPCR:</b>  | doplet digital PCR ( <i>digital dople PCR</i> )  |
| <b>E:</b>      | especificidad  |
| <b>EE:</b>     | evaluación económica   |
| <b>EGAPP:</b>  | grupo de trabajo de Evaluación de Aplicaciones Genómicas en la Práctica y Prevención ( <i>Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention Initiative</i> ) |
| <b>ELN:</b>    | <i>European LeukemiaNet</i>  |
| <b>ETS:</b>    | evaluación de tecnologías sanitarias   |
| <b>FDA:</b>    | <i>United States Food and Drug Administration</i>  |
| <b>FISH:</b>   | hibridación fluorescente in situ ( <i>fluorescent in situ hybridization</i> )  |
| <b>FLC:</b>    | Fichas de Lectura Crítica  |
| <b>FN:</b>     | falso negativo   |
| <b>FP:</b>     | falso positivo   |
| <b>GC:</b>     | guanina y citosina   |
| <b>LC-WGS:</b> | secuenciación de baja cobertura del genoma completo ( <i>low coverage-whole genome sequencing</i> )  |
| <b>LLA:</b>    | leucemia linfoblástica aguda ( <i>acute lymphoblastic leukemia</i> )   |
| <b>LLA-B:</b>  | leucemia linfoblástica aguda de células B  |
| <b>LMA:</b>    | leucemia mieloide aguda ( <i>acute myeloid leukemia</i> )  |
| <b>MDS:</b>    | síndrome mielodisplásico ( <i>myelodysplastic syndrome</i> )   |
| <b>MLPA:</b>   | amplificación de sondas tras ligación múltiple ( <i>multiplex ligation dependent probe amplification</i> )   |
| <b>MNV:</b>    | variante multinucleotídica ( <i>multinucleotide variant</i> )  |
| <b>MPN:</b>    | neoplasias mieloproliferativas ( <i>myeloproliferative neoplasms</i> )   |
| <b>MRD:</b>    | enfermedad residual mínima ( <i>minimal residual disease</i> )   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>MYS:</b>     | <i>SOPHia Genetics Myeloid Solutions</i>   |
| <b>NASEM:</b>   | <i>National Academies of Sciences Engineering and Medicine</i>                           |
| <b>NCCN®:</b>   | <i>National Comprehensive Cancer Network®</i>  |
| <b>NGK:</b>     | cariotipado de nueva/próxima generación ( <i>next generation karyotyping</i> )           |
| <b>NGS:</b>     | secuenciación de nueva/próxima generación ( <i>next generation sequencing</i> )          |
| <b>NHS EED:</b> | <i>National Health Service Economic Evaluation Database</i>                              |
| <b>OMR:</b>     | <i>Oncomine Myeloid Research Assay</i>   |
| <b>OMS:</b>     | Organización Mundial de la Salud   |
| <b>OOCRA</b>    | Oncomine™ Childhood Cancer Research Assay  |
| <b>PCR:</b>     | reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )                 |
| <b>PETHEMA:</b> | Programa Español de Tratamiento en Hematología   |
| <b>Ph+:</b>     | Philadelphia <i>chromosome</i> -positive   |
| <b>PMP:</b>     | <i>Pan-Myeloid Panel</i>   |
| <b>qPCR:</b>    | PCR cuantitativa ( <i>quantitative PCR</i> )   |
| <b>RCEI:</b>    | ratio coste-eficacia incremental   |
| <b>RQ-PCR:</b>  | PCR cuantitativa en tiempo real ( <i>real-time quantitative PCR</i> )                    |
| <b>RT-PCR:</b>  | PCR de transcripción inversa ( <i>reverse transcription PCR</i> )                        |
| <b>RT-qPCR:</b> | qPCR con transcripción inversa ( <i>reverse transcription qPCR</i> )                     |
| <b>S:</b>       | sensibilidad   |
| <b>SEHOP:</b>   | Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas                                 |
| <b>SNP:</b>     | polimorfismo de nucleótido único ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )               |
| <b>SNV:</b>     | variante de nucleótido único ( <i>single-nucleotide variant</i> )                        |
| <b>sWGS:</b>    | secuenciación superficial del genoma completo ( <i>shallow whole genome sequencing</i> ) |
| <b>TKI:</b>     | inhibidor de la tirosina quinasa ( <i>tyrosine kinase inhibitor</i> )                    |
| <b>TLA:</b>     | amplificación de locus dirigida ( <i>targeted locus amplification</i> )                  |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>TSMP:</b> | <i>TruSight™ Myeloid Panel</i>   |
| <b>VAF:</b>  | frecuencia del alelo variante ( <i>variant allele frequency</i> )                  |
| <b>VCF:</b>  | formato de llamado de variantes ( <i>variant call format</i> )                     |
| <b>VPN:</b>  | valor predictivo negativo  |
| <b>VPP:</b>  | valor predictivo positivo  |
| <b>WES:</b>  | secuenciación del exoma completo ( <i>whole exome sequencing</i> )                 |
| <b>WGS:</b>  | secuenciación del genoma completo ( <i>whole genome sequencing</i> )               |
| <b>WTS:</b>  | secuenciación del transcriptoma completo ( <i>whole transcriptome sequencing</i> ) |

# Resumen Estructurado

**Título:** Secuenciación Masiva en el diagnóstico de las leucemias agudas

**Autores:** Ibarгойen-Roteta N, Gutiérrez-Ibarluzea I, Garcia Ruiz JC, Lawry C, Urruticoechea Ribate A, Galnares-Cordero L, Bayón Yusta JC.

**Palabras clave:** secuenciación masiva, leucemia aguda, diagnóstico

**Fecha:** 14/07/2023

**Páginas:** 182

**Referencias:** 116

**Lenguaje:** castellano y resumen en castellano, euskera e inglés

## Introducción

La leucemia aguda es un cáncer de evolución rápida que se origina en la médula ósea, el tejido que genera la sangre. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) supone el 80 % de todas las leucemias agudas en la edad pediátrica, y en los adultos, la leucemia mieloide aguda (LMA) es uno de los tipos de leucemia más común. Muchas de las alteraciones genéticas que portan estos pacientes son críticas para establecer el diagnóstico clínico, el pronóstico y el tratamiento a utilizar, y suelen ser detectadas por cariotipo convencional, hibridación fluorescente in situ (FISH en inglés) y secuenciación Sanger dirigida. Sin embargo, en los últimos años, la secuenciación de nueva generación (NGS en inglés) ha revolucionado el diagnóstico genético. Por ello, se considera necesario evaluar la mejor evidencia publicada que valore el rendimiento diagnóstico de la NGS en pacientes con leucemia aguda.

## Objetivos

El objetivo principal es evaluar la evidencia sobre la utilidad de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas y, específicamente, su validez, utilidad clínica, eficiencia y los aspectos relacionados con su implementación.

## Metodología

Se ha realizado una búsqueda de estudios sobre la validez y utilidad de la NGS en Medline (Pubmed), Embase, y la *Cochrane Library* entre 2015 y octubre de 2021. Se realizó también una búsqueda de estudios sobre barreras y facilitadores, así como de valores de profesionales y pacientes, y una última búsqueda de estudios económicos. La evidencia fue valorada siguiendo el

marco propuesto por Pitini *et al.* Tanto la selección, lectura y evaluación de la evidencia fue realizada por pares.

**Análisis económico:**  SÍ  NO

**Opinión de Expertos:**  SÍ  NO

## Resultados

Entre las 1.453 referencias potencialmente relevantes sobre validez y utilidad de la NGS, se incluyeron finalmente 36. En estos estudios se evaluaba el uso de NGS del ADN, el ARN o de ambas. Los estudios utilizaban diferentes paneles comerciales o paneles customizados, que podían abarcar diferentes genes o diferentes tipos de alteraciones. Algunos estudios incluían pacientes con cualquier tipo de leucemia aguda, y otros pacientes con LMA o LLA. Aunque hubo mucha heterogeneidad, la NGS obtenía buenos resultados, que variaban según el gen o tipo de alteración estudiada.

En cuanto a los estudios de costes, no se encontraron referencias relevantes entre las 182 identificadas. Con relación a las barreras, valores y preferencias, ninguna de las 923 referencias trataba sobre el uso de la NGS en el diagnóstico de la leucemia aguda, aunque sí se identificó una revisión narrativa sobre los retos de introducir la NGS en el diagnóstico de neoplasias mieloides. En una búsqueda manual adicional, se identificaron cuatro referencias sobre las barreras de implementación del diagnóstico molecular en general, así como opiniones y valores de pacientes con cáncer y de los profesionales implicados relacionados con el uso de la NGS.

## Discusión y conclusiones

Son pocos los estudios que evalúan la utilidad clínica de la NGS en las leucemias agudas. Además, existe gran heterogeneidad en las estrategias y paneles de NGS utilizados en los estudios, lo que dificulta la valoración de la evidencia en referencia a la validez analítica y clínica. Sin embargo, establecer de forma consensuada los criterios de calidad e interpretación de los resultados, así como la realización de estudios de concordancia y validación interlaboratorios pueden ayudar a aumentar la validez y utilidad clínica de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas. Para implementar la NGS, se deben definir los genes necesarios a secuenciar, el tipo de alteraciones a detectar y si hay alteraciones para las que sería recomendable continuar utilizando métodos convencionales. A pesar de la heterogeneidad identificada, la NGS puede ayudar a obtener datos relevantes en pacientes en los que no se pueden realizar cariotipos convencionales y aportar datos para mejorar la estratificación y elección del tratamiento. Sin embargo, profesionales y pacientes deberían conocer las implicaciones que los resultados de la NGS pueden tener para no crear falsas expectativas y la posibilidad de encontrar resultados no relacionados con la leucemia que pueden escoger no conocer.

# Laburpen egituratua

**Izenburua:** Sekuentziazio masiboa leuzemia akutuen diagnostikoan

**Egileak:** Ibarгойen-Roteta N, Gutiérrez-Ibarluzea I, Garcia Ruiz JC, Lawry C, Urruticoechea Ribate A, Galnares-Cordero L, Bayón Yusta JC.

**Gako-hitzak:** sekuentziazio masibo, leuzemia akutua, diagnostiko

**Data:** 2023/07/14

**Orrialde kopurua:** 182

**Erreferentziak:** 116

**Hizkuntza:** gaztelania eta laburpena gaztelaniaz, euskaraz eta ingelesez

## Sarrera

Leuzemia akutua eboluzio bizkorreko minbizi bat da, hezur-muinean sortzen dena; hau da, odola sortzen duen ehunean. Adin pediatrikoan, leuzemia linfoblastiko akutua (LLA) leuzemia akutua guztien % 80 da; helduetan, berriz, leuzemia mieloidea (LMA) da leuzemia motarik arruntenetako bat. Paziente horiek dauzkaten alterazio genetiko asko oso garrantzitsuak dira ezartzeko zein diren diagnostiko kliniko eta pronostikoa, eta zer tratamendu erabili; bestalde, antzemateko, kariotipo konbentzionala, in situ hibridazio fluoreszentea (ingelesez, FISH) eta Sanger sekuentziazio zuzendua erabiltzen dira. Hala ere, azken urteotan, generazio berriko sekuentziazioak (ingelesez, NGS) diagnostiko genetikoak irauli du. Horregatik, beharrezkotzat jotzen da ebaluatzea zein den argitaratutako ebidentziarik onena, NGSren errendimendu diagnostikoa baloratzen duena leuzemia akutua duten pazienteetan.

## Helburuak

Helburu nagusia da ebaluatzea zein den NGSk leuzemia akutuen diagnostikoan duen baliagarritasunari buruzko ebidentzia, eta, bereziki, zer baliokotasun eta erabilgarritasun kliniko duen, eta zer alderdi dauden lotuta haren inplementazioarekin.

## Metodologia

Medline (Pubmed), Embase eta *Cochrane Library*-n, NGSren baliokotasunari eta erabilgarritasunari buruzko azterlanak bilatu dira, 2015 eta 2021eko urriaren artekoak. Horrez gain, barrerei eta erraztaileei buruzko azterlanak bilatu ziren, bai eta profesionalen eta pazienteen balioak ere, eta azken bilaketa egin zen azterketa ekonomikoei buruz. Ebidentzia baloratze-

ko, Pitini *et al.*-ek proposatutako esparruari jarraitu zitzaion. Ebidentzia binaka hautatu, irakurri eta ebaluatu zen.

**Analisi ekonomikoa:** **BAI** EZ

**Adituen iritzia:** **BAI** EZ

### **Emaitzak**

NGSren baliozkotasunari eta erabilgarritasunari buruz garrantzitsuak izan daitezkeen 1.453 erreferentzien artean, azkenik, 36 sartu ziren. Azterlan horietan, ebaluatzen zen zein DNAREN NGS erabilera, RNAREN edo biena. Azterlanek hainbat panel komertzial edo panel pertsonalizatuak erabiltzen zituzten, gene edo alterazio mota desberdinak barnean hartu ahal zituztenak. Azterlan batzuek barnean hartzen zituzten edozein mota-tako leuzemia akutu zuten pazienteak, eta beste batzuek, LMA edo LLA zuten pazienteak. Heterogeneotasun handia egon bazen ere, NGSk emaitza onak lortu zituen, aztertutako genearen edo alterazio motaren arabera aldatzen zirenak.

Kostuen azterlanei dagokienez, identifikatutako 182 erreferentzien artean, ez zen artikulu garrantzitsurik aurkitu. Barrera, balio eta lehentasun-  
nei dagokienez, 923 erreferentzietatik, bakar batek ere ez zuen NGSren erabilera leuzemia akutuen diagnostikoan jorratu, baina bai identifikatu zen berrikuspen narratibo bat, neoplasia mieloideen diagnostikoan NGS sartzeak dakartzan erronkei buruzkoa. Eskuz egindako bilaketa gehigarri batean, lau erreferentzia identifikatu ziren, diagnostiko molekularra oro har inplementatzeko barrerei buruzkoak; baita iritziak eta balioak ere, minbizia duten pazienteenak eta NGSaren erabilerarekin zerikusia duten profesionalenak.

### **Eztabaida eta ondorioak**

Azterlan gutxik ebaluatzen dute zein den NGSren erabilgarritasun klinikoa leuzemia akutuetan. Horrez gain, heterogeneotasun handia dago azterlanetan erabilitako estrategietan eta NGS paneletan, eta horrek zaildu egiten du ebidentzia baloratzea, balio analitiko eta klinikoari dagokionez. Hala ere, leuzemia akutuen diagnostikoan, emaitzen kalitate- eta interpretazio-irizpideak modu adostuan ezartzeak eta laborategien arteko bat-etortze eta baliozkotzeari buruzko azterlanak egiteak lagundu ahal du NGSren baliozkotasun eta erabilgarritasun klinikoa areagotzen. NGS inplementatzeko, definitu behar da zer gene sekuentziatu behar den, baita zer alterazio mota detektatu behar dirn, eta ohiko metodoak erabiltzen jarraitzea komeni den alteraziorik dagoen ala ez. Identifikatutako heterogeneotasuna gorabehera, NGS lagungarria izan daiteke datu garrantzitsuak lortzeko kariotipo konbentzionalik egin ezin zaien pazienteetan, eta datuak

emateko estratifikazioa hobetzeko eta tratamendua hautatzeko. Hala ere, profesionalek eta pazienteek jakin beharko lukete zer ondorio izan ditza-keten NGSren emaitzek, itxaropen faltsurik ez sortzeko, eta aukera izate-ko leuzemiarekin zerikusirik ez duten aurkitu daitezken emaitzak ez eza-gutzeko.

# Structured Summary

**Title:** Massive parallel sequencing for the diagnosis of acute leukaemia

**Authors:** Ibarгойen-Roteta N, Gutiérrez-Ibarluzea I, Garcia Ruiz JC, Lawry C, Urruticoechea Ribate A, Galnares-Cordero L, Bayón Yusta JC.

**Keywords:** massive parallel sequencing, acute leukaemia, diagnosis

**Date:** 04/25/2023

**Pages:** 182

**References:** 116

**Language:** Spanish, with abstracts in Spanish, Basque and English

## Introduction

Acute leukaemia is a rapidly developing type of cancer, originating in the bone marrow, the tissue that produces blood. Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) accounts for 80% of all cases of paediatric acute leukaemia, while in adults, acute myeloid leukaemia (AML) is one of the most common types of leukaemia. Many of the genetic alterations found in these patients are key to establishing the clinical diagnosis, prognosis and treatment to be used, and tend to be detected by conventional karyotyping, fluorescent in situ hybridization (FISH), and targeted Sanger sequencing. Nonetheless, next-generation sequencing (NGS), also called massive parallel sequencing, has revolutionized genetic diagnosis in recent years. In this context, it was considered necessary to assess the best evidence evaluating the diagnostic performance of NGS in patients with acute leukaemia.

## Aims

The main aim of this study was to assess the evidence available concerning the usefulness of NGS for the diagnosis of acute leukaemia, and specifically, its validity, clinical utility, and efficiency as well as factors related to its implementation.

## Methodology

The Medline (via PubMed), Embase, and the Cochrane Library databases were searched to identify studies published between 2015 and October 2021 on the validity and usefulness of NGS. In addition, searches were performed for studies focusing on barriers and facilitators, health professionals' and/or patients' values and preferences, and finally, economic analyses. The evidence was evaluated using the framework proposed by Pitini *et al.* The

selection, reading and assessment of the evidence were carried out independently by two researchers.

**Economic analysis:**  YES NO      **Expert opinion:**  YES NO

## **Results and discussion**

Out of 1,453 potentially relevant references on the validity and utility of NGS, 36 were finally included. These studies assessed the use of NGS of DNA, RNA or both. The studies employed a range of commercially available and customised panels spanning different genes or different types of alteration. Some studies included patients with any type of acute leukaemia, while others focused only on AML or ALL. Although there was great heterogeneity, NGS tended to provide good results, with differences depending on the gene or type of alteration studied.

Regarding cost analyses, we did not find any relevant studies among the 182 publications identified. Concerning barriers/facilitators, and clinicians' and/or patients' values and preferences, none of the 923 publications identified focused on the use of NGS in the diagnosis of acute leukaemia, although we did find a narrative review on the challenges of introducing NGS in the diagnosis of myeloid cancer. An additional manual search retrieved four studies on the barriers to the implementation of molecular diagnosis in general, as well as the opinions and values of cancer patients and the health professionals involved in the use of NGS.

## **Discussion and conclusions**

Few studies have assessed the clinical utility of NGS in acute leukaemia. Furthermore, there is great heterogeneity in the NGS strategies and panels used, and this makes it difficult to assess the evidence on analytical and clinical validity. Even so, we consider that the establishment of agreed criteria for quality assessment and the interpretation of results, as well as the performance of inter-laboratory concordance and validation studies, may help to increase the validity and clinical utility of NGS in the diagnosis of acute leukaemia. Before implementing NGS, there is a need to define the genes to be sequenced and type of alterations to be detected and decide whether there are alterations for which conventional methods should continue to be used. Despite the heterogeneity identified, NGS may help obtain relevant data in patients in whom conventional karyotyping cannot be performed and provide data to improve risk stratification and treatment decision-making. Nonetheless, health professionals and patients should be conscious of the implications that NGS results could have, to avoid creating false expectations, and the possibility of finding results unrelated to leukaemia that patients might prefer not to know about.

# I. Introducción

## I.1. Qué es la leucemia aguda

La leucemia aguda es un cáncer de evolución rápida que se origina en el tejido que genera la sangre. La caracteriza el crecimiento desordenado y la producción de glóbulos blancos anómalos (blastos) que alcanzan el torrente sanguíneo e infiltran a otros órganos (1).

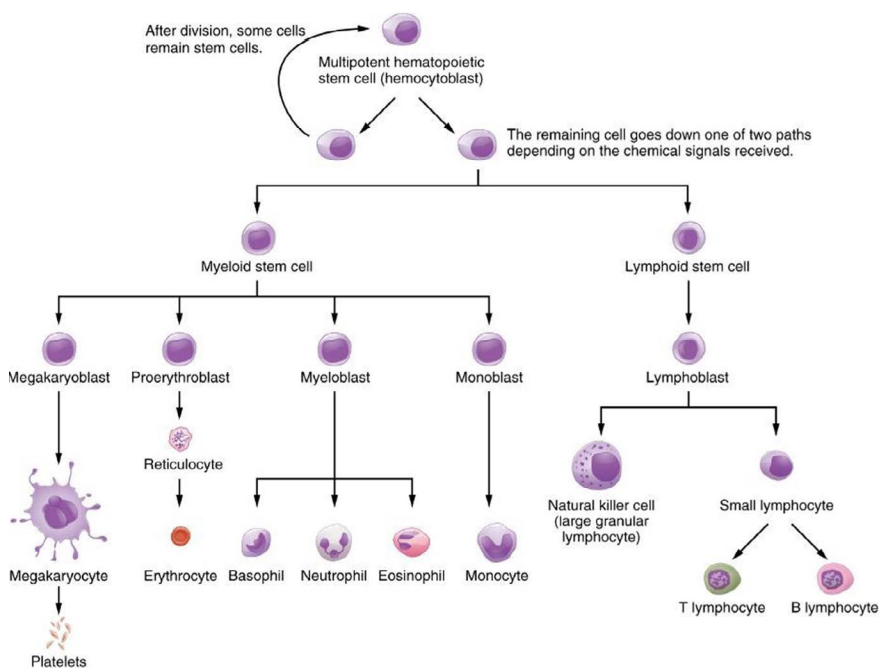
El tejido que genera la sangre se denomina médula ósea. Se encuentra en la vida adulta en el interior de los huesos planos y está compuesto en un 45 % por células y el resto por matriz extracelular. La vida media de estas células es variable, desde los 120 días en los eritrocitos hasta incluso años para ciertos tipos de linfocitos. Este sistema hematopoyético se caracteriza por presentar una alta actividad proliferativa y recambio celular, y por la presencia de una población de células primitivas inmaduras conocidas como Células Madre Hematopoyéticas (CMHs), que son las que se encargan del proceso de la hematopoyesis y que generan cerca de  $2 \times 10^{11}$  eritrocitos y  $10^{10}$  células blancas por día (2).

Las CMHs poseen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse a múltiples linajes celulares, presentando marcadores de superficie que las identifican. En los últimos años se han realizado grandes avances en la comprensión de la biología básica de los procesos celulares que rigen los mecanismos de auto-renovación, diferenciación y proliferación de las CMHs y de la participación de diferentes vías de señalización (Hedgehog, Notch y Wnt) que controlan el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de las mismas (3).

El sistema hematopoyético en su conjunto tiene múltiples funcionalidades. Se ocupa tanto del transporte de oxígeno (eritrocitos) como de la hemostasia primaria (plaquetas) como de soportar nuestro sistema inmunológico, tanto de respuesta innata como adaptativa (leucocitos). Este sistema está constituido por un conjunto de células de la médula ósea, la sangre y del sistema linfoide que dan origen a todos los tipos de células sanguíneas a partir de una CMH. Las CMHs poseen tres características básicas: 1) son multipotentes, es decir, tienen el potencial de generar todos los linajes sanguíneos (la línea roja que produce eritrocitos, la blanca que produce células de tipo linfoide (linfocitos B y T) o mieloide y la línea trombocítica, que da origen a megacariocitos/plaquetas; 2) tienen un alto potencial proliferativo y son capaces de dividirse y producir un gran número de células maduras durante la vida de la persona; y 3) tienen alta capa-

idad de generación de nuevas células madre idénticas, lo que se conoce como auto-renovación (3).

En la siguiente figura (Figura 1) se resume el proceso hematopoyético, es decir, como se produce la proliferación y diferenciación de las células que forman el tejido sanguíneo (4):



**Figura 1.** Sistema hematopoyético de la médula ósea. Reproducido de: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/18-2-production-of-the-formed-elements> (4).

La proliferación y maduración de las células precursoras en la médula ósea está estimulada por citocinas. Las citocinas hematopoyéticas las producen las células estromales y los macrófagos en la médula ósea, lo que proporciona el ambiente local óptimo para la hematopoyesis. También las producen linfocitos T estimulados por antígenos u otras células y los macrófagos activados por citocinas o microorganismos, lo que proporciona un mecanismo para el reabastecimiento de los leucocitos que puedan haberse consumido durante las reacciones inflamatorias e inmunitarias (3).

Toda aquella mutación en estas células que produzca alteraciones en los procesos de proliferación y maduración puede derivar en el desarrollo de neoplasias hematológicas, como es el caso de las leucemias agudas.

A continuación, se describen las características más importantes de la leucemia aguda, tanto en la edad pediátrica como en la edad adulta.

### 1.1.1. Leucemia aguda en la edad pediátrica

La leucemia aguda es el tipo de neoplasia más frecuente en la edad pediátrica, sobre todo la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Esta comprende el 80 % de todas las leucemias agudas en este grupo de edad (5).

Las manifestaciones clínicas de la LLA suelen ser la consecuencia de la ocupación de la médula ósea por parte de las células leucémicas, lo que produce anemia, trombopenia y neutropenia. El diagnóstico se realiza mediante el análisis morfológico, citogenético y molecular del aspirado de médula ósea de los pacientes (5).

El pronóstico de los niños con LLA ha mejorado mucho en las últimas décadas, gracias a los nuevos fármacos y la adaptación del tratamiento al riesgo de recaída de los pacientes. En la actualidad, la tasa de curación global de la LLA se aproxima al 90 % en los países desarrollados (5). A pesar de estos buenos resultados, el tratamiento fracasa en un 10-20 % de los pacientes (6). Por ello, son necesarias nuevas estrategias que permitan conocer y seleccionar los pacientes que presentan mayor riesgo de recaída. Además del fracaso al tratamiento, otro de los temas que más preocupa en el manejo de estos niños es la toxicidad de los fármacos que se utilizan en el proceso de inducción y mantenimiento y de su efecto en la calidad de vida de estos niños a largo plazo (5).

En el caso de la leucemia mieloblástica aguda (LMA), aunque no es tan frecuente en niños como la LLA (15-25 % de las leucemias pediátricas) es la responsable del 20-30 % de las muertes por leucemia en la edad pediátrica. Este tipo de leucemia responde peor al tratamiento, presenta mayor número de complicaciones hemorrágicas e infecciosas al diagnóstico y necesita tratamientos más intensivos, como el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Los resultados de los últimos estudios europeos y americanos sitúan ya una supervivencia a los 5 años del 60-70 % (5).

### 1.1.2. Leucemia aguda en la edad adulta

En los adultos, la LMA es uno de los tipos de leucemia más común, siendo la incidencia en España de 3,91 casos (IC 95 % de 3,79 a 4,02) por 100.000 habitantes/año (7). La edad al diagnóstico fue de 68 años de media-

na (rango de 50 a 78 años), aunque en caso de LMA con anomalías genéticas, ésta desciende a los 49 años (rango de 35 a 67 años) (7).

Cerca del 60-70 % de los pacientes adultos (entre 18-65 años) alcanzarán remisión completa, aunque el 50-70 % recaen en un tiempo de tres años. En los pacientes adultos con LMA, cerca del 22,6 % de los pacientes alcanza una supervivencia de 5 años (8).

En el caso de la LLA, solo el 20 % de los casos se producen en población adulta. En este grupo de edad, las tasas de curación son solo del 40 al 50 %, siendo la tasa de supervivencia a los 5 años del 30 al 40 %. Esto puede deberse a características de mayor riesgo en el diagnóstico, mayor presencia de comorbilidades y al desarrollo de resistencia a la quimioterapia tras la recaída (9).

En la siguiente figura se describen las diferencias entre las LLA y las LMA (5).

| Tabla I. Diferencias principales entre las LLA y las LMA |  |   |
|--|--|---|
|  | LMA  | LLA   |
| Presentación clínica                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Síntomas constitucionales más marcados (fiebre, anorexia...)</li> <li>- Sangrado mucosa oral, epistaxis, púrpura, petequias</li> <li>- Adenopatías</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiebre frecuente</li> <li>- Hepatoesplenomegalia y linfadenopatías como expresión de enfermedad extramedular</li> <li>- Petequias, púrpura</li> <li>- Dolores óseos</li> </ul> |
| Morfología de los blastos en el subtipo más frecuente    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Grandes</li> <li>- Núcleo irregular</li> <li>- Cromatina irregular</li> <li>- Citoplasma abundante con gránulos y bastones de Auer</li> </ul>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pequeños</li> <li>- Núcleo grande</li> <li>- Cromatina homogénea</li> <li>- Citoplasma escaso</li> </ul>   |
| Histoquímica   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mieloperoxidasa</li> <li>- Sudán negro</li> <li>- Esterasa inespecífica</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido periódico de Schiff</li> <li>- Fosfatasa ácida (células T)</li> </ul>  |
| Inmunofenotipo   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD13, CD14, CD33</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cel. B: CD10, CD19, CD22, TdT</li> <li>- Cel. T: CD3, CD7, CD5, CD2, TdT</li> </ul>  |
| Tratamiento  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quimioterapia intensiva</li> <li>- TPH en 1ª remisión completa (si alto riesgo)</li> <li>- Corta duración (&lt;9 meses)</li> </ul>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quimioterapia menos intensa</li> <li>- TPH solo para recaídas y pacientes de muy alto riesgo</li> <li>- Larga duración (2-3 años)</li> </ul>                                   |
| Pronóstico (supervivencia libre de enfermedad)           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aprox. 60-70 %</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Riesgo standard: 90-95 %</li> <li>- Alto riesgo: 75 %</li> <li>- Lactantes aprox. 50 %</li> </ul>  |

*TPH: trasplante progenitores hematopoyéticos.*

**Figura 2.** Diferencias principales entre las LLA y las LMA (5)

### 1.1.3. Clasificación de las leucemias agudas

En la siguiente figura se muestra la clasificación de las LLA propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (10), en función de la presencia o no de determinadas alteraciones genéticas que tienen gran importancia pronóstica y se utilizan para definir los grupos de mayor o menor riesgo de recaída, así como para ajustar la intensidad de la quimioterapia.

En el caso de la LLA de células B (LLA-B), la National Comprehensive Cancer Network® (NCCN) clasifica en dos grupos de riesgo citogenético a los pacientes, en función del tipo de alteraciones genéticas que presentan: el grupo de bajo riesgo (good risk) y el de riesgo alto (poor risk) (11).

| WHO classification of acute lymphoblastic leukemia  |
|---|
| <p>B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma, not otherwise specified</p> <p>B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma, with recurrent genetic abnormalities B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy<br/>                     B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy<br/>                     B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2)[BCR-ABL1] B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23)[MLL rearranged]<br/>                     B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22) [ETV6-RUNX1] B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3)[TCF3-PBX1]<br/>                     B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32) [IL3-IGH]<br/>                     B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21)<sup>b</sup> B-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma with translocations involving tyrosine kinases or cytokine receptors ("BCR-ABL1-like ALL")<sup>b,14</sup></p> <p>T-cell lymphoblastic leukemia/lymphomas<br/>                     Early T-cell precursors lymphoblastic leukemia<sup>b</sup></p> |

**Figura 3.** Clasificación de las LLA propuesta por la OMS (10).

En la siguiente figura, se muestra por otro lado la clasificación de las LMA según la OMS (12).

| Table 1. WHO classification of AML and related neoplasm |  |
|---|--|
| Types   | Genetic abnormalities  |
| AML with recurrent genetic abnormalities                | AML with t(8;21)(q22;q22);RUNX1-RUNX1T1<br>AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11<br>APL with PML-RARA<br>AML with t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A ML with t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214<br>AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15- MKL1<br>AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1<br>AML with BCR-ABL 1 (provisional entity)<br>AML with mutated NPM1<br>AML with biallelic mutations of CEBPA<br>AML with mutated RUNX1 (provisional entity) |

|  |  |
|--|--|
| AML with myelodysplasia-related changes<br>Therapy-related myeloid neoplasms | AML with minimal differentiation<br>AML without maturation<br>AML with maturation<br>Acute monoblastic/monocytic leukemia<br>Acute erythroid leukemia<br>Pure erythroid leukemia<br>Acute megakaryoblastic leukemia<br>Acute basophilic leukemia<br>Acute panmyelosis with myelofibrosis |
| Myeloid sarcoma<br>Myeloid proliferations related to Down syndrome           | Transient abnormal myelopoiesis<br>ML associated with Down syndrome  |

**Figura 4.** Clasificación LMA y neoplasias relacionadas por la OMS (12).

Los casos de LMA (12, 13) pueden estratificarse en grupos de riesgo favorable, intermedio y de alto riesgo, en función a su perfil citogenético (ver Figura 5).

| Risk Category <sup>b</sup> | Genetic Abnormality  |
|----------------------------|--|
| <b>Favorable</b>           | t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i><br>inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i><br>Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> <sup>low(c)</sup><br>Biallelic mutated <i>CEBPA</i>   |
| <b>Intermediate</b>        | Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> <sup>high(c)</sup><br>Wild type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> <sup>low(c)</sup> (w/o adverse-risk genetic lesions)<br>t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> <sup>d</sup><br>Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse   |
| <b>Adverse</b>             | t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i><br>t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged<br>t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i><br>inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i><br>-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)<br>Complex karyotype, <sup>e</sup> monosomal karyotype <sup>f</sup><br>Wild type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> <sup>high(c)</sup><br>Mutated <i>RUNX1</i> <sup>g</sup><br>Mutated <i>ASXL1</i> <sup>g</sup><br>Mutated <i>TP53</i> <sup>h</sup> |

**Figura 5.** Estratificación del riesgo de la LMA de 2017 de la *European Leukemia Net* (ELN) (13).

De hecho, la identificación de mutaciones genéticas recurrentes en la LMA, como *FLT3-ITD*, *NPM1* y el gen alfa de unión al potenciador *CCAAT* (*CEBPA* en inglés), ha ayudado a refinar el pronóstico individual y a guiar el manejo de estos pacientes. El tratamiento de base sigue siendo una combinación de regímenes de tratamiento con citarabina/antraciclinas y trasplante para los candidatos elegibles dependiendo de su riesgo genético de recaída (13). Los pacientes de mayor edad a menudo no toleran esos regímenes de tratamiento, y presentan peor pronóstico (12).

Se observa entonces que es indispensable para un correcto diagnóstico y clasificación, realizar un estudio citogenético y molecular que permita clasificar al paciente en alguna de esas categorías, realizando los test genéticos que permitan identificar esas mutaciones de la forma más fiable posible.

## I.2. Estrategias moleculares en el diagnóstico de la leucemia aguda

Las enfermedades oncohematológicas incluyen una amplia variedad de alteraciones genéticas, que pueden ir desde las variantes de nucleótido único (SNVs en inglés), a pequeñas inserciones o deleciones (llamados *indels*) o hasta grandes reordenamientos o cambios estructurales (deleciones, duplicaciones y amplificaciones de grandes fragmentos de genes o *Copy Number Variation* en inglés) en los cromosomas o cambios numéricos (15). Muchas de estas alteraciones son críticas para el diagnóstico clínico, el pronóstico y la terapia de pacientes con estas enfermedades (14).

Existen varias técnicas moleculares que son utilizadas para detectar estas alteraciones. El análisis citogenético de los cromosomas por técnicas convencionales (cariotipo), la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH en inglés) y la secuenciación Sanger dirigida han sido las herramientas principalmente utilizadas para detectar estas alteraciones y siguen siendo parte de la atención estándar (15), aunque en algunas guías ya se recomienda el uso de la secuenciación de nueva/próxima generación (NGS en inglés) para detectar mutaciones de genes accionables que pueden cambiar el pronóstico y el tratamiento del paciente, tanto en los casos de LLA (17) como LMA (11). De hecho, en estas dos últimas décadas, los avances en la NGS han llevado a importantes descubrimientos genómicos en la LLA, relacionados con alteraciones genéticas somáticas y germinales de las que algunas tienen una importante implicación diagnóstica, pronóstica y terapéutica. En el caso de la LLA pediátrica, estos descubrimientos han facilitado la reducción de la proporción de pacientes que previamente eran catalogados como “otros” de un 25 % a un 5 % (16).

A continuación, se explican varias de las mismas.

### I.2.1. Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación por método Sanger

El método de Sanger es una técnica que permite identificar la secuencia de una única región de ácido dextrirribonucleico (ADN) en cada lectura/

carrera. Es un proceso laborioso, que consume mucho tiempo y recursos humanos. Para realizar esta técnica, es esencial disponer de ADN de cadena simple (molde) y un iniciador, denominado cebador. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa I que va a extender la cadena con nucleótidos marcados con fluorescencia, copiando de forma complementaria el molde de ADN y revelando la secuencia analizada. Necesita cantidades relativamente grandes de ADN para evaluar un solo gen y la coordinación y la compilación de los resultados de varias plataformas de análisis en un informe integrado (18).

La PCR cuantitativa (qPCR en inglés) es la técnica más utilizada en los laboratorios, ya que permite monitorizar la amplificación del ADN en cada ciclo de amplificación, y no solo al final.

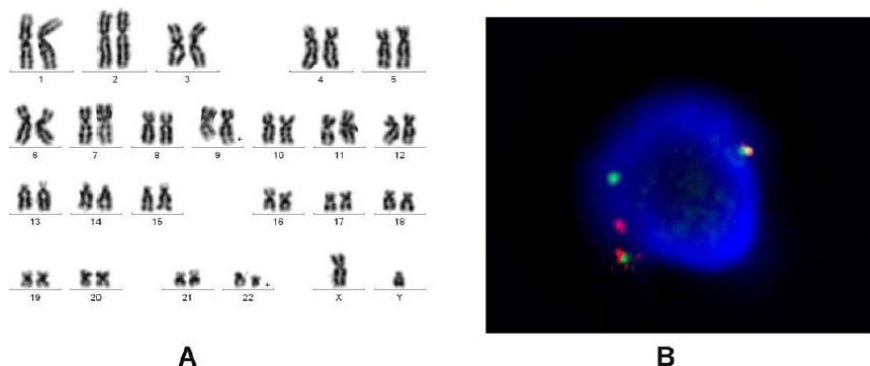
## 1.2.2. Citogenética convencional y molecular

Como ya se describe en el informe de Zoni Matta (18), la citogenética convencional (estudio de los cromosomas mediante bandas G) se utiliza para el análisis del cariotipo de las células tumorales. Requiere un número adecuado de metafases de buena calidad y no puede detectar cambios submicroscópicos ni reorganizaciones cromosómicas que impliquen zonas del cromosoma con un análisis de bandas similar.

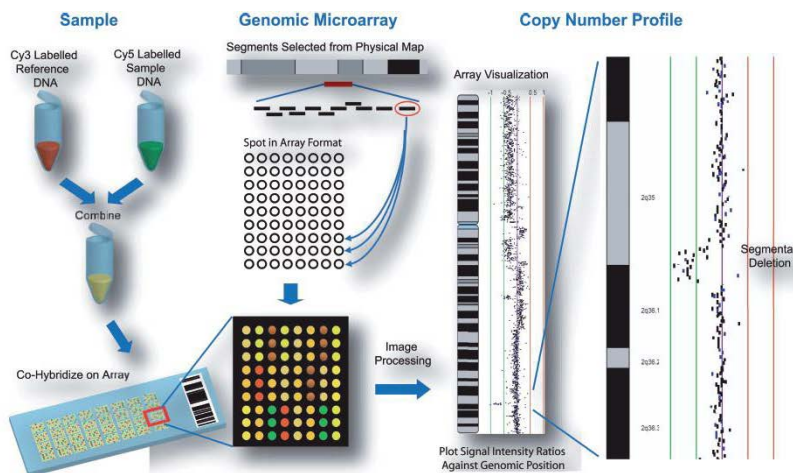
Esta se complementa con otras técnicas, como la FISH y la hibridación genómica comparada (CGH en inglés). La técnica FISH (ver Figura 6) permite determinar aneuploidías, microdeleciones, duplicaciones, inversiones, así como la adjudicación de un marcador genético a un cromosoma (cartografía genética). Usa segmentos de una única hebra de ADN (llamados sondas) que son marcados, o etiquetados, con una sustancia fluorescente y que pueden ligarse a un cromosoma específico. Cuando las sondas hibridan con el ADN del paciente, se emite una señal luminosa que se visibiliza con el microscopio de fluorescencia. Esta técnica es sensible, específica y rápida, puesto que no necesita cultivo, aunque una de sus limitaciones es que no puede detectar pequeñas deleciones y mutaciones (18).

La CGH (ver Figura 7, obtenida de Chari *et al.* (20)) identifica y analiza alteraciones genéticas relacionadas con una ganancia o pérdida de material genético entre una muestra de ADN en comparación con una muestra de referencia. Se trata de una técnica que no requiere cultivo celular previo pero que necesita al menos un 25 % de células malignas. Con esta técnica se pueden detectar variantes en el número de copias (CNV en inglés) en todo el genoma, siendo la resolución 50 veces más alta que la de la citogenética. En compara-

ción con la técnica FISH, la CGH puede detectar anomalías cromosómicas no descritas anteriormente y detectar copias simultáneamente en múltiples loci del genoma (18).



**Figura 6.** Citogenética convencional e hibridación in situ con fluorescencia en un paciente con leucemia mieloide crónica Filadelfia positivo. A) Cariotipo con t(9;22)(q34;q11). B) FISH que demuestra fusión en BCR (verde) en cromosoma 22 y gen ABL (rojo) en cromosoma 9. Imagen obtenida de Hernández JM *et al.* (19).



**Figure 1.** Generation of array comparative genomic hybridization profiles. Tumor and normal reference DNA are differentially labeled with cyanine-5 and cyanine-3 respectively and competitively hybridized to a genomic microarray. The array consists of DNA targets selected to span chromosome regions or the entire genome. These targets are typically spotted in replica. The ratio of the two fluorescence signal intensities reflects the relative copy number at that target. The ratio for each spot is plotted against its corresponding position in the human genome to generate a copy number profile.

**Figura 7.** Técnica de la CGH, obtenido de Chari R *et al.* (20).

### I.3. Secuenciación masiva de nueva generación

Las tecnologías de NGS están revolucionando el diagnóstico genético. Se trata de un conjunto de técnicas que identifican diferencias en las secuencias de ADN o ácido ribonucleico (ARN) complementario de un individuo al compararlo con uno de referencia (15).

La NGS es una tecnología que puede abordar la complejidad mutacional de los tumores, además de mostrar una mayor capacidad de detectar alteraciones somáticas que se puedan presentar en un bajo porcentaje en las muestras.

Respecto a las técnicas convencionales, la NGS produce una enorme cantidad de datos que hay que almacenar y procesar, lo que hace imprescindible un buen análisis de los mismos.

La NGS permite secuenciar miles de regiones de ADN no sólo de un paciente, sino de varias muestras de distintos pacientes de forma simultánea. El número de muestras que se pueden secuenciar a la vez dependerá de la plataforma que se utilice.

Dependiendo del número de genes analizados, la profundidad de análisis y de la plataforma, se pueden estudiar paneles de entre 10 y 500 genes en grupos de entre 1-50 pacientes simultáneamente. A su vez posee mayor sensibilidad (S), desde un límite de detección de 15-20 % de carga tumoral con las técnicas actuales, a la detección de mutaciones presentes en un 1 % con esta nueva tecnología.

Pero para evitar falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), el alineamiento y ensamblaje de las secuencias con respecto al del ADN de referencia son fundamentales (18).

En la siguiente figura se muestra una comparación de las características de la NGS con las tecnologías genómicas comúnmente utilizadas en los laboratorios para la caracterización de las leucemias (ver Figura 8):

**TABLE 1** | Comparison of genomic technologies commonly used in clinical laboratories for leukemia profiling.

|                             | Cytogenetics                          | Fluorescent in situ hybridization | Chromosomal microarray analysis | Sanger sequencing                           | Next-generation sequencing                          |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---|---|
| Resolution                  | 10–20 Mb                              | 50–100 kb                         | 1–100 kb                        | 1 bp  | 1 bp  |
| Sample type                 | Fresh tissue: PB, BM, tumor           | PB, BM, fresh, FF, FFPE, etc.     | PB, BM, fresh, FF, FFPE, etc.   | PB, BM, fresh, FF, FFPE, etc.               | PB, BM, fresh, FF, FFPE, etc.                       |
| Aberration detection        | Del/Dup/Amp, insertion, translocation | Del/Dup/Amp, translocation        | Del/Dup/Amp                     | SNVs, indels                                | Del/Dup/Amp, translocation, SNV, indel, fusions, SV |
| Loss of heterozygosity      | No                                    | No                                | Yes <sup>a</sup>                | No  | Yes   |
| Qualitative or quantitative | Qualitative with low sensitivity      | Quantitative                      | Semi quantitative               | Qualitative with relatively low sensitivity | Quantitative with high sensitivity                  |
| Genomic coverage            | Whole genome                          | Targeted                          | Whole genome                    | Targeted                                    | Targeted/whole genome                               |
| Scalability                 | No                                    | No                                | Yes                             | No  | Yes   |

<sup>a</sup>Only arrays containing SNPs.

PB, peripheral blood; BM, bone marrow; FF, fresh frozen; FFPE, formalin fixed paraffin imbedded; del, deletion; dup, duplication; Amp, amplification; SV, structural variation; UPD, uniparental disomy; SNVs, single nucleotide variants.

**Figura 8.** Comparación de las características de la NGS frente a las técnicas convencionales de laboratorio para la caracterización de leucemias, obtenido de Lalonde E *et al.* (21).

A continuación, se describen las diferentes estrategias de NGS existentes, así como los pasos generales de los que consta la NGS.

### 1.3.1. Tipos de secuenciación

#### 1.3.1.1. Secuenciación de ADN

A nivel del ADN, se puede estudiar el genoma completo, el exoma completo o grupos de genes en lo que se denominan paneles de genes. Según el diseño del ensayo, se puede obtener información sobre SNVs, *indels* y/o grandes reordenaciones (deleciones, duplicaciones o amplificaciones de grandes fragmentos de genes o CNV).

#### Secuenciación del genoma completo

El estudio de todas las regiones codificantes y no codificantes dentro del genoma se denomina secuenciación del genoma completo (WGS en inglés).

Una de sus ventajas es que la preparación de las bibliotecas es relativamente simple ya que no requiere pasos de enriquecimiento (22), aunque proporciona una gran cantidad de datos que hay que analizar y almacenar, lo que hace que el coste sea más elevado que el de las estrategias de secuenciación dirigidas y dando lugar además a un gran número de variantes de significado incierto (15). Además, la profundidad de la secuenciación es, en general, baja comparada con la de la secuenciación dirigida (15).

De todas formas, la WGS ha tenido su importancia durante las etapas de iniciales del desarrollo de la tecnología NGS, puesto que permitió descubrir numerosas asociaciones entre variantes de secuencia en genes y patologías (23).

#### Secuenciación del exoma

La secuenciación del exoma completo (WES en inglés) es un tipo de secuenciación dirigida donde se enriquece aproximadamente del 1 al 2 % del genoma humano. Está orientado a obtener la información genómica de los exones (las regiones codificantes de los genes) de los casi 20.000 genes, cubriendo aproximadamente un 85 % de las variantes que causan enfermedades hereditarias, principalmente monogénicas (23).

En la secuenciación de lo que se denomina exoma clínico (CES en inglés) se estudia la región codificante de unos 5.000 genes que tienen relevancia clínica, aunque no siempre es suficiente (24, 25).

Utilizando técnicas de WGS y WES, se ha aumentado la cantidad de genes asociados a enfermedades en casi un 90 % sólo desde 2007 a 2013 (26). Estas estrategias fueron también importantes en el descubrimiento de mutaciones recurrentes en el estudio de neoplasias, tanto en tumores sólidos como hematológicos, y han contribuido significativamente en la detección de mutaciones conductoras (*driver mutations* en inglés), así como al desarrollo de terapias dirigidas, y el diseño de paneles de genes según patologías (23).

#### Paneles de genes

Otro abordaje de secuenciación dirigida popularmente empleado es el estudio de paneles de genes.

En este tipo de secuenciación dirigida, lo que se hace es estudiar un número determinado de genes o regiones de genes importantes asociados a la patología concreta. Existen gran cantidad de paneles comerciales basados en distintas estrategias de enriquecimiento, y muchas compañías ofrecen opciones personalizables donde se pueden escoger las regiones y genes que se quieren secuenciar (27).

Además, el estudio de tumores en búsqueda de mutaciones somáticas suele ser algo más complejo, puesto que: 1) en el tumor coexisten tanto células tumorales como células normales; 2) las células tumorales pueden presentar trastornos de la ploidía y 3) pueden coexistir mutaciones conductoras o mutaciones pasajeras, subclones tumorales, etc.

Los paneles son utilizados de un modo habitual puesto que cubren regiones en las que se pueden observar mutaciones recurrentes. Además, al centrarse en determinados genes, permiten que la profundidad de secuenciación sea muy elevada, lo que permite detectar variantes somáticas que se encuentren en baja frecuencia, y agiliza el procesamiento bioinformático y posterior interpretación de los resultados (15).

Los paneles comerciales pueden estar enfocados en la secuenciación de ADN, de ARN o de ambas moléculas, y pueden utilizar técnicas de enriquecimiento diversas.

#### Otras técnicas basadas en ADN

Existen también algunos abordajes utilizados sobre todo en investigación, y que se centran en el estudio de la metilación (dirigida o de metiloma completo), de la unión entre proteína-ADN inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación (ChIP Seq en inglés), entre otros (28, 29), pero en este informe, estas variantes no se van a tener en cuenta.

#### 1.3.1.2. Secuenciación del ARN

Para poder secuenciar el ARN por NGS, lo primero que hay que hacer es convertir el ARN en un ADN copia, mediante lo que se denomina retro-transcripción.

Los métodos de secuenciación del transcriptoma completo brindan información útil para obtener un perfil de expresión de virtualmente todos los transcritos de ARN (ARN mensajero), estudiar la secuencia codificante (similar al exoma, pero restringido a genes expresados en ese tejido en particular), o bien para evaluar empalmes alternativos en la muestra en cuestión (30).

Otra opción es la secuenciación de ARN dirigida, enriqueciendo la muestra para representar los transcritos de interés y evaluar así su expresión relativa.

Una estrategia muy utilizada es la que se utiliza para determinar la presencia de fusiones génicas (translocaciones) cuando éstas producen una proteína quimérica. Como los puntos de ruptura y empalme entre genes fusionados suelen encontrarse en regiones intrónicas profundas y son muy variables, se han desarrollado estrategias a partir de ARN para poder detectar uniones exón-exón entre dos genes (ej: BCR-ABL1, EML4-ALK, etc.) (31).

## 1.3.2. Etapas de la NGS

A continuación, se describen de forma breve los pasos básicos de la NGS.

### 1.3.1.1. Preparación de bibliotecas (*library preparation*)

El objetivo de esta etapa es preparar la biblioteca, es decir, obtener fragmentos cortos de ADN que puedan ser secuenciados, y que puede hacerse antes o después de la fase de enriquecimiento de la muestra.

El ADN se puede fragmentar por medio de sonicación o por enzimas. Después de este proceso, y dependiendo de la estrategia de secuenciación, se seleccionarán las hebras de ADN que tengan un rango de tamaño adecuado, que puede variar entre 150 y 400 pares de bases.

Una vez fragmentado, se añade lo que se denominan los adaptadores (que son específicos para cada plataforma de secuenciación) a ambos extremos de cada uno de los millones de fragmentos de ADN a secuenciar (denominados insertos). En esta etapa se pueden añadir etiquetas, o lo que es lo mismo, secuencias establecidas de ADN para diferenciar cada muestra (*sample barcodes*), permitiendo combinar en un mismo ensayo múltiples muestras sin que haya riesgo de entrecruzamiento entre las mismas (27).

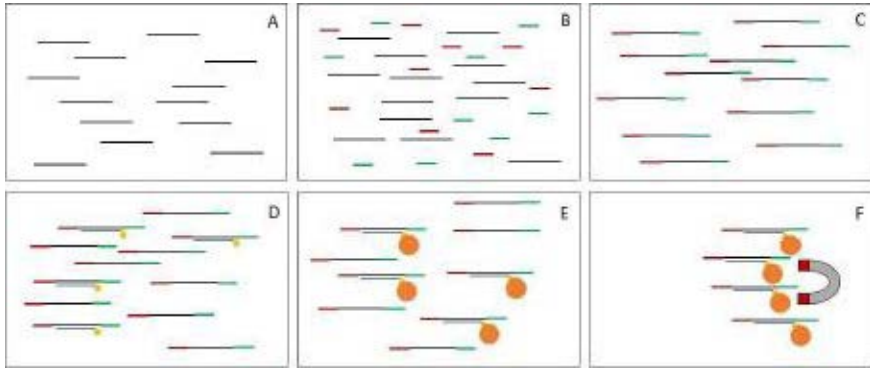
### Enriquecimiento del blanco (*target enrichment*)

La secuenciación del genoma completo no requiere del proceso de enriquecimiento, pero sí la fragmentación del ADN.

En el caso de la secuenciación dirigida, se necesita enriquecer y separar las regiones a secuenciar del resto de ADN genómico. Para ello hay dos técnicas principales, que son:

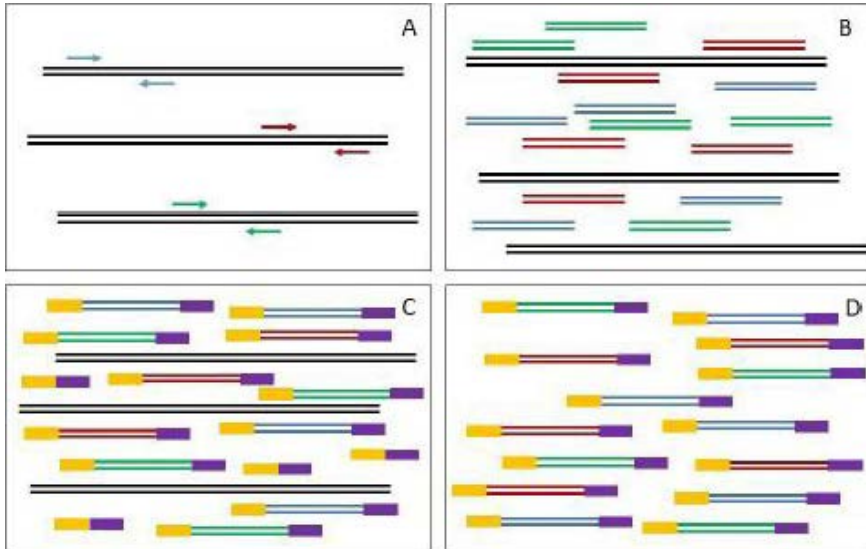
1) enriquecimiento basado en captura y 2) enriquecimiento basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés) (15).

Para el enriquecimiento basado en captura (ver Figura 9), el ADN se hibrida con sondas de ADN o ARN complementario a las regiones de interés. Las sondas en solución se encuentran marcadas, con biotina, por ejemplo, por lo que pueden ser capturadas con perlas magnéticas con avidina y descartar así las secuencias que no se han hibridado. Ese procedimiento, aunque es más costoso, elimina la parte de amplificación por PCR, que puede introducir errores en la amplificación por parte de las enzimas polimerasas.



**Figura 9.** Enriquecimiento del blanco basado en captura: el ADN es fragmentado en segmentos cortos (A). Posteriormente se añaden adaptadores (rojo y verde) (B) que se unen a los fragmentos de ADN para lograr la construcción de la biblioteca (C). Luego se hibrida la biblioteca con sondas complementarias a las regiones de interés (azul) (D). Las sondas se encuentran marcadas con biotina (amarillo) y pueden ser capturadas por medio de perlas magnéticas recubiertas con avidina (unión avidina-biotina) (E). Por último, mediante un imán se capturan las perlas magnéticas y se obtiene una biblioteca que contiene sólo fragmentos de ADN representando regiones de interés (F).

En cuanto a las técnicas basadas en enriquecimiento por el sistema PCR multiplex (ver Figura 10), se utilizan múltiples cebadores (*primers*) específicos en una misma reacción para enriquecer las regiones de interés, generando amplicones de tamaño corto. Éste es un método menos laborioso, se obtienen menos secuencias mapeadas fuera de la región de interés (denominadas *off-target* en inglés) y requiere menos tiempo que el anterior, pero al basarse en la amplificación por PCR, puede presentar una mayor fuente de error.

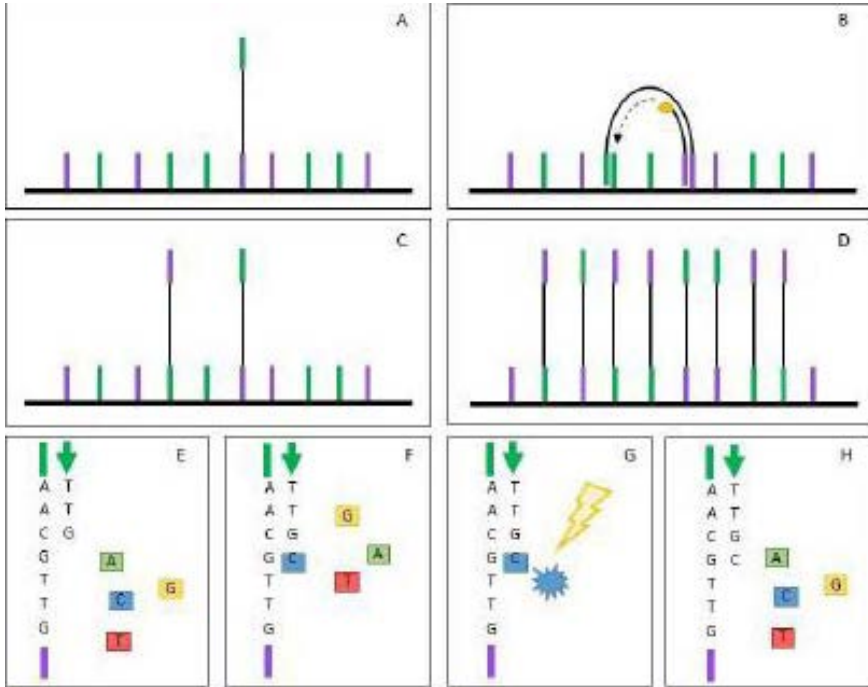


**Figura 10.** Enriquecimiento del blanco basado en amplicones (sistema PCR multiplex): las regiones de interés son amplificadas a partir de ADN genómico (doble hebra, color negro) por medio de cebadores específicos (flechas de color azul, rojo, verde) (A). Se obtienen así múltiples copias de las regiones amplificadas (doble hebra color azul, rojo y verde) (B). Luego se añaden los adaptadores para la construcción de la biblioteca (amarillo y violeta) (C). Posteriormente, la biblioteca es purificada para eliminar ADN genómico y los dímeros de adaptadores (D).

#### Amplificación y secuenciación masiva paralela

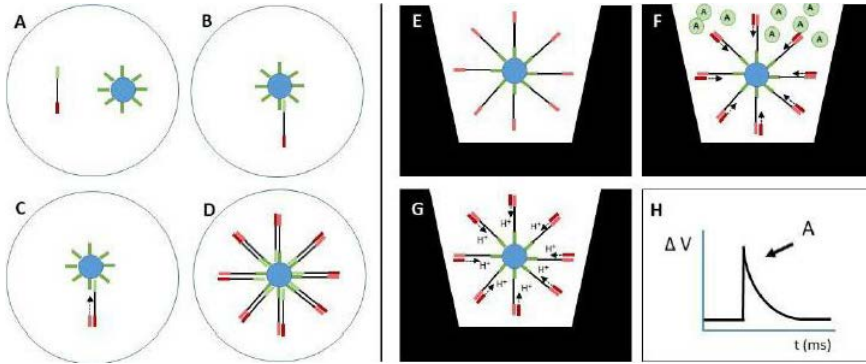
Las plataformas de Illumina e Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) utilizan las bibliotecas como molde o templado de secuenciación, que tienen que ser amplificadas para poder ser detectadas. En las plataformas Illumina (ver Figura 11), las bibliotecas son cargadas en una celda de flujo, y cada inserto es amplificado de forma clonal (una PCR-puente), lo que se usa como molde o templado. Posteriormente se produce la secuenciación por síntesis con terminadores reversibles, donde en cada flujo sucesivo de nucleótidos terminadores (marcados con fluorescencia), compiten para elongar la cadena. Sólo se añade un nucleótido por ciclo, que al excitarse se registra su emisión lumínica por un dispositivo óptico. A continuación, el fluoróforo y el terminador se clivan y comienza un nuevo ciclo.

El proceso de secuenciación se realiza en ambos sentidos (desde ambos adaptadores), por lo que se obtienen lecturas de extremos pareados (o *paired-end reads* en inglés) (27).



**Figura 11.** Secuenciación en la plataforma Illumina: amplificación de grupos (clusters) en celda de flujo (A a D). Cada hebra de ADN se une a la celda de flujo por hibridación (verde y violeta) con oligonucleótidos complementarios (unidos al soporte sólido). Mediante otra reacción de polimerización (B) se obtiene una segunda hebra complementaria (C). El proceso se repite hasta generar un grupo (cluster) a partir de la hebra primaria, que se detecta por fluorescencia. La secuenciación (por síntesis) (E a H) se genera por cebadores específicos para los adaptadores (flecha verde). En cada flujo, los nucleótidos marcados con fluorescencia compiten por elongar la cadena de ADN (E) y se une a ella sólo aquel complementario a la hebra molde (F). El resto se elimina y una fuente lumínica excita el fluoróforo del nucleótido añadido (G), señal que es recogida y analizada. El ciclo vuelve a repetirse para incorporar otro nucleótido a la cadena (H).

En las plataformas Ion Torrent (ver Figura 12), para amplificar clonalmente cada hebra de la biblioteca, se realiza una PCR en emulsión con perlas. Cuando la emulsión se rompe, las perlas recubiertas de ADN amplificado (templado) se enriquecen y se cargan en un chip (semiconductor) que contiene millones de pocillos. Cada perla se aloja dentro de un pocillo, y cada vez que un nucleótido se incorpora a la cadena, se libera un protón que se traduce en una señal eléctrica, indicando que en ese flujo se ha añadido ese nucleótido. Por lo tanto, si no se adiciona un nucleótido, no habrá señal eléctrica.



**Figura 12.** Secuenciación en plataforma Ion Torrent: la PCR en emulsión (A a D) consiste en millones de reacciones de PCR a la vez en micelas contenidas en una emulsión. En cada micela hay solo una hebra de ADN (inserto -color negro) flaqueada por adaptadores (verde claro y rojo), y una perla con secuencias complementarias a uno de los adaptadores (verde oscuro) (A). La hebra de ADN se une por complementariedad a la perla (B). Por cebadores específicos complementarios al adaptador libre (rojo claro) se genera ciclos de amplificación clonal (C) para obtener una perla con múltiples copias del mismo fragmento de ADN inicial (D). La secuenciación por semiconductor (E a H) se realiza tras romper la emulsión, enriquecer las perlas amplificadas clonalmente y cargarlas en el chip semiconductor. Cada una de las perlas alcanza un pocillo en el chip (E). A partir de cebadores complementarios al adaptador del extremo libre se realizan flujos de un nucleótido en particular (en el ejemplo se observa una adenina) (F). Si el nucleótido correspondiente a ese flujo es añadido a la cadena por complementariedad con la hebra molde se libera un protón al generarse la reacción de la polimerización (G). Esa liberación causa un cambio de pH que se traduce a un cambio de voltaje y genera la señal cruda de secuenciación (H).

En este caso, las plataformas Ion Torrent genera lecturas en un solo sentido (*single-end reads*) (27).

Tanto Illumina como Ion Torrent presentan una serie de secuenciadores de distinta escala y capacidad de procesamiento. La elección del tipo de secuenciador dependerá de la intención de uso que se le vaya a dar.

#### Procesamiento de los datos

El procesamiento bioinformático de los datos comienza con la señal cruda obtenida y termina con la interpretación de las variantes (15).

Para el estudio de variantes puntuales (SNVs) e inserciones o deleciones (*indels*) en el ADN, el procesamiento bioinformático se realiza en tres pasos (análisis primario, secundario y terciario). A este flujo de trabajo bioinformático se lo denomina *pipeline* bioinformático.

En el análisis primario, la señal cruda obtenida se convierte de forma automática en millones de secuencias cortas de ADN, que se denominan lecturas. Cada lectura se corresponde con un inserto de la biblioteca. El archivo que se genera con esta información es normalmente un archivo FASTQ.

En el análisis secundario de los datos, y tras una serie de pasos, se obtiene el archivo de formato de llamado de variantes (VCF) que contiene la información de todas las variantes y que incluye a todas aquellas que muestran alguna diferencia con el genoma de referencia, sin que signifique que sean patogénicas (15). Por último, en el análisis terciario, se anotan y filtran cada una de las variantes según el objetivo del análisis. Para este proceso, se utilizan bases de datos que pueden incluir información genómica (gen, exón, variante en secuencia codificante y en la proteína, etc.), funcional, frecuencia poblacional de la variante, predicciones bioinformáticas de patogenicidad etc. En la figura 13 se muestran algunas de las bases de datos más utilizadas en oncología (obtenido de Jauk *et al.* (15)).

|           |   |   |
|-----------|---|---|
| Oncología | Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)                       | <a href="http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic">http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic</a> |
|           | The Cancer Genome Atlas (TCGA)  | <a href="http://cancergenome.nih.gov/">http://cancergenome.nih.gov/</a>           |
|           | OncoKB  | <a href="http://oncokb.org/#/">http://oncokb.org/#/</a>                           |
|           | My Cancer Genome  | <a href="https://www.mycancergenome.org/">https://www.mycancergenome.org/</a>     |
|           | Clinical Interpretations of Variants in Cancer (CiVIC)                  | <a href="https://civicdb.org/home">https://civicdb.org/home</a>                   |
|           | Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center                  | <a href="https://pct.mdanderson.org">https://pct.mdanderson.org</a>               |
|           | Pediatric Cancer Genome Project (St. Jude Children's Research Hospital) | <a href="http://explorepcgp.org">http://explorepcgp.org</a>                       |

**Figura 13.** Bases de datos utilizadas para la anotación e interpretación de variantes en oncología (adaptado de Jauk *et al.*, 2019) (15)

Por último, el filtrado de las variantes se puede realizar a partir de los elementos anotados, asignando así un valor clínico a cada una de ellas.

Existen algunos criterios y recomendaciones internacionales para interpretar y reportar variantes germinales y somáticas (32-34).

La cobertura de la secuenciación se refiere a la cantidad de información genómica representada por las lecturas obtenidas frente a una referencia. Cuanto mayor sea el porcentaje, mejor estará representado el blanco a estudio. A lo largo del genoma humano, existen ciertas zonas que son difíciles de enriquecer o secuenciar, y la cobertura puede reducirse.

El concepto de fuera de diana (*off-target*) se refiere al porcentaje de lecturas que se sitúan fuera de la región de interés de enriquecimiento, lo que suele ser más frecuente cuando se utilizan estrategias de captura (15).

Se entiende como profundidad (*coverage depth*) al número de veces que fue secuenciado un locus en particular. Por lo que si se cuenta con una profundidad de 100x, quiere decir que el locus fue cubierto por 100 lecturas.

En general, la secuenciación de mutaciones somáticas requiere una mayor profundidad que la de mutaciones germinales, por lo que, a mayor profundidad, mayor confianza en poder detectar variantes presentes en baja frecuencia (15).

El valor de la detección de grandes deleciones, duplicaciones o ampliaciones (CNV) es muy importante en algunas patologías, como en el caso de las leucemias agudas. Este tipo de alteraciones pueden evaluarse por medio de diversos métodos bioinformáticos, siempre y cuando el diseño del estudio lo permita.

A nivel del ARN, el procesamiento bioinformático de las lecturas puede detectar presencia de fusiones génicas, cuantificar las lecturas correspondientes a un transcrito y expresarla de forma absoluta o relativa, etc. (expresión génica).

### 1.3.4. Marcado CE-IVD para el uso de la NGS en diagnóstico clínico

En la valoración de la introducción en la cartera común de servicios de la NGS para el diagnóstico de leucemias agudas es necesario disponer de la información sobre los dispositivos y paneles de secuenciación masiva que cuentan con el marcado de conformidad europea para el diagnóstico in vitro (CE-IVD en inglés).

En el caso de los secuenciadores, tanto Ion Torrent como Illumina cuentan con dispositivos para uso en laboratorios de diagnóstico clínico.

Se trata de los modelos Ion PGM Dx System (ver en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/clinical/diagnostic-testing/instruments-automation/genetic-analysis-instruments/ion-pgm-dx.html>) de Thermo Fisher Scientific y el instrumento MiSeqDx de Illumina (regulada por la United States Food and Drug Administration (FDA) y con marcado CE-IVD)) (ver <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseqdx.html>).

El resto, son plataformas de uso en investigación, por lo que, en un principio, no podrían ser utilizados en un laboratorio de diagnóstico clínico.

En cuanto a los paneles de genes disponibles para la secuenciación en pacientes con leucemias agudas, de momento los únicos paneles que se han

detectado que tienen marcado CE-IVD son los paneles de la Compañía Sistemas Genómicos y el Myeloid Solution (MYS) (SOPHiA Genetics).

### I.3.5. Secuenciación masiva de tercera generación

Si bien la NGS es una herramienta novedosa y prometedora, se han desarrollado nuevos secuenciadores con un concepto diferente. Se los denomina de tercera generación: son capaces de secuenciar sin amplificar (secuenciación de molécula única), es decir que carecen de pasos de amplificación. Entre estas tecnologías se encuentran las desarrolladas por Nanopore, NanoString o PacBio. Las ventajas de este tipo de secuenciadores se encuentran en poder secuenciar en tiempo real (sin que haya pausas entre los flujos de nucleótidos) y leer hebras de ADN de miles de bases de longitud, aunque con una precisión algo menor que la de NGS (15).

Se trata de tecnologías que están en desarrollo, por lo que no se han tenido en cuenta para este informe, aunque en un futuro probablemente superen a las técnicas de secuenciación de segunda generación.

## I.4. Justificación de la elaboración del informe

Este informe surge a petición de la Comisión de Prestaciones, Aseguramiento y Financiación (CPAF) del Ministerio de Sanidad en el proceso de identificación y priorización de necesidades de evaluación que se lleva a cabo para conformar el Plan de Trabajo Anual de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del Sistema Nacional de Salud (RedETS).

En general, tanto el diagnóstico como el pronóstico y el tratamiento de elección para los pacientes con leucemia aguda se basa en la presencia o ausencia de alteraciones genéticas específicas. El hecho es que las leucemias agudas son neoplasias hematológicas caracterizadas por la presencia de alteraciones genéticas que se relacionan de forma estrecha con el curso de la enfermedad. El número de alteraciones identificadas en estos pacientes aumenta por el gran número de publicaciones al respecto, pero en la práctica clínica, las técnicas convencionales utilizadas solo detectan las más comunes (35).

La NGS está proporcionando nuevos aspectos y perspectivas en estas áreas. Numerosas publicaciones señalan las ventajas de la utilización de la NGS en las enfermedades oncohematológicas, por su alta S y porque han

acelerado descubrimientos biológicos y biomédicos que ayudan a comprender mejor la patogénesis, precisar el diagnóstico y hacerlo más rápidamente, identificar nuevas mutaciones somáticas submicroscópicas con significado pronóstico, clasificar la agresividad de la leucemia aguda, seleccionar el tratamiento efectivo desde el diagnóstico, así como el desarrollo de tratamientos personalizados (dianas terapéuticas). Sin embargo, la interpretación de variantes de la normalidad con significado desconocido y el análisis computacional de los datos obtenidos con sentido clínico sigue siendo un reto.

Debido a los avances tecnológicos en el desarrollo de técnicas de secuenciación de segunda generación, los estudios que indican una mejora en el proceso diagnóstico molecular de los pacientes con leucemia aguda y la demanda cada vez mayor de contar con la NGS en los centros sanitarios, se considera necesario la elaboración de un informe que ofrezca a los decisores y a los profesionales sanitarios la mejor evidencia publicada que valore el rendimiento diagnóstico de la NGS, en este caso, en pacientes con leucemia aguda.

Cabe señalar que este informe no aborda el uso de la NGS como método para monitorizar la enfermedad residual mínima (MRD en inglés) en pacientes con leucemia aguda.

## II. Objetivos

### II.1. Objetivo general

El objetivo general de este informe es evaluar la evidencia que existe sobre la utilidad de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas.

### II.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- Determinar cuál es la validez (S, especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN)) de la NGS en el diagnóstico de la leucemia aguda.
- Valorar la utilidad clínica (impacto en los resultados en salud) de la NGS en los pacientes con leucemia aguda.
- Analizar la eficiencia de la utilización de la NGS en el diagnóstico de los pacientes con leucemia aguda.
- Valorar cuáles son las barreras, valores y preferencias para implementar la NGS en el diagnóstico de pacientes con leucemia aguda.

# III. Metodología

## III.1. Definición de las preguntas de investigación en formato PICO

Como paso previo a la búsqueda, se formularon las preguntas de investigación en el formato PICO (Población, Intervención, Comparador, Outcomes/Resultados y diseño de los estudios a incluir).

**Pregunta 1:** En pacientes con sospecha de leucemia aguda (tanto linfoblástica como mieloide), ¿la NGS identifica de forma más precisa las mutaciones genéticas más importantes para el diagnóstico y clasificación de los pacientes con leucemia aguda?

| Descripción               | Alcance   |
|---------------------------|---|
| <b>Población</b>          | Pacientes con sospecha de leucemia aguda (tanto linfoblástica como mieloide, en niños y adultos)  |
| <b>Intervención</b>       | NGS (secuenciación de genoma, exoma, paneles de genes...) para la detección de mutaciones genéticas con impacto clínico en el diagnóstico y pronóstico del paciente |
| <b>Comparación</b>        | Secuenciación Sanger, citogenética convencional y molecular   |
| <b>Resultados</b>         | S, E, VPP, VPN para los diferentes tipos de alteraciones genéticas<br>Reclasificación de los pacientes en los grupos de riesgo                                      |
| <b>Diseño de estudios</b> | Informes de evaluación de tecnologías sanitarias, revisiones sistemáticas de estudios diagnósticos, estudios de pacientes consecutivos                              |

Aunque la pregunta PICO incluye tanto a pacientes con leucemia linfoblástica aguda como a pacientes con leucemia mieloide aguda, cuando sea posible, los resultados serán separados por tipo de enfermedad y por grupo de edad (pediátrica y adulta).

**Pregunta 2:** En pacientes con sospecha de leucemia aguda (tanto leucemia linfoblástica aguda como leucemia mieloide aguda), añadir la NGS cambia los desenlaces de los pacientes?

| Descripción      | Alcance  |
|------------------|--|
| <b>Población</b> | Pacientes con sospecha de leucemia aguda (tanto linfoblástica como mieloide, en niños y adultos) |

| Descripción               | Alcance  |
|---------------------------|--|
| <b>Intervención</b>       | NGS (secuenciación de genoma, exoma, paneles de genes...)  |
| <b>Comparación</b>        | Secuenciación Sanger, citogenética convencional y molecular  |
| <b>Resultados</b>         | Aumento de supervivencia, disminución de toxicidad, mejor calidad de vida...   |
| <b>Diseño de estudios</b> | Informes de evaluación de tecnologías sanitarias, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos (con o sin metaanálisis), ensayos clínicos aleatorizados |

## III.2. Definición del marco de evaluación

Para este informe se ha seguido parte del esquema señalado por Pitini *et al.* (36), que hace referencia al marco de la genética y genómica, y que divide el análisis en cuatro secciones principales:

1. La validez analítica, validez clínica, utilidad clínica y utilidad personal.
2. Modelo de prestación (aspectos organizacionales, evaluación económica, implicaciones éticas, legales y sociales, y perspectiva del paciente).
3. Prioridades de investigación.
4. Puntos de decisión (sobre el beneficio neto, el coste-efectividad y la factibilidad).

Para este informe, nos hemos centrado en los primeros dos puntos: en el análisis de la validez analítica, clínica, utilidad clínica y personal, así como en el análisis de cómo podría ser el modelo de prestación. No se ha profundizado en los dos siguientes puntos.

### III.2.1. Validez analítica, validez clínica, utilidad clínica y utilidad personal

La validez analítica es la precisión con la que una característica genética particular, como una variante en la secuencia del ADN o la delección de un cromosoma específico, es identificada por la prueba en cuestión. Se trata de evaluar el rendimiento de una prueba en el laboratorio, e incluye comúnmente la evaluación de la S analítica, la E analítica, la precisión y exactitud, la robustez y el control de calidad del laboratorio.

La validez clínica evalúa la habilidad de una prueba diagnóstica para detectar o predecir con exactitud y de forma fiable la condición clínica, y

consta de dos partes: la evaluación de la validez científica (existencia de evidencia sobre la asociación entre el biomarcador y la enfermedad) y del rendimiento de la prueba (grado en el que las variantes pueden distinguir entre aquellos que desarrollarán la condición clínica de aquellos que no). La evaluación del rendimiento se realiza en términos de S, E, VPP y VPN y de los factores que pueden influir, como la prevalencia o la penetrancia, etc.

La utilidad clínica se refiere al impacto en la salud de una prueba genética en términos de riesgos y beneficios (mortalidad, morbilidad o discapacidad), debido a las intervenciones adoptadas en base a los resultados de la prueba y de los riesgos, que dependerá a su vez de la disponibilidad de tratamientos eficaces y seguros.

La utilidad personal incluye un amplio rango de razones personales por las que realizarse la prueba y en los efectos personales que esto tiene. No lleva directamente a mejorar los resultados en salud, pero sí tiene un efecto sobre el estado general de los pacientes (conocimiento de su condición, planificación reproductiva y familiar etc.).

## III.2.2. Modelos de prestación

Se trata del contexto amplio en el que se va a ofrecer la prueba genética: se debe definir cuál va a ser la prueba y en qué población se va a aplicar, el nivel de atención sanitaria en el que se va a ofrecer (en oncología, genética, pediatría...) y cómo va a ser la vía que va a seguir el paciente (desde el punto de acceso a la prueba genética hasta el diagnóstico y tratamiento).

En este informe, no se llega a profundizar tanto, pero sí se han valorado los cuatro aspectos que se incluyen en este apartado mediante el estudio de las barreras, valores y preferencias para la implementar la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas.

### III.2.2.1. Aspectos organizacionales

Se trata de valorar la demanda que se espera y los recursos necesarios para implementar el programa de salud relacionado y otros requerimientos, como la educación de los profesionales, diseminación de información, procesos que aseguren el acceso a todos los colectivos (áreas remotas, grupos de población especiales), etc.

En base a ese análisis, se describen las principales barreras a la implementación de la prueba en cuestión.

### III.2.1.2. Evaluación económica

Se valora la cantidad y calidad de la evidencia sobre el coste-efectividad y coste-utilidad para las pruebas alternativas, valorando lo siguiente: tipo de evaluación económica, comparador, perspectiva del análisis, y otros aspectos a valorar en los estudios económicos.

### III.2.1.3. Implicaciones éticas, legales y sociales

Se provee de un resumen de los aspectos relacionados con la prueba genética a evaluar, así como su relación con la autonomía del paciente, la equidad, la privacidad y confidencialidad de la información genética, impacto psicosocial, etc.

### III.2.1.4. Perspectiva del paciente

Se pueden utilizar estudios cualitativos o cuantitativos para conocer las experiencias, creencias y expectativas de los pacientes que viven con la condición y que utilizan un servicio genético.

## III.3. Revisión sistemática de la evidencia científica

### III.3.1. Definición de las medidas de resultado a evaluar

Partiendo de un informe reciente (37) se han tenido en cuenta los siguientes desenlaces de interés a la hora de aplicar la NGS en el diagnóstico de pacientes con leucemia aguda:

Medidas de resultado para validez analítica:

- S y E analítica.
- Limite de detección.
- Reproducibilidad.

Desenlaces de interés para la validez clínica:

- Número y tipo de mutaciones detectadas.
- Efectividad diagnóstica: S y E.

- Detección de diana terapéutica y elección de tratamiento personalizado.
- Modificaciones del diagnóstico inicial o de la categoría de riesgo.
- Cambio en las decisiones terapéuticas o en el manejo de los pacientes.
- Tiempo requerido para ofrecer los resultados por cada prueba.

Desenlaces de interés para la utilidad clínica:

- Mortalidad, supervivencia global, supervivencia libre de progresión tumoral y calidad de vida.
- De seguridad: complicaciones asociadas a la técnica de obtención de la muestra, toxicidad del tratamiento, toxicidad evitada por descartar un tratamiento no efectivo, toxicidad o complicaciones debidas al posible retraso en el inicio del tratamiento en espera de los resultados de NGS.

### III.3.2. Formulario de recogida y extracción de datos de los estudios

#### III.3.2.1. Estudios sobre validez y utilidad de la NGS en leucemias agudas

Se ha diseñado un formulario para recoger los datos de interés de los estudios seleccionados, que incluye:

- Características generales del estudio: autor principal y año de publicación, país de realización del estudio, diseño, uni o multicéntrico, tiempo de seguimiento, criterios de inclusión y exclusión.
- Características de la población: número de pacientes, edad, sexo, tipo de leucemia.
- Características del proceso de NGS utilizado y de las técnicas convencionales: tipo de muestra, tiempo desde la extracción de la muestra hasta la realización de los tests diagnósticos, tiempo desde el análisis de la muestra hasta el resultado del test, tipo de secuenciación, número de genes incluidos, plataforma utilizada, tests convencionales con los que se comparan los resultados.
- Desenlaces de interés:
  - Número de pacientes con alteraciones intervenibles, número y tipo (amplificaciones, deleciones, inserciones, fusiones, reordenamientos, truncamientos o sustituciones) de alteraciones detectadas, trata-

mientos propuestos por la NGS, concordancia entre las alteraciones detectadas frente a técnicas convencionales, S y E para cada tipo de mutación.

- **Influencia en el manejo clínico del paciente:** cambio (%) de pacientes en los que las NGS modificaron el diagnóstico o la clasificación de riesgo, cambio (%) del tratamiento previsto por otro indicado por la NGS; aumento de supervivencia o de tiempo libre de enfermedad por los resultados de la NGS, menor toxicidad o efectos adversos, mejor calidad de vida etc.

### III.3.2.2. Estudios sobre barreras, valores y preferencias sobre NGS en leucemias agudas

En este caso, se ha realizado una descripción narrativa de los resultados obtenidos que hacen referencia tanto a las barreras de implementar la NGS como a los valores y preferencias de los diferentes grupos de interés al respecto.

### III.3.2.3. Estudios sobre eficiencia de la NGS en leucemias agudas

Para la extracción de datos se utilizó el formulario propio de la herramienta Fichas de Lectura Crítica (FLC 3.0) desarrollada por el Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco, Osteba (39). En el mismo se recogieron las variables consideradas más importantes de acuerdo con los objetivos generales y específicos señalados en el apartado correspondiente.

El formulario recopiló los siguientes datos:

- **Datos generales:** autores, fecha de publicación, localización y periodo de realización, tipo de evaluación y objetivo del estudio.
- **La pregunta de investigación y la metodología:** población, tipo de intervención, tipo de comparador, efectividad, costes, perspectiva del análisis, horizonte temporal, tasa de descuento, modelo y análisis de Sensibilidad.
- **Los resultados:** desenlaces de efectividad y de costes, desenlaces incrementales, ratio coste-eficacia incremental (RCEI) y análisis de S.

### III.3.3. Estrategia de búsqueda

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica estructurada para la identificación de estudios sobre la validez y utilidad de la NGS para el diagnóstico de las leucemias agudas en las siguientes bases de datos de literatura médica:

- Bases de datos especializadas en revisiones sistemáticas: Cochrane Library.
- Bases de datos generales: Medline (PubMed) y Embase (OvidWeb).

La búsqueda fue ejecutada en octubre de 2021. La estrategia incluía, entre otros, los siguientes términos en lenguaje libre y controlado: *High-Throughput Nucleotide Sequencing* y *Leukemia*. Los estudios se limitaron a aquellos publicados desde 2015, fecha de búsqueda de un informe anterior de la agencia UETS (38), y cuyo idioma fuera inglés o castellano. La estrategia de búsqueda se adaptó a cada una de las bases de datos siguiendo las estructuras detalladas que se pueden consultar en el Anexo I.

Este proceso se completó con una consulta en el metabuscador Google y con la revisión manual de las referencias de los trabajos incluidos con la finalidad de localizar estudios no recuperados en las búsquedas automatizadas que pudiera ser de interés.

Se realizó una actualización de la búsqueda en las bases de datos principales (Medline y Embase), con el objetivo de identificar nuevos estudios que se publicasen antes de la edición de este documento.

Además, se ha realizado una búsqueda de estudios sobre las barreras y facilitadores, así como los valores de los profesionales y pacientes derivado del uso de esta técnica en las bases de datos Medline (Pubmed), Embase (OvidWeb), Cochrane Library y Cinahl (EBSCOhost), mediante el empleo de términos y filtros específicos, sin limitación temporal y para aquellos estudios cuyo idioma fuera inglés o castellano (ver Anexo I). Este proceso se completó con una consulta en el metabuscador Google y con la revisión manual de las referencias de los trabajos incluidos con la finalidad de localizar estudios no recuperados en las búsquedas automatizadas que pudiera ser de interés.

Por último, para dar respuesta a las consideraciones económicas de la tecnología, se ha llevado a cabo una revisión para la identificación de estudios de costes y económicos en las principales bases de datos de estudios económicos: NHS EED (*National Health Service Economic Evaluation Database*) y *Cost-Effectiveness Analysis (CEA) Registry*. Asimismo, se han buscado estudios en las bases de datos generales, Medline y Embase, mediante el empleo de términos y filtros económicos (ver Anexo I).

Los resultados de la búsqueda fueron volcados en un gestor de referencias bibliográficas (Reference Manager). Posteriormente, dichos archivos se exportaron a la aplicación online Rayyan para facilitar la lectura por pares de los artículos identificados.

### III.3.4. Criterios de inclusión y exclusión de estudios

La selección de los estudios potencialmente relevantes fue realizada por dos técnicos de evaluación de tecnologías sanitarias (ETS) de manera independiente, conforme a los criterios de inclusión y exclusión establecidos en el protocolo del estudio y en base a la pregunta de investigación, resolviendo por consenso los posibles desacuerdos.

#### III.3.4.1. Validez y utilidad de la NGS en el diagnóstico de leucemias agudas

##### Criterios de inclusión

- Tipo de participantes: pacientes con leucemia aguda.
- Tipos de intervención: NGS.
- Tipos de comparador: secuenciación convencional, citogenética, CGH *arrays*.
- Tipos de medidas de resultado: validez analítica, validez clínica (rendimiento diagnóstico por S, E, VPP...) y utilidad clínica de la NGS (mortalidad, tasa de recaída, supervivencia...).
- Tipos de estudios:
  - Informes de ETS.
  - Para validez clínica: revisiones sistemáticas (RS) de estudios diagnósticos, estudios de pacientes consecutivos (prospectivos o retrospectivos).
  - Para utilidad clínica: RS de ensayos clínicos, ensayos clínicos.

##### Criterios de exclusión

- Estudios que no comprueben los resultados de la NGS con alguna prueba de referencia (secuenciación convencional y citogenética).
- Estudios realizados en diferentes tipos de enfermedad oncohematológica que no den los resultados desagregados por patología.
- Estudios que describan los resultados en función del número de muestras y no en función del número de pacientes.

### III.3.4.2. Eficiencia de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas

#### Criterios de inclusión

- Tipo de participantes: pacientes con leucemia aguda.
- Tipos de intervención: NGS.
- Tipos de comparador: secuenciación convencional (método Sanger), citogenética, CGH *arrays*.
- Tipos de medidas de resultado: los estudios tenían que informar sobre los costes de las técnicas o su efectividad incremental, coste incremental y RCEI.
- Tipos de estudios: estudios de costes y evaluación económica (EE) completos (estudios coste-efectividad, coste-utilidad, coste-beneficio, coste-consecuencia y de minimización de costes), incluyéndose tanto evaluaciones económicas completas desarrolladas en paralelo a estudios primarios (por ejemplo, ensayos clínicos) como modelos económicos.
- Idiomas de publicación: estudios publicados en inglés, francés o español.

#### Criterios de exclusión

- RS de EE.
- Protocolos de estudios sin resultados, resúmenes de congresos, cartas al editor, artículos de discusión o editoriales.

### III.3.4.3. Barreras, valores y preferencias con relación a la NGS en leucemias agudas

#### Criterios de inclusión

- Tipo de participantes: pacientes con leucemia aguda.
- Tipos de intervención: NGS.
- Tipos de comparador: secuenciación convencional (método Sanger), citogenética, CGH *arrays* o ninguno.
- Tipos de medidas de resultado: los estudios tenían que informar sobre las barreras y los facilitadores que se encuentran los grupos de interés a la hora de implementar la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas, así como de los valores y preferencias, tanto de los pacientes con leucemia aguda como de los profesionales sanitarios que se im-

plican en el diagnóstico y manejo de estos pacientes, relacionados con el uso de la NGS.

- Tipos de estudios: RS, revisiones narrativas, estudios descriptivos (tipo cuestionario) o cualitativos.
- Idiomas de publicación: estudios publicados en inglés, francés o español.

### III.3.5. Evaluación de la calidad de los estudios identificados y de la evidencia

Tanto el proceso de identificación de riesgo de sesgos, como el de la extracción de datos y el de la evaluación de la evidencia de los estudios incluidos fue realizado por dos investigadores de forma ciega e independiente. En caso de discrepancias, se solicitó la participación de un tercer evaluador.

#### III.3.5.1. Validez analítica, clínica y utilidad clínica (Marco EGAPP)

Pitini *et al.* (36) no señalan con qué herramientas valorar la calidad de los estudios y de la evidencia identificada para cada uno de los aspectos a evaluar. Por ello, se han seguido los criterios propuestos en el marco Evaluación de Aplicaciones Genómicas en la Práctica y Prevención (EGAPP en inglés) (40).

| Level <sup>a</sup> | Analytic validity   | Clinical validity  | Clinical utility  |
|--------------------|---|--|---|
| 1                  | Collaborative study using a large panel of well characterized samples<br><br>Summary data from well-designed external proficiency testing schemes or interlaboratory comparison programs      | Well-designed longitudinal cohort studies<br><br>Validated clinical decision rule <sup>b</sup>   | Meta-analysis of randomized controlled trials (RCT)   |
| 2                  | Other data from proficiency testing schemes<br><br>Well-designed peer-reviewed studies (e.g., method comparisons, validation studies)<br><br>Expert panel reviewed FDA summaries              | Well-designed case-control studies   | A single randomized controlled trial  |
| 3                  | Less well designed peer-reviewed studies  | Lower quality case-control and cross-sectional studies<br><br>Unvalidated clinical decision rule <sup>b</sup>  | Controlled trial without randomization<br><br>Cohort or case-control study  |
| 4                  | Unpublished and/or non-peer reviewed research, clinical laboratory, or manufacturer data<br><br>Studies on performance of the same basic methodology, but used to test for a different target | Case series<br><br>Unpublished and/or non-peer reviewed research, clinical laboratory or manufacturer data<br><br>Consensus guidelines<br><br>Expert opinion | Case series<br><br>Unpublished and/or non-peer reviewed studies<br><br>Clinical laboratory or manufacturer data<br><br>Consensus guidelines<br><br>Expert opinion |

<sup>a</sup>Highest level is 1.

<sup>b</sup>A clinical decision rule is an algorithm leading to result categorization. It can also be defined as a clinical tool that quantifies the contributions made by different variables (e.g., test result, family history) in order to determine classification/interpretation of a test result (e.g., for diagnosis, prognosis, therapeutic response) in situations requiring complex decision-making.<sup>35</sup>

**Figura 14.** Nivel de evidencia por diseño de estudio para cada componente de evaluación del marco EGAPP (40).

En la figura 14 se muestra el nivel de evidencia que puede proporcionar un diseño de estudio determinado para cada uno de los componentes de la evaluación, y en la figura 15, los criterios para valorar la calidad de los estudios individuales para cada componente (validez interna). En la figura 16, se muestra la calidad de la evidencia general según el tipo de estudios identificado para cada uno de los componentes.

Table 4 Criteria for assessing quality of individual studies (internal validity)<sup>55</sup>

| Analytic validity  | Clinical validity  | Clinical utility  |
|--|--|---|
| <i>Adequate descriptions of the index test (test under evaluation)</i>   | <i>Clear description of the disorder/phenotype and outcomes of interest</i>              | <i>Clear description of the outcomes of interest</i>  |
| Source and inclusion of positive and negative control materials  | Status verified for all cases  | What was the relative importance of outcomes measured; which were prespecified primary outcomes and which were secondary? |
| Reproducibility of test results  | Appropriate verification of controls   | <i>Clear presentation of the study design</i>   |
| Quality control/assurance measures   | Verification does not rely on <i>index test</i> result                                   | Was there clear definition of the specific outcomes or decision options to be studied (clinical and other endpoints)?     |
| <i>Adequate descriptions of the test under evaluation</i>  | Prevalence estimates are provided  | Was interpretation of outcomes/endpoints blinded?   |
| Specific methods/platforms evaluated   | <i>Adequate description of study design and test/methodology</i>                         | Were negative results verified?   |
| Number of positive samples and negative controls tested  | <i>Adequate description of the study population</i>                                      | <i>Was data collection prospective or retrospective?</i>  |
| <i>Adequate descriptions of the basis for the "right answer"</i>   | Inclusion/exclusion criteria   | If an experimental study design was used, were subjects randomized? Were intervention and evaluation of outcomes blinded? |
| Comparison to a "gold standard" referent test  | Sample size, demographics  | Did the study include comparison with current practice/empirical treatment (value added)?                                 |
| Consensus (e.g., external proficiency testing)   | Study population defined and representative of the clinical population to be tested      | <i>Intervention</i>   |
| Characterized control materials (e.g., NIST, sequenced)  | Allele/genotype frequencies or analyte distributions known in general and subpopulations | What interventions were used?   |
| <i>Avoidance of biases</i>   | <i>Independent blind comparison with appropriate, credible reference standard(s)</i>     | What were the criteria for the use of the interventions?  |
| Blinded testing and interpretation   | Independent of the test  | <i>Analysis of data</i>   |
| Specimens represent routinely analyzed clinical specimens in all aspects (e.g., collection, transport, processing) | Used regardless of test results  | Is the information provided sufficient to rate the quality of the studies?  |
| Reporting of test failures and uninterpretable or indeterminate results  | Description of handling of indeterminate results and outliers                            | Are the data relevant to each outcome identified?   |
| <i>Analysis of data</i>  | Blinded testing and interpretation of results  | Is the analysis or modeling explicit and understandable?  |
| Point estimates of analytic sensitivity and specificity with 95% confidence intervals                              | <i>Analysis of data</i>  | Are analytic methods prespecified, adequately described, and appropriate for the study design?                            |
| Sample size/power calculations addressed   | Possible biases are identified and potential impact discussed                            | Were losses to follow-up and resulting potential for bias accounted for?  |
|  | Point estimates of clinical sensitivity and specificity with 95% confidence intervals    | Is there assessment of other sources of bias and confounding?   |
|  | Estimates of positive and negative predictive values                                     | Are there point estimates of impact with 95% CI?  |
|  |  | Is the analysis adequate for the proposed use?  |

NIST, National Institute of Standards and Quality.

**Figura 15.** Criterios para valorar la calidad de los estudios individuales para cada uno de los componentes (validez interna) del marco EGAPP (40).

**Table 5** Grading the quality of evidence for the individual components of the chain of evidence (key questions)<sup>57</sup>

| Adequacy of information to answer key questions | Analytic validity   | Clinical validity  | Clinical utility   |
|---|---|--|--|
| Convincing                                      | <i>Studies that provide confident estimates of analytic sensitivity and specificity using intended sample types from representative populations</i> | <i>Well-designed and conducted studies in representative population(s) that measure the strength of association between a genotype or biomarker and a specific and well-defined disease or phenotype</i> | <i>Well-designed and conducted studies in representative population(s) that assess specified health outcomes</i>   |
|   | Two or more Level 1 or 2 studies that are generalizable, have a sufficient number and distribution of challenges, and report consistent results     | Systematic review/meta-analysis of Level 1 studies with homogeneity  | Systematic review/meta-analysis of randomized controlled trials showing consistency in results<br>At least one large randomized controlled trial (Level 2) |
|   | One Level 1 or 2 study that is generalizable and has an appropriate number and distribution of challenges   | Validated Clinical Decision Rule<br>High quality Level 1 cohort study  |  |
| Adequate  | Two or more Level 1 or 2 studies that   | Systematic review of lower quality studies   | Systematic review with heterogeneity   |
|   | Lack the appropriate number and/or distribution of challenges   | Review of Level 1 or 2 studies with heterogeneity  | One or more controlled trials without randomization (Level 3)  |
|   | Are consistent, but not generalizable   | Case/control study with good reference standards   | Systematic review of Level 3 cohort studies with consistent results  |
|   | Modeling showing that lower quality (Level 3, 4) studies may be acceptable for a specific well-defined clinical scenario                            | Unvalidated Clinical Decision Rule (Level 2)   |  |
| Inadequate                                      | Combinations of higher quality studies that show important unexplained inconsistencies  | Single case-control study<br>Nonconsecutive cases  | Systematic review of Level 3 quality studies or studies with heterogeneity   |
|   | One or more lower quality studies (Level 3 or 4)  | Lacks consistently applied reference standards<br>Single Level 2 or 3 cohort/case-control study  | Single Level 3 cohort or case-control study  |
|   | Expert opinion  | Reference standard defined by the test or not used systematically  | Level 4 data   |
|   |   | Study not blinded  |  |
|   |   | Level 4 data   |  |

**Figura 16.** Calidad de la evidencia general según el tipo de estudios identificado para cada componente del marco EGAPP (40).

En este caso, se ha realizado la lectura crítica de los estudios incluidos siguiendo los criterios de evaluación propuestos en la Figura 15. Se han elaborado tablas de estudios individuales y se ha realizado una descripción narrativa de los principales resultados de cada estudio.

Se valoró si los estudios evaluaban la validez analítica, clínica (rendimiento diagnóstico) o la utilidad clínica, es decir, si la utilización de la NGS mejoraba el diagnóstico o la estratificación del riesgo de los pacientes, así como los desenlaces clínicos del paciente. No se consideró la evaluación de la validez científica de los genes que se secuenciaban en cada estudio, aunque estos sí deberían incluir como mínimo las alteraciones genéticas que ayudan a diagnosticar y estratificar al paciente con leucemia aguda (tanto LMA como LLA).

### III.3.5.2. Eficiencia de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas

Para la evaluación de la calidad de la evidencia de los estudios sobre la eficiencia de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas se empleó la herramienta FLC 3.0 (39). Esta evaluación fue realizada de forma independiente por dos revisores, y las discrepancias se resolvieron por consenso.

### III.3.5.3. Barreras, valores y preferencias sobre la NGS y su implementación

Se decidió que en caso de identificar estudios cualitativos o cuantitativos sobre las barreras en la implementación de la NGS para el diagnóstico de las leucemias agudas, o sobre los valores y preferencias de profesionales y pacientes en los que sería utilizada la NGS, los resultados serían descritos de forma narrativa. Si fuera oportuno, éstos serían tenidos en cuenta en la valoración de los aspectos organizativos, éticos y legales relacionados con la NGS, así como su impacto en la utilidad personal (41) de la NGS para los pacientes con leucemia aguda.

## III.4. Proceso de revisión interna y externa

El borrador inicial del informe fue revisado de forma interna por todos los autores. Una vez consensuado el documento y obtenido el visto bueno, se envió a revisión externa por parte de profesionales sanitarios de diferentes áreas, así como por organizaciones de pacientes con leucemia aguda, tanto pediátrica como adulta. Los comentarios recibidos fueron discutidos y se realizaron las modificaciones que se consideraron oportunas en el informe.

# IV. Resultados

## IV.1. Resultados de las búsquedas realizadas

### IV.1.1. Validez y utilidad de la NGS

La búsqueda realizada en relación con la validez y utilidad de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas proporcionó un total de 1.453 referencias potencialmente relevantes.

De esas 1.453 referencias, 1.386 fueron descartadas (1.137 por no responder a la pregunta PICO (no era la población diana, no evaluaba la NGS en el diagnóstico, no la comparaban con técnicas convencionales o abordaban otras PICO diferentes) y 249 por ser revisiones narrativas o de tipo background).

De los 67 estudios preseleccionados, un estudio era el artículo de la nueva revisión de la clasificación de la OMS para las neoplasias mieloides y leucemias agudas (42) y otra referencia era la guía de ESMO para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes adultos con LMA (43). Entre las 65 referencias restantes, leídas a texto completo, se descartaron 31. Entre éstas:

- 17 estudios que describen el perfil mutacional de los pacientes mediante NGS, sin comprobar los resultados mediante técnicas convencionales (44-58), o el perfil mutacional de un subgrupo de pacientes con LMA y mutación doble en CEPBA, validando solo una muestra aleatoria (59), o nuevas reordenaciones de un gen en concreto o genes de fusión (60).
- Cuatro estudios investigan o describen nuevas categorías de riesgo (61) o escalas de riesgo para clasificar a los pacientes (62-64).
- Tres estudios se centran en el estudio de la clonalidad por NGS (65-67).
- Un estudio compara los resultados obtenidos con los resultados de otro panel, no con técnicas convencionales (68).
- En otros dos estudios no se evalúa la validez analítica del panel customizado (69, 70).
- Dos estudios que se centran en el uso de diferentes *pipelines* bioinformáticos para mejorar el proceso de identificación de variantes genéticas (71, 72).
- Dos estudios evalúan la tecnología nCounter® de NanoString (73, 74) para la detección de genes de fusión en pacientes con leucemia aguda (73) o cáncer en general (74).

Finalmente, se han incluido 34 estudios en este informe. De estos, solo cinco comparan los resultados de más de un laboratorio (75-79); en los 29 restantes, sólo participa un centro por estudio, siendo 14 (80-93) los que se centran en la evaluación de la NGS de ADN, 10 estudios (94-103) los que evalúan la NGS de ARN y 5 los que evalúan la NGS tanto de ARN como ADN (104-108), aunque dos de estos lo hacen en el mismo panel de secuenciación (106, 108), otros dos combinan la secuenciación de ARN con el del genoma completo en baja cobertura (104, 105) y el último, compara la secuenciación del transcriptoma con el del exoma para disminuir el número de variantes a evaluar en pacientes con LMA (107).

En relación a la secuenciación masiva de ADN, dos estudios realizan la secuenciación completa de ADN de baja cobertura (104, 105) (aunque Mack *et al.* (105) también utilizan un panel de NGS para ADN), un estudio compara la secuenciación del exoma junto con la de un panel dirigido de genes para la detección de alteraciones del número de copia (CNAs en inglés) (88) y 15 (80-87, 89-93, 106, 108) evalúan paneles de genes centrados en determinar el estado mutacional del ADN de las células tumorales.

En referencia al ARN, solo dos estudios (104, 107) realizan la secuenciación masiva de todo el transcriptoma (aunque Hansen *et al.* (107) lo utiliza para compararlo con la NGS del exoma como estrategia para disminuir el número de variantes a analizar), siendo 10 los estudios que utilizan paneles para la secuenciación de ARN (94-103).

En algunos casos, los autores se centran en la validez analítica de la NGS para detectar mutaciones en genes específicos, como la FLT3-ITD (84) o el gen de fusión BCR-ABL1 en pacientes con LLA tipo Ph+ (95, 96, 101).

En cuanto al tipo de paciente incluido, un estudio abarca diferentes tipos de tumores (106), puesto que incluye niños con diferentes cánceres, entre los que se encuentran las leucemias agudas (106). Dos estudios incluyen pacientes con neoplasias hematológicas (97, 102), siete estudios pacientes con neoplasias mieloides (80-83, 90, 91, 108). Cuatro estudios incluyen pacientes con LMA o LLA (85, 98, 99, 102); ocho incluyen solo pacientes con LMA (69, 81, 84, 87, 88, 93, 104, 105), siendo uno en LMA citogenéticamente normal (107) y otro en LMA del tipo NPM1mut/FLT3-ITDneg (81). En el caso de LLA, se han identificado nueve estudios (86, 89, 92, 94-96, 100, 101, 103), aunque de estos uno incluye solo LLA de tipo Ph+like (sin fusiones mutuamente excluyentes y sin CRLAr por FISH) (94), tres incluyen pacientes con LLA Ph+ (86, 95, 96), siendo pacientes pediátricos para el estudio de Aoe M *et al.* (86). El último incluye pacientes con LLA para los que no se habían detectado genes de fusión por métodos convencionales (100).

Sin embargo, la mayoría de estos estudios no evalúan la validez externa de los métodos de NGS utilizados. Solo se identificaron cinco artículos que incluyen más de un centro en la evaluación de la NGS, donde se comparan los resultados obtenidos al secuenciar las mismas muestras en diferentes laboratorios que: 1) utilizan el mismo panel y la misma plataforma de secuenciación, buscando valorar la concordancia inter-laboratorio (75); 2) utilizan cada uno la plataforma y el panel de genes que más les conviene y se evalúa si cada laboratorio detecta todas las variantes (76); o 3) comparan el rendimiento de diferentes paneles de genes en diferentes centros (77-79).

De estos cinco estudios, tres se centran en LMA (75-77), uno en neoplasias mieloides (79) y el último estudio en la LLA pediátrica (78).

Cabe señalar que, de estos cinco estudios, tres fueron realizados en centros españoles (76, 78, 79).

En el Anexo II se presenta el diagrama de flujo que resume el proceso de selección de artículos sobre validez y utilidad de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas y en el Anexo III, el listado de artículos excluidos en el cribado a texto completo y las principales razones de exclusión.

#### IV.1.2. Estudios de costes relacionados con la NGS en leucemias agudas

La búsqueda genérica realizada en las bases de datos electrónicas identificó 182 estudios como potencialmente relevantes, una vez eliminados los duplicados. Excluidos aquellos que no cumplieron con los criterios de tipo de estudio e idioma, se seleccionaron 162 referencias para su lectura por título y resumen. Tras una lectura detallada de los mismos, se identificaron tres estudios para su lectura a texto completo, que finalmente no fueron seleccionados para el análisis de costes de la NGS en leucemias agudas.

En el Anexo II se presenta el diagrama de flujo, y en el Anexo III la relación de los artículos excluidos en el cribado a texto completo y las razones principales para su exclusión.

### IV.1.3. Barreras, valores y preferencias con relación a la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas

La búsqueda sobre barreras, valores y preferencias produjo un total de 923 referencias potencialmente relevantes, aunque 916 fueron descartadas porque no abordaban ninguno de los criterios de interés. El diagrama de flujo se encuentra en el Anexo II.

De las siete referencias preseleccionadas para su lectura a texto completo, no se identificó ningún estudio cualitativo o cuantitativo sobre las barreras, los valores o las preferencias sobre la NGS en el diagnóstico de la leucemia aguda, aunque sí se identificó una revisión narrativa acerca de los retos para la introducción de la NGS en el diagnóstico de neoplasias mieloides en la clínica rutinaria (115). De las seis referencias restantes, en dos de los estudios (identificados también en la búsqueda sobre validez externa de la NGS), los autores incluían algunos aspectos a tener en cuenta para la implementación fiable de la NGS en diferentes laboratorios (76, 78).

De forma adicional, se han tenido en cuenta los aspectos comentados en el marco de evaluación para test genéticos de National Academies of Sciences, Engineering and Medicine (NASEM) (41) en relación con la implicación de los aspectos éticos, legales y sociales en la evaluación de las pruebas genéticas.

En la búsqueda manual se identificaron tres referencias que, aunque no se centraban en leucemia aguda, abordaban algunos aspectos relacionados con las barreras de implementación del diagnóstico molecular en general en la práctica clínica (114), opiniones y valores de pacientes con cáncer y de los profesionales que se ocupan del manejo de estos pacientes (112, 113).

## IV.2. Análisis de la evidencia disponible

### IV.2.1. Estudios sobre validez y utilidad de la NGS

#### IV.2.1.1. Estudios que combinan al NGS de ADN y ARN

Dos estudios (104, 105) combinan la secuenciación masiva de ADN con la del ARN, valorando la utilidad de la NGS no solo para la detección de CNV, sino también de polimorfismo de nucleótido único (SNP en inglés),

*indels* y genes de fusión (104, 105). En ambos estudios, se combina la secuenciación de baja cobertura del genoma completo (LC-WGS en inglés) para detectar CNV con la del ARN, aunque en un caso se secuencia todo el transcriptoma (104) y en el otro se utiliza además de un panel de NGS para genes de fusión otro para el análisis de variantes de ADN (105).

En el estudio de Mareshal S *et al.* (104) los autores utilizan una combinación de dos técnicas basadas en NGS, la secuenciación superficial del genoma completo (sWGS en inglés) y la secuenciación del transcriptoma completo (WTS en inglés), que denominan cariotipo por NGS, para identificar CNV y traslocaciones en 281 pacientes con LMA, y comparan los resultados con los de la citogénica convencional (CCA en inglés).

Los autores señalan que la comparación de la sWGS con el análisis CCA es un reto, porque muchas aberraciones reportadas en CCA corresponden a múltiples segmentos en sWGS. Las dos técnicas describieron 672 aberraciones, incluyendo 298 (44 %) coincidentes y 266 (40 %) identificadas por una única de las técnicas, excluyendo 108 (16 %) aberraciones incomparables. De las 118 aberraciones detectadas solo por sWGS, 62 (52 %) eran más cortas que las detectadas por CCA. De las 148 aberraciones encontradas solo por CCA, 70 (47,3 %) eran reordenaciones balanceadas o incluían cromosomas sexuales, por lo que no eran detectadas por sWGS y 37 (25 %) eran subclonales y difíciles de detectar por sWGS. Estas observaciones redujeron el porcentaje de desacuerdos claros entre las dos técnicas.

Ambas técnicas reportaron algunas aberraciones no confirmadas por la otra técnica (18 y 13 para sWGS y CCA, respectivamente), realizándose FISH en 23 de las mismas. En 17 casos se confirmó el resultado de la sWGS y solo en dos de la CCA. Así, el grado de acuerdo entre CCA y cariotipado de próxima generación (NGK en inglés) fue alto (96 %).

En cuanto a la detección de genes de fusión, de las 74 filtradas, 30 formaban parte de la clasificación European LeukemiaNet (ELN), y seis eran fusiones PML-RARA que definen la leucemia promielocítica aguda (APL en inglés). Ni la t(6;9) ni la t(9;22) pudieron ser identificadas, con frecuencias reportadas de 0,7 % y 0,9 %, mientras que las otras cuatro fusiones definidas en ELN sí lo fueron. Con la WTS se identificaron 10 fusiones no definidas por ELN, pero potencialmente relevantes y descritas en LMA.

La concordancia entre el CCA y la WTS fue del 99,4 % para la detección de criterios ELN basados en translocaciones. La WTS tenía mayor S para identificar las inv(16) y reordenaciones KMT2A, mientras presentaba limitaciones en la detección de fusiones PML-RARA de baja expresión. Los

resultados fueron validados mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR en inglés), demostrando que la WTS es un método rápido y fiable para la detección de fusiones. Para todos los criterios de la ELN relacionados con CNA fue del 94 %.

En total, de los 281 pacientes, solo 17 cambiaron de grupo de riesgo: seis de los pacientes que presentaban un riesgo intermedio cambiaron al grupo de más riesgo; uno de los pacientes con riesgo intermedio cambió al grupo de riesgo favorable; siete pacientes del grupo de riesgo adverso cambiaron al grupo de riesgo intermedio; y un paciente de riesgo adverso cambió al grupo de riesgo favorable (104). En este estudio, no se identificaron diferencias significativas en la habilidad de la CCA y la NGK para identificar grupos con distinto pronóstico utilizando los criterios de ELN. También se estimó el coste relativo en tiempo y dinero de la NGS en comparación con la CCA convencional. Así, en Estocolmo, país en el que se llevó a cabo el estudio, el tiempo que se necesita para la NGS es de 14 días, por lo que las aproximaciones son comparables bajo condiciones óptimas (dos semanas). El coste sería comparable o incluso algo menor para la NGS frente a la CCA convencional junto con la técnica FISH para translocaciones/inversiones. Por todo ello, los autores concluyen que una estrategia basada en NGS puede sustituir a la CCA convencional en detectar los CNA definidas por la ELN y puesto que es un método rápido y fiable para la detección de genes de fusión relacionados con la LMA.

En el estudio de Mack *et al.* (105) se diseña una plataforma de NGS integrada para un análisis genético exhaustivo de las aberraciones que son críticas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de pacientes adultos con LMA. El flujo completo (preparación de tres librerías de NGS y análisis de datos por cinco algoritmos diferentes) se completa en cinco días. El cariotipo se realiza por LC-WGS (como en el estudio de Mareschal *et al.* (104)), seguido de un análisis de CNV con un nuevo algoritmo basado en cariotipos de referencia generados *in-silico*. Para la evaluación de translocaciones y variantes de ADN, se utilizaron los paneles comerciales *TruSight Myeloid sequencing panel* (TSMP) (Illumina) y el *QIASeq™ Myeloid Neoplasms panel* (Qiagen, Hilden, Germany). Para la identificación de duplicaciones de tándem internas de FLT3 y duplicaciones parciales en tándem de KMT2A, se adaptaron las herramientas previamente descritas.

Se desarrollaron nuevos algoritmos para identificar CNV, KMT2A-PTD y PTDi y se añadió ITD-seek para la identificación de FLT3-ITD a otros *pipelines* disponibles.

Los autores señalan que los costes del servicio por muestra fueron comparables con los de los costes totales de la citogenética convencional, FISH y análisis mutacional.

Los paneles de detección de genes de fusión y mutaciones fueron validados en líneas celulares y en un subgrupo de muestras de pacientes, identificando todas las alteraciones genómicas esperadas.

Para validar el procedimiento diagnóstico, se utilizó una cohorte de 33 pacientes. Los nueve cariotipos normales de esta cohorte fueron clasificados de forma correcta, y 30 de las 31 (97 %) CNVs también fueron reportadas de forma correcta frente a la citogenética clásica y FISH.

El análisis cegado de ocho muestras de pacientes adicionales mediante este protocolo reprodujo de forma precisa los resultados. Por ello, se concluye que el cariotipado por LC-WGS, siempre que el recuento de blastos sea de al menos 20 %, permite detectar de forma rápida y fiable los cambios numéricos cromosómicos y, que, en combinación con el cribado de fusiones y mutaciones por paneles, puede facilitar la implementación de terapias de inducción específicas en pacientes con LMA.

También se han identificado dos estudios que valoran un panel que permite la NGS tanto de ADN como ARN (106, 108). El primer panel de Oncokids® Cancel Panel (Children's Hospital Los Angeles, CA, USA) (106) se dirige a pacientes pediátricos con cualquier cáncer (incluye las leucemias agudas); y el segundo, Oncomide Myeloid Research assay (OMR) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (108), a neoplasias mieloides (agudas y crónicas), incluyendo la LMA. Así, se pretenden analizar los SNVs, *indels* y genes de fusión con relevancia clínica.

En el caso de Izevbaye *et al.* (108), los autores realizan la validación analítica del panel OMR, que incluye 40 genes y 29 genes de fusión comunes en neoplasias mieloides. Utilizaron 77 muestras de ADN (con 91 SNVs y pequeños *indels*), así como 71 muestras de ARN de pacientes con la mayoría de las traslocaciones que definen la LMA, previamente caracterizadas por otros paneles.

De las 77 muestras de ADN (42 % pacientes con LMA), 67 habían sido previamente referidas para NGS con el panel TMSP y, las 10 restantes para mutaciones CALR, FLT3, KIT y CEBPA por métodos convencionales (por ser regiones difíciles de secuenciar por alto contenido en guanina y citosina (GC)). 49 eran muestras con mutaciones bien caracterizadas y 28 muestras sin mutaciones patológicas.

De las 71 muestras de ARN (45 muestras con genes de fusión anormales y 26 sin genes de fusión o cariotipo normal caracterizadas por cariotipo y/o FISH), el 44,2 % eran de pacientes con LMA y solo 4,6 % pacientes con LLA.

La concordancia fue de un 91,3 % y 100 %, para el ADN y ARN, respectivamente. La S y E para las muestras de ADN fueron del 96,7 % y 100 %, y para el ARN del 99,8 % y 100 %, respectivamente. Por ello se concluye que el panel OMR es altamente preciso y reproducible en la detección de alteraciones genéticas comunes en neoplasias mieloides.

Hiemenz *et al.* (106) describen la validación del panel Oncokids (con 20 ng de ADN y 20 ng de ARN) en una cohorte de 192 muestras de un amplio rango de tumores y alteraciones.

Este panel cubre la región codificante completa de 44 loci de predisposición del cáncer, genes supresores de tumor y oncogenes; *hotspots* para mutaciones de 82 genes y eventos de amplificación en 24 genes, y 1.421 genes de fusión. Se incluyeron un catálogo de alteraciones genómicas (diagnósticas, pronósticas o terapéuticas) reportadas en todas las formas comunes de cáncer pediátrico (SNVs, *indels*, amplificación de genes y genes de fusión).

Tras la validación con una mezcla sintética de variantes conocidas (AcroMetrix), se seleccionaron casos previamente confirmados mediante métodos ortogonales (FISH, *microarray* de cromosomas (CMA), secuenciación Sanger y en algunos casos, paneles de secuenciación de NGS), testando 44 LLA-B, 30 tumores blandos/sarcomas, 26 neoplasias mieloides, 18 tumores cerebrales y nueve tumores embrionarios.

Para la S analítica de SNVs, variantes multinucleótidas (MNVs en inglés) e *indels*, se utilizó el ADN de 83 muestras clínicas previamente caracterizadas por secuenciación Sanger (18 muestras) o NGS (64 muestras), que presentaban un total de 99 SNVs, tres MNVs y 49 *indels*. La concordancia fue de 98 de 99 SNVs (S de 99 %; IC95 % de 94,5 a 99,9 %) y 44 de 49 *indels* (S de 89,8 %; IC95 % de 77,8 a 96,7 %). Las tres MNVs fueron detectadas. En cuanto a los genes de fusión de las muestras hematológicas, 47 de las 51 muestras fueron concordantes (92,2 %; IC95 % de 81,1 a 97,8 %). Las cuatro discordantes fueron fusiones de ETV6-RUNX1 detectadas por FISH (Oncokids cubría solo el principal breakpoint de ETV6-RUNX1, el 90 % de las fusiones de los dos genes). Estos casos fueron confirmados por RT-PCR y secuenciación Sanger.

Por ello, los resultados apoyan la validez analítica y el valor de Oncokids en el uso rutinario en la práctica clínica en pacientes pediátricos con un amplio rango de tumores, entre ellos los hematológicos.

En relación con el único estudio (107) que evalúa la combinación de la secuenciación del transcriptoma codificante y del exoma para reducir el número de variantes (SNVs e *indels*) a analizar, se secuenciaron las muestras de cinco pacientes con LMA citogenéticamente normales, emparejando muestras de médula ósea de diagnóstico y remisión (20 muestras secuenciadas en total).

Se observó una correlación cercana entre biomarcadores diagnósticos de rutina en 29 de 30, con la excepción de una repetición interna en tándem de FLT3.

De forma adicional, la prueba reveló mutaciones en DNMT3A, IDH2, TET2 e IL32 (mutación de desplazamiento de pauta de lectura), que la prueba de rutina no abarcaba. Con este proceso se reducen de forma efectiva las observaciones a un subgrupo dirigido de alta especificidad.

Todas las muestras diagnósticas fueron testadas para mutaciones comunes mediante análisis de fragmentos de ADN por electroforesis capilar.

Se excluyen variantes detectadas en las muestras en remisión. La intersección entre el exoma y las variantes de ARN, identificadas exclusivamente en las muestras diagnósticas, proporcionó sets de 10 variantes de media (rango entre 3 y 21), con la exclusión de variantes de referencia y polimorfismos comunes.

El análisis molecular rutinario paralelo de NPM1, IDH1, FLT3 (ITD y mutaciones puntuales en D835), WT1, CEBPA y KIT confirman la presencia o ausencia de candidatos somáticos desde NGS, con una excepción: no se detectan dos FLT3-ITD con ninguna de las dos técnicas de NGS, que sí detectan por el análisis de fragmentos (frecuencia del alelo variante (VAF en inglés) de 6 y 22 %, longitud de 60 y 111 pb, respectivamente).

#### IV.2.1.2. Estudios que realizan NGS de sólo ADN

En cuanto a los 12 estudios que se centran en la secuenciación del ADN, un estudio se centra sólo en la detección de CNVs (89), otro en la detección de translocaciones frecuentes en pacientes con leucemia (85) y el tercero en la detección de CNA en pacientes con LMA (88).

Cinco estudios evalúan la utilidad de la NGS para identificar todo tipo de alteraciones, tanto CNVs como SNVs, pequeños *indels* o incluso en algunos genes de fusión y translocaciones (80-83, 86, 91, 92) y los cuatro restantes, la detección de SNVs e *indels* mediante la NGS del ADN (84, 87, 90, 93).

En cuanto a los estudios que sólo se centran en la detección de CNVs/CNA o translocaciones (85, 88, 89), el primero (89) evalúa una variante de NGS que permite la detección simultánea de CNAs en pacientes con LLA

de tipo B y T con hasta 1.000 secuencias diana, lo que se ha denominado “cariotipado digital”, que realiza la amplificación digital por sondas dependiente de ligandos múltiples. Este nuevo método fue diseñado y optimizado para detectar CNAs en las regiones de 56 genes relacionados con la LLA.

El set de 208 sondas para el cariotipado digital cubre todos los brazos de los cromosomas con entre tres y seis sondas, con al menos una sonda para cada una de las “localizaciones” (cerca del centrómero, en la mitad del brazo del cromosoma y cerca del telómero).

Este método fue aplicado en muestras de pacientes sanos y fue validado con líneas celulares con CNAs conocidas.

Posteriormente, el método fue validado con muestras de 67 pacientes con LLA (de tipo B y T), caracterizadas previamente por amplificación de sondas tras ligación múltiple (MLPA en inglés), hibridación genómica comparativa y/o *arrays* de SNP.

Las alteraciones eran detectadas de forma fiable si la muestra contenía un 20 o 30 % de células con las mismas. Así, la S diagnóstica fue del 98,9 % y la E del 97,8 %.

Los autores señalan que el cariotipo digital identifica de forma fiable todas las pérdidas y ganancias cromosómicas (incluyendo la hiperdiploidia alta), deleciones o ganancias de genes completos, amplificación intracromosómica del cromosoma 21, genes de fusión y deleciones intragénicas que fueron confirmadas por otros métodos, por lo que los resultados colocan a la MLPA digital como una alternativa para la caracterización genética de pacientes diagnosticados de LLA de forma reciente.

El segundo estudio (85) presenta un panel múltiple de amplificación de locus dirigida (TLA en inglés) como test de cribado de traslocaciones en pacientes con leucemia que incluye 17 genes asociados con cientos de genes de fusión, para determinar si la región o gen está envuelto en una traslocación y con qué *partner*. Para ello se utilizan sets de *primers* dirigidos a regiones *breakpoints* y regiones cercanas para ampliar la cobertura del panel.

Para la validación técnica del panel (optimización del análisis e interpretación de los resultados), se realizó una serie de diluciones de líneas celulares y muestras de la médula ósea de 17 pacientes con cariotipo conocido y las líneas REH y FKH-1, así como diluciones seriadas de las líneas KOPN-8 y HAL-01. Todas las muestras se utilizaron para marcar los puntos de corte para el análisis e interpretación de los datos. Las diluciones también se utilizaron para establecer el porcentaje mínimo de células necesario para la prueba. A este primer grupo de muestras se la denominó *training set*, y la concordancia con los tests convencionales fue del 81 %.

Para valorar el rendimiento, se seleccionó un segundo set de muestras de 19 pacientes, denominado *test set*, utilizando los límites óptimos obtenidos del *training set*.

Se repitieron las series de diluciones con las líneas celulares para confirmar el número mínimo de células aberrantes para detectar las translocaciones con este procedimiento, y se utilizaron los límites óptimos definidos con el primer set, encontrando en este caso que la concordancia era del 100 % (E del 100 %, sin FP).

Los autores determinaron que la prueba requiere un mínimo de 10 % de células aberrantes para detectar las traslocaciones, con excepción de la región diana MYC, que necesita de un 25 %, concluyendo que puede tratarse de una prueba para realizar un primer cribado de translocaciones, sin conocimiento previo de los genes *partners*, tanto en pacientes con leucemia aguda como otras neoplasias hematológicas.

En el caso del estudio de Vosberg *et al.* (88), se evalúa la utilidad de la secuenciación masiva del exoma y de un panel customizado de genes frente al *array* de SNPs para detectar CNA en pacientes con LMA.

Los autores incluyeron 90 pacientes con leucemia emparejados con muestras en remisión completa. La citogenética convencional detectó alteraciones cromosómicas en 25 de éstos, siendo 65 los que no presentaban ninguna alteración.

Para evaluar la utilidad del panel customizado en la detección de CNAs, se seleccionaron 22 pacientes de los 25 que presentaban delección del cromosoma 9 (de los que cinco también fueron analizados por *array* de SNP) y 21 pacientes sin aberraciones en el cromosoma 9. Los autores confirmaron los resultados citogenéticos en 18 de los 22 casos (82 %), siendo el tamaño clonal (<33 %) el factor limitante para la detección de CNAs en los cuatro casos discordantes.

En cuanto a los resultados de la WES de los 65 pacientes citogenéticamente normales, se identificaron CNAs aparentemente no detectados por citogenética convencional en seis de los pacientes.

Los 25 pacientes con LMA que presentaron aberraciones cromosómicas bien definidas, fueron emparejadas con muestras control germinales para WES y detección de CNAs. Así, se pudieron confirmar aberraciones cromosómicas, incluyendo trisomías, monosomías y delección parcial en 20 de las 25 muestras secuenciadas por WES.

La comparación de detección de CNA utilizando la WES, un panel customizado de genes y el *array* de SNP demostró resultados equivalentes en los cinco pacientes que presentaban un tamaño clonal variable.

Por lo tanto, los autores señalan que la detección de CNAs mediante secuenciación dirigida puede complementar los datos obtenidos por citogenética clásica y molecular en el diagnóstico rutinario, especialmente en la detección de CNAs autosómicos en el clon dominante de la LMA.

En relación con los estudios que pretenden identificar las principales alteraciones genéticas implicadas en estas enfermedades, en el estudio de Shen W *et al.* (91) (centrado en neoplasias mieloides) se investiga la factibilidad de combinar la detección de CNV en el genoma, pérdida de heterocigosidad copia neutro (CN-LOH en inglés) y mutaciones genéticas diana en una única prueba para lo que se diseña una estrategia de *SNP sequencing backbone* de genoma completo con 22.762 regiones SNP distribuidas por todo el genoma.

Se seleccionaron 62 genes mutados de forma frecuente para las mutaciones diana y se combinó este eje de secuenciación con un panel de secuenciación dirigida en nueve individuos sanos y 16 pacientes con neoplasias mieloides.

En los 16 pacientes con neoplasias mieloides se detectaron 52 CNVs somáticas, 11 casos de CN-LOH y 39 mutaciones oncogénicas. En los nueve individuos sanos no se detectó ninguna alteración. Todos los CNVs y CN-LOH fueron confirmados por *microarrays* de SNP.

En ocho casos se detectaron perfiles complejos de CNV o CN-LOH que predecían un mal pronóstico y demostraban mutaciones en TP53. Este método es capaz de detectar CNVs presentes en un 20 % de las células, y el tamaño más pequeño de CNV identificado fue una ganancia de 500 kb.

Por ello, los autores señalan la factibilidad de integrar la detección de CNV, CN-LOH y mutaciones genéticas diana con un coste directo menor (850 \$) que el coste combinado de realizar un *microarray* de SNP (650 \$) y un panel dirigido para detección de mutaciones (650 \$).

En el estudio de Aoe *et al.* (86) se valora la utilización de un panel de NGS customizado (HaloPlex) para detectar mutaciones puntuales, *indels* y CNVs en genes que podrían ayudar a estratificar el riesgo de pacientes pediátricos con LLA Ph+ (como mutaciones en ABL1 y deleciones de IKZF1). Los autores analizan con este panel 160 genes implicados en desórdenes hematológicos en cinco pacientes pediátricos, tanto al momento diagnóstico como en la recaída, y comparan los resultados obtenidos con los de las técnicas de MLPA o secuenciación Sanger.

Aunque se observan resultados similares a los obtenidos con otros métodos, tres de los 36 CNVs identificados por MLPA no fueron detectados por

Hapoplex (FN) (uno como normal y los otros dos sin datos), y dos de los identificados por Hapoplex no fueron detectados por MLPA (FP) (S del 91,7 %).

En caso de SNVs e *indels*, se consideraron las variantes con un VAF superior al 10 % que no estaban presentes en remisión. Se detectaron mutaciones en el momento diagnóstico en dos pacientes (uno en IKZF1K y mutación *indel* en DNMT2) y en el momento de recaída tres (una en ABL1 y una mutación puntual y un *indel* en DOT1L). Estas mutaciones fueron validadas por secuenciación Sanger. También se realizó un estudio de la evolución clonal en estos pacientes, observado si las mutaciones identificadas en la recaída estaban ya presentes en el momento diagnóstico, etc. Los autores señalan que es necesario mejorar el panel para aumentar el número de lecturas y reducir el número de genes analizados, y que la NGS podría ser utilizada para decidir qué tipo de inhibidor de la tirosina quinasa (TKI en inglés) (dasatinib, nilotinib o ponatinib) sería más adecuado en cada caso, o si fuera necesario el trasplante hematopoyético en algunos de estos pacientes.

En cuanto al estudio de Kim *et al.* (99), los autores diseñan y evalúan un panel de NGS para detectar mutaciones somáticas, translocaciones y mutaciones germinales en pacientes con neoplasias mieloides también en un único ensayo. Para ello se incluyen 129 pacientes con neoplasias mieloides, de los que 95 tienen LMA.

Con la NGS se identificaron 280 variantes en 65 genes (al menos una variante en 119 pacientes). Los autores secuenciaron por NGS y Sanger 11 genes frecuentemente mutados en 34 de los pacientes con LMA, con una concordancia fue del 100 % (aunque solo se muestran los resultados de los genes NPM1, CEBPA, IDH1 exón 4, IDH2 exón 4, DNMT3A exón 23, ASXL1 exón 12, FLT3-ITD). En el caso de FLT3-ITD, el análisis de fragmentos detectó 17 casos que la NGS identificaba si se utilizaba el algoritmo Pindel en vez de la herramienta Genome Analysis Tool Kit (GATK) optimizada para detección de SNVs, que solo detectó mutación en ocho de los 17 casos (47 %).

La delección o duplicación de exones o de genes completos fue detectada en 19 pacientes. En aquellos genes para los que había un kit de MLPA disponible, se confirmaron todas las CNVs.

Tras excluir los 25 casos para los que no se contaba con información citogenética completa, la concordancia fue del 87,5 % (91/104). Así, el análisis de NGS pudo detectar pequeñas delecciones intersticiales con mayor resolución que el cariotipo convencional. Los autores también estudian las posibles mutaciones germinales examinando 113 genes de predisposición al

cáncer. Estos observaron que entre el 8,4 % y 11,6 % de los pacientes con LMA tenían mutaciones germinales que no respondían a la quimioterapia estándar, sugiriendo que la predisposición germinal puede tener implicaciones clínicas significativas y diferentes.

Por ello, los autores señalan que este panel puede ser una buena prueba complementaria para muchas pruebas convencionales (como la secuenciación Sanger, la RT-PCR y la citogenética convencional).

En otro de los estudios que pretenden utilizar la NGS para identificar en un único paso las principales alteraciones genéticas, en este caso de la LLA-B (35), se diseña y valida un panel customizado que incluye exones específicos de 150 genes asociados a B-LLA: 165 SNPs asociados con la farmacogenética del tratamiento de la LLA, secuencias *breakpoint* de ETV6-RUNX1, BCR-ABL1, MLLr, CRLF2r, incluyendo los genes de fusión CRLF2/P2YR8 y IGH/CRLF2, regiones específicas de detección de CNV en IKZF1, CDKN2A, PAX5, BTG1, RB1, y ETV6; sondas distribuidas de forma aleatoria entre los cromosomas 4, 8, 10 y 21 para detección de hiperdiploidía, y de cromosomas 7 y 17 para la detección de hipodiploidía.

Los autores incluyen en el estudio 75 pacientes con LLA-B caracterizados previamente por técnicas convencionales: 10 pacientes positivos a BCR-ABL1, 10 positivos a ETV6-RUNX1, 10 con hiperdiploidia alta (>51 cromosomas), 10 con reordenaciones en MLL, tres con clones con baja hipodiploidia (<40 cromosomas); tres con iAMP21 y 29 sin alteraciones recurrentes o pacientes con otro tipo de alteraciones.

Se reportaron un total de 868 variantes (SNV/*indels*), incluyendo aneuploidías en 14 muestras y algunos de los genes de fusión recurrentes en 35 de los 75 pacientes. También se detectaron alteraciones secundarias, como SNVs y CNVs en 66 y 46 pacientes, respectivamente, permitiendo refinar la estratificación de los pacientes. Los polimorfismos y genes de fusión fueron validados mediante secuenciación Sanger.

No se reportaron SNVs/*indels* ni perfil alterado de CNV en las muestras control, y el panel fue altamente reproducible (se secuenciaron tres muestras de forma duplicada).

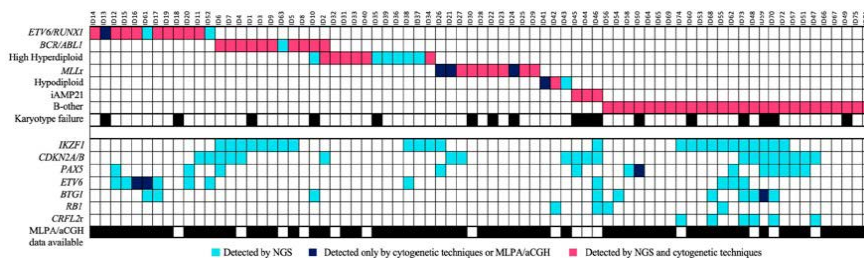
La S y E fueron del 96,3 % y 90 % para SNV e *indels* (frente a otros paneles de NGS, como 454 Junior sequencing y TruSeqCustom amplicon panel de LLA); 89,7 % y 100 % para genes de fusión frente a FISH; 93,3 % y 100 % para detección de aneuploidías en comparación con cariotipo; y, del 95,5 % y 100 % para detección de CNVs en comparación con MLPA.

En el 28 % de los pacientes (21/75), no se pudo realizar el cariotipo y los datos de NGS permitieron reclasificar a tres de los 29 pacientes del grupo de otros pacientes B.

Entre las alteraciones recurrentes, el 81,3 % fueron detectadas por ambas metodologías. El 12 % fue detectado únicamente por la NGS y el 6,7 % por técnicas citogenéticas. De forma adicional, se identificaron algunas alteraciones secundarias en 61,3 % (46 de 75) de los pacientes por NGS.

En relación con los principales genes de fusión, todos fueron identificados por el panel, incluso cuando el porcentaje de células portadoras era bajo o en casos no detectados por técnicas convencionales. En casos de MLLr, el panel solo detectó el 70 % de los casos confirmados por citogenética, porque solo la región con *breakpoints* más frecuentes fue incluida en su diseño. El 20 % de los pacientes con MLLr presentaban un *breakpoint* en una posición diferente y, por lo tanto, no pudieron ser detectados por el panel.

Por ello, se señala que se trata de un panel que permite la detección rápida y eficiente de las principales alteraciones genéticas de la LLA-B (SNVs, *indels*, genes de fusión recurrentes, CNVs, aneuploidías, SNPs), lo que podría simplificar y acelerar el proceso de diagnóstico molecular de estos pacientes.



**Figura 17.** Alteraciones genéticas identificadas del análisis combinado del panel de NGS customizado y del diagnóstico estándar en pacientes con LLA-B (Obtenida de Montaña *et al.*, 2020).

En cuanto al último estudio que pretende identificar todo tipo de alteraciones mediante la NGS en un único paso (80), se reportan los resultados del panel *enrichement capture MyeloidNeoplasm-GeneSGKit* (Sistemas Genómicos), que incluye mutaciones frecuentes, CNVs y translocaciones relacionadas con 35 genes implicados en las neoplasias mieloides, y validados con citogenética y/o MLPA cuando fue posible.

Los autores incluyeron 121 casos de neoplasias mieloides con estudio citogenético completo, en los que detectaron 64 alteraciones frecuentes (10 solo por citogenética y siete por NGS). En los 17 en los que no se pudo rea-

lizar cariotipo se observaron dos alteraciones frecuentes por NGS y una por FISH, por lo que finalmente se identificaron 66 alteraciones totales: 48 por ambas técnicas, 10 solo por citogenética y 8 por NGS.

Además de las alteraciones frecuentes, se observaron 38 CNVs en 29 pacientes (16 ganancias y 22 pérdidas) en algunos de los genes incluidos, de los que todos, salvo siete, fueron confirmados por MLPA o citogenética.

Al analizar el impacto de la NGS frente al cariotipo, se detectaron 19 nuevas alteraciones frecuentes en 12 pacientes. En cinco casos se presentaban en el contexto de cariotipo alterado (no influyeron en el pronóstico) y en otros seis, en el contexto de cariotipo normal (3) o en pacientes sin cariotipo (3). Entre esos seis, cuatro cambiaban el riesgo de intermedio a no favorable, y uno de intermedio a favorable. Por ello, se concluye que la NGS es una prueba complementaria fiable para el análisis de CNVs y translocaciones en neoplasias hematológicas mieloides.

Con relación al resto de estudios que evalúan la NGS del ADN (81, 82, 84, 87, 90, 93), el estudio de Carbonell *et al.* (82) analiza 121 muestras diagnósticas de pacientes con neoplasias mieloides y 10 muestras de un subgrupo de pacientes con leucemia que habían recaído, utilizando dos paneles de NGS de enriquecimiento por captura (*LMA-GeneSGKit* (Sistemas Genómicos) y *Myeloid Neoplasm-GeneSGKit* (Sistemas Genómicos, oncología germinal)). Es el único estudio que incluye paneles con marcado CE-IVD. El panel *LMA-GeneSGKit* incluye la detección de *indels* y SNV, y el panel *Myeloid-Neoplasm-GeneSGKit* incluye *indels*, SNV, translocaciones, CNVs y alteraciones numéricas grandes.

La NGS detectó 278 variantes patogénicas en 84 % de los pacientes. El 82 % de las alteraciones estructurales caracterizadas por citogenética (25 de 31 CNV y las tres traslocaciones) fueron identificadas por la NGS.

La detección de variantes por NGS cambió el diagnóstico de siete pacientes y el pronóstico de 15 (de riesgo intermedio a riesgo desfavorable). 44 pacientes fueron calificados para ser incluidos en ensayos clínicos (22 de estos pacientes con LMA con detección de variantes en FLT3-TKD, IDH1, IDH2 y genes del espliceosoma).

Seis de los diez pacientes con LMA que sufrieron una recaída perdieron o ganaron variantes, en comparación con las muestras diagnósticas.

La presencia de las variantes fue confirmada por PCR y secuenciación Sanger. La detección de duplicaciones internas en tándem de FLT3 fue validada por amplificación y electroforesis capilar. El origen germinal o somático fue testado en pacientes con variantes que afectaban a genes asociados

a neoplasias mieloides hereditarias con un VAF superior a 0,4. Las alteraciones citogenéticas fueron confirmadas por qPCR, FISH y/o cariotipo.

Los autores concluyen que el uso de paneles de NGS mejora la caracterización genética en comparación con los métodos convencionales, demostrando su potencial utilidad en la práctica clínica.

En otro estudio de Carbonell *et al.* (81), se estudia lo que podría aportar la NGS en pacientes con LMA clasificados como NPM1mut/FLT3-ITDneg, aunque son pacientes de bajo riesgo presentan una alta tasa de recaída. De 333 pacientes con LMA tratados en el hospital, 27 fueron NPM1mut/FLT3-ITDneg, y fueron analizados en mayor detalle mediante NGS para identificar asociaciones entre las características clínicas y moleculares y la incidencia acumulada de recaída. La NGS se realizó en el momento diagnóstico y en remisión, mediante dos paneles de captura comercializados (LMA-GeneS-GKit y MYS).

Las mutaciones identificadas fueron validadas mediante secuenciación Sanger, y se observó que la presencia de la variante FLT3D835 se asociaba con una mayor probabilidad de recaída, por lo que la NGS podría ser de utilidad en caracterizar mejor el riesgo de este tipo específico de pacientes.

Alonso *et al.* (93) evalúan la utilidad clínica del panel *Ion Ampliseq AML Community panel* (Thermo Fisher Scientific) que incluye 19 genes, en el diagnóstico de pacientes con LMA frente a técnicas convencionales.

En primer lugar, la S y E del panel se testó en líneas celulares, siendo del 87,55 % y 99,88 %, respectivamente.

Posteriormente, se secuencian las muestras de 162 pacientes con LMA, donde la NGS identifica 339 variantes (36 % *indels* y 64 % SNVs), observando una concordancia del 100 % con los métodos convencionales. Sin embargo, mientras que solo el 45,07 % de los pacientes presentaron un marcador molecular mediante técnicas convencionales, la NGS identificó al menos un marcador útil en el 88,89 % de los pacientes. El 68 % de los pacientes pertenecían al grupo de LMA con anomalías recurrentes. En este grupo, 18,5 % de los pacientes presentaban anomalías citogenéticas, y el 49,4 % cambios moleculares. El 20 % de los pacientes fueron clasificados como LMA con cambios relacionados con mielodisplasia y 12 % se mantuvieron en la categoría de LMA *not otherwise specified*. Así, todos los pacientes pudieron ser clasificados en una de las categorías diagnósticas de la OMS de 2016 (12), y en los índices pronósticos propuestos por ELN 2017 (13).

La conclusión de los autores es que la NGS dirigida es reproducible y precisa y que es aplicable en el diagnóstico de LMA, y que una selección

adecuada de genes clave o regiones clave puede ser suficiente para clasificar a los pacientes en las diferentes categorías de riesgo en el diagnóstico, reduciendo así costes y simplificando el análisis bioinformático de los datos.

El estudio de Ng *et al.* (89), se centra en el análisis mutacional del gen CEBPA en pacientes con LMA, debido a la dificultad de detección de mutaciones en este gen por la cantidad de GC que contiene en su secuencia.

Los autores utilizan el flujo de trabajo basado en amplicones Nextera XT específico de CEBPA (CEBNX en inglés) para construir las librerías, y secuencian un total de 137 muestras de pacientes con LMA. Se encuentran que 22 de las muestras (16,1 %) presentaban mutaciones en el gen CEBPA (VAF entre 3,8 % y 58,2 %). Tomando la CCS como gold estándar, la S y E fue del 97 % (IC95 % de 82 a 100 %) y 97 % (IC95 % de 92 a 99 %), respectivamente.

Los autores señalan que la prueba de NGS desarrollada en el laboratorio tiene alta cobertura y supera los retos asociados con la eficiencia de la amplificación y la baja cobertura del gen CEBPA, encontrando además que CEBNX identifica tres mutaciones adicionales que no fueron detectadas por CCS. Para demostrar que los resultados que se obtienen son mejores que los obtenidos mediante la NGS con paneles comerciales, los autores secuencian las mismas muestras utilizando el panel TSMP. En este caso, se observa que la S y E del panel fueron menores para detectar mutaciones en el gen CEBPA (S de 47 %, IC95 % de 31 a 62 %; E de 94 %, IC95 % de 88 a 98 %).

El estudio de He *et al.* (86) aborda de forma específica las dificultades de interpretar los resultados de NGS para las mutaciones de FLT3 y, en concreto, para determinar el ratio de FLT3-ITD en LMA. Se utiliza el panel OncoHeme next generation sequencing panel (Mayo Clinic Laboratories, Rochester, MN, USA) (que incluye 34 genes más, además de FLT3), para la secuenciación masiva de 7.902 pacientes con neoplasias mieloides, con el que se detectaron 335 casos de FLT3-ITD, con tamaño y puntos de inserción variables. Sin embargo, de los 7.902 pacientes iniciales sólo en 402 se contaba con resultados del análisis de fragmentos para FLT3. En estos pacientes, la concordancia entre ambos test fue de un 100 % (136 casos positivos y 266 negativos).

En relación al ratio, y utilizando los resultados del análisis de fragmentos como gold estándar, se observó una concordancia del 94 % (128 de los 136 casos) con la clasificación de un ratio alto o bajo.

Además, la NGS detectó mutaciones que podrían beneficiarse de terapia con inhibidor de FLT3 en regiones no cubiertas por el análisis de fragmentos en siete pacientes.

Por lo tanto, la utilización de una técnica de captura por hibridación y *pipeline* bioinformáticos optimizados, la NGS sí podría detectar de forma fiable las FLT3-ITD y clasificar de forma adecuada el ratio alélico para estratificar el riesgo de la LMA. Además, es más sensible a la hora de detectar mutaciones en FLT3, por lo que puede mejorar la terapia dirigida personalizada en pacientes con LMA.

Por último, en relación con la validez o utilidad de la secuenciación masiva de ADN en pacientes con leucemia aguda, nos encontramos con el estudio de Au *et al.* (90), que evalúa la aplicabilidad de un panel de genes para la detección de mutaciones de LMA en un laboratorio de diagnóstico molecular.

El panel utilizado es el TSMP con 54 genes incluidos (exones codificantes completos de 15 genes y *hotspot* exónicos de 39 genes). Se secuenciaron muestras de 50 pacientes (46 con LMA y cuatro con otras neoplasias mieloides), y se compararon los resultados con los obtenidos con técnicas moleculares. La NGS identificó 77 mutaciones en 24 genes (74 %) de 37 pacientes. Los resultados se comparan con los resultados de pruebas convencionales de 42 pacientes (n = 111 resultados, tanto positivos como negativos, incluyendo FLT3 ITD (n = 39), dominio tirosin quinasa de FLT3 (TKD; n = 39), NPM1 (n = 22), JAK2 (n = 4), KIT (n = 4), CALR, MPL y CSF3R (todos n = 1)).

La concordancia fue del 95,5 % (106 de 111), aunque al aplicar el nuevo algoritmo informático ITD seek, la concordancia aumentó hasta el 98,2 % (109/111).

Los autores concluyen que el panel de genes detecta de forma sensible y precisa mutaciones de LMA accionables, ayudando a individualizar el manejo de los pacientes con LMA. Además, los autores presentan ITDseek que mejora la detección de FLT3-ITD de longitud variable, posición y baja carga alélica.

#### IV.2.1.3. Estudios que realizan NGS de sólo ARN

En relación con los estudios que secuencian de forma masiva el ARN, todos utilizan paneles comercializados, dirigidos sobre todo a la detección de genes de fusión, aunque también mutaciones puntuales en algunos casos, implicados en enfermedades oncohematológicas. En la mayoría de los estudios se centran en la utilización de la NGS para la detección de genes de fusión en pacientes con leucemia aguda (71, 98, 102) o en pacientes con LLA-B (100, 103). Sin embargo, también se han identificado tres estudios que se centran en la utilización de la NGS en pacientes con LLA de tipo Ph+ (95, 96, 101) y un estudio que incluye la NGS de ARN en el algoritmo que

utilizan para identificar pacientes con LLA-B de tipo Ph-like (94). El último estudio incluye la NGS de ARN para identificar el tipo de leucemia que tiene el paciente (97).

Son tres los estudios que utilizan la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas (98, 99, 102).

En el estudio de Kim *et al.* (99) se evalúa la validez de dos paneles comerciales basados en la NGS de ARN (*TruSight RNA fusion panel* (Illumina) y *FusionPlex Pan-Heme panel* (ArcherDx)) en la detección de genes de fusión recurrentes en oncohematología. Se incluyeron 24 muestras de médula ósea en el diagnóstico inicial de pacientes con leucemia aguda. El límite de detección fue valorado por diluciones seriadas de ARN de un material comercial positivo para el gen de fusión BCR-ABL1. Los dos paneles detectaron los 19 casos con traslocaciones recurrentes, identificadas por RT-PCR, así como un caso de KMT2A-AFF1 como FN en RT-PCR. Entre los cuatro casos negativos por RT-PCR, la NGS identificó dos traslocaciones raras DDX3X-MLLT10 y NUP98- HOXC13. La validación de los resultados obtenidos se realizó por RT-PCR y secuenciación Sanger. Las sondas FISH utilizadas no incluían la detección de estas traslocaciones.

El panel de *TruSight*, pero no *FusionPlex*, pudo detectar traslocaciones recíprocas.

Sin embargo, el límite de detección de los paneles de NGS era menor que el de la RT-PCR (entre  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  para *FusionPlex* y de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  para la RT-PCR). Por ello, los autores señalan que los paneles de genes de fusión pueden ser útiles para el diagnóstico inicial, pero no para el seguimiento de pacientes con leucemia aguda.

En el estudio posterior de Kim *et al.* (98), los autores evalúan la utilidad de la NGS de ARN, mediante otro panel diferente, el de *FusionPlex Pan-Heme* para detectar genes de fusión en pacientes con leucemia aguda. Se hicieron dos rondas de PCR con *primers* específicos que cubren 199 genes diana y los resultados fueron comparados con los obtenidos por técnicas convencionales (cariotipo convencional, FISH y RT-PCR). Se confirmó la utilidad clínica a la hora de identificar fusiones de genes con significado clínico, como los relacionados con KMT2A, que tiene un alto número de *partners*.

Se analizaron 134 pacientes con leucemia aguda (LMA o LLA), identificando 53 genes de fusión en 52 pacientes. Además de las fusiones que se especifican en los criterios diagnósticos de la OMS, se identificaron 11 fusiones nuevas o raras, dos asociadas a la LLA tipo Ph-like, dos genes de fusión nuevos, tres genes de fusión con nuevos *partners* asociados y seis genes de fusiones raras. Por ello, los autores señalan la utilidad clínica del *FusionPlex*

*Pan-Heme panel* para identificar fusiones de genes con significado clínico, como los relacionados con KMT2A, que tiene un alto número de *partners*.

Los resultados demostraron una concordancia excelente con los resultados de la RT-PCR (con una S y E superior a la de la RT-PCR).

En el estudio de Engvall *et al.* (102), los autores describen la detección de genes de fusión mediante NGS de ARN con el panel *FusionPlex Heme panel* (Archer) en la plataforma MiSeq System (Illumina) en pacientes con leucemia aguda.

Se trata de un panel que incluye todos los genes de fusión recurrentes que se han descrito en LMA y LLA, y que fue diseñado para detectar todas las fusiones sin conocer el *partner* o puntos de ruptura específicos. En este estudio se incluyeron 27 casos de tumores hematológicos, en los que se analizaron 23 de variantes de transcripción. El panel fue validado de forma ciega (sin conocer el diagnóstico o los resultados citogenéticos) en una cohorte de 12 casos.

En los 27 tumores hematológicos se pudieron identificar fusiones que los métodos convencionales no habían detectado (reordenaciones crípticas o fusiones con *partners* raros). Los nuevos *partners* fueron verificados mediante RT-PCR y se diseñaron qPCR específicas de transcripto para poder realizar un seguimiento de cada paciente. Además, los 12 casos fueron correctamente valorados. Entre aquellos en los que el método FISH no identificó fusiones conocidas, la NGS del ARN identificó una fusión TCF3-ZNF384 (aberración críptica de LLA) que fue verificada posteriormente mediante RT-PCR. La NGS se repitió en seis casos de genes de fusión (CBFB-MYH11, TCF3-PBX1, PML-RARA, ETV6-RUNX1, BCR-ABL1 y KMT2A-MLLT3), que fueron secuenciados tres veces. Los genes de fusión fueron detectados en todas las repeticiones, siendo baja la variación observada, salvo para el gen de fusión ETV6-RUNX1.

Por ello, los resultados demuestran que la secuenciación dirigida de ARN utilizando *FusionPlex Heme Panel v1* puede ser implementada en los laboratorios clínicos para la detección de genes de fusión recurrentes o raros en el proceso diagnóstico hematológico.

En relación con los estudios que se centran en pacientes con LLA-B, dos evalúan el uso de la NGS de ARN en pacientes con LLA-B (100, 103) y tres en pacientes con LLA de tipo Ph+ (95, 96, 101).

En el estudio de Grioni (100) los autores evalúan la utilidad de la NGS de ARN mediante *RNA CaptureSeq* y un *pipeline* propio diseñado para el análisis y detección de genes de fusión en pacientes con LLA-B. Esta apro-

ximación se evaluó en una cohorte de 89 pacientes con LLA-B, en la que las técnicas convencionales no habían detectado ninguna fusión. Se incluyen tanto pacientes con un diagnóstico reciente de alto riesgo, como pacientes con altos valores de MRD 33 días después de la quimio de inducción o pacientes que han recaído.

En 38 de los 89 pacientes, se identificaron eventos conocidos (reordenaciones de KMT2A), así como nuevas fusiones (reordenación de JAK2), 16 de las cuales tenían valor pronóstico.

Teniendo en cuenta solo los datos de los 16 pacientes recién diagnosticados fueron siete (43 %) los que presentaron un resultado positivo para la presencia de genes de fusión. En cuatro se detectó la presencia de genes de fusión recurrentes de la LLA-B (t(5;5)/EBF1- PDGFRB (n = 2), t(9;9)/PAX5-JAK2 (n = 1), y t(12;19)/ZNF384-TCF3 (n = 1)) y en tres pacientes, genes de fusión para t(19;19)/TCF3-OAZ1 (n = 1), t(7;7)/IKZF1-DDC (n = 1), t(2;9)/ZEB2-JAK2 (n = 1), y t(9;17)/MPRIP-JAK2 (n = 1). Todas las fusiones fueron confirmadas por RT-PCR, y las nuevas fusiones fueron validadas mediante FISH.

Los autores concluyen que la NGS de ARN mediante *RNA CaptureSeq* y el *pipeline* de diseño propio es una aproximación adecuada para la detección de genes de fusión, que puede ser incorporada al diagnóstico rutinario de LLA para mejorar sustancialmente la medicina de precisión.

En Yeung *et al.* (103), los autores proponen un proceso rápido para detectar genes de fusión combinando la NGS de ARN por *FusionPlex ALL* (ArcherDx) y CGAT (*array* genómico de cromosomas) en 28 pacientes con LLA-B. Solo dos de las 28 muestras se recogieron en el momento diagnóstico, aunque en 14 casos no se conoce ese dato. Se realizaron ambas técnicas, así como otras técnicas convencionales como cariotipo y FISH con diferentes sondas específicas y RT-PCR y validación por secuenciación Sanger de la fusión P2RY8-CRLF2. La CGAT se realizó en aquellas muestras con un 20 % o más de células tumorales.

De los 28 pacientes, 17 presentaron genes de fusión relacionados con la LLA e isoformas oncogénicas (de IKZF1).

Los resultados de la CGAT estaban disponibles para todos; los del cariotipo para 26 y los de FISH en 22. Así, las alteraciones que se detectaron fueron:

1. Fusiones detectadas por NGS y una de las otras técnicas (n = 11).
2. Fusiones detectadas solo por NGS, incluyendo *STIL-TAL1* y *P2RY8-CRLF2* (n = 1, por cada uno).

3. Isoformas oncogénicas de *IKZF1*, a veces discordantes entre la NGS y la CGAT: de 28 muestras, nueve presentaban isoformas oncogénicas por NGS, siete de estas también con delección focal genómica detectada por CGAT y dos sin esa delección. Mientras tanto, cuatro muestras demostraron delección focal genómica en el locus *IKZF1* en CGAT, pero la isoforma oncogénica de *IKZF1* no fue detectada por NGS. Los autores concluyen que, excluyendo los datos de *IKZF1* oncogénico (porque CGAT no distingue entre delecciones que llevan a isoforma oncogénica frente haploinsuficiencia), la S y E fue del 100 %. Se señala que *FusionPlex* es altamente sensible y específico en detectar fusiones recurrentes de LLA y que es útil como técnica complementaria a los métodos clínicos convencionales de perfil genético (CGAT, cariotipo convencional y FISH).

En cuanto a los pacientes con LLA de tipo Ph+, el primer estudio es el de Szankasi *et al.* (101), en el que los autores desarrollan una prueba para la detección de mutaciones en BCR-ABL1 relacionadas con la resistencia al tratamiento de pacientes con leucemia Ph+, principalmente en el dominio quinasa de BCR-ABL1. Se analizan 508 muestras clínicas de pacientes con leucemia Ph+ y en un subgrupo de esas muestras (n = 97), se comparan los resultados de la secuenciación del ARN mediante NGS con los de la secuenciación de Sanger.

Los autores señalan que en 12 de los 75 casos positivos con secuenciación Sanger (16 %) se identificaron un total de 15 mutaciones adicionales por NGS, con un VAF entre 4 y 21 %. En nueve casos, la NGS identificaba una mutación adicional y en tres casos, fueron dos las mutaciones adicionales identificadas. 14 de las 15 mutaciones adicionales detectadas por NGS fueron clínicamente significativas, incluyendo mutaciones de resistencia como Y253F, E255K, V299L, F359V y T315I. Solo una de esas mutaciones no había sido reportada en pacientes resistentes a TKI, por lo que su significado era incierto. Uno de los 22 casos negativos por secuenciación de Sanger demostró la existencia de mutación por NGS que confiere resistencia TKI.

En resumen, los autores señalan que la NGS es capaz de detectar un número significativo de mutaciones de resistencia en el gen de fusión BCR-ABL1 por debajo de límite de detección de la secuenciación de Sanger rutinaria, siendo el coste aproximadamente dos veces el coste de una prueba de secuenciación de Sanger. Sin embargo, los autores señalan que el alto número de mutaciones detectadas puede estar sesgado por el proceso de selección de la muestra.

Por otro lado, en el estudio de Soverini *et al.* (95), los autores evalúan la utilidad de la secuenciación ultraprofunda del gen BCR-ABL1 en pacien-

tes con leucemia resistentes a imatinib. Para ello, comparan la presencia de mutaciones adquiridas para BCR-ABL1 en un grupo de 60 pacientes que además de ser resistentes a imatinib fracasan al tratamiento con inhibidores de segunda línea (15 con LLA, 45 con leucemia mieloide crónica), con la de un grupo de 25 pacientes resistentes a imatinib que sí respondieron (solo cuatro con LLA).

Los resultados se comparan con los obtenidos por secuenciación por Sanger, observando que la NGS era capaz de detectar ya en el momento en el que se da la resistencia al tratamiento con imatinib, las mutaciones que llevan a la recaída en 26 de los casos del grupo 1 (43 %), aunque éstas se presentaran en bajo nivel (mediana de 5 %; rango de 1,1 a 18,4 %). En el grupo 2 no se encontraron mutaciones de resistencia a la segunda línea de tratamiento en los 25 pacientes.

Por lo tanto, la secuenciación ultraprofunda del gen BCR-ABL1 cuando falla el tratamiento con imatinib puede permitir la personalización del tratamiento de forma más efectiva en comparación con la secuenciación de Sanger.

En otro estudio posterior de los mismos autores (96), se compara el uso de la NGS frente la secuenciación de Sanger para determinar las mutaciones en el dominio quinasa del gen de fusión BCR-ABL1 en pacientes con LLA y cromosoma Filadelfia positivo, resistentes a tratamiento con TKI.

De los 171 pacientes adultos analizados, en 44 casos fue en el momento diagnóstico y en 127 durante el tratamiento (47 por refractoriedad/recaída y 80 por MRD positivo tras inducción).

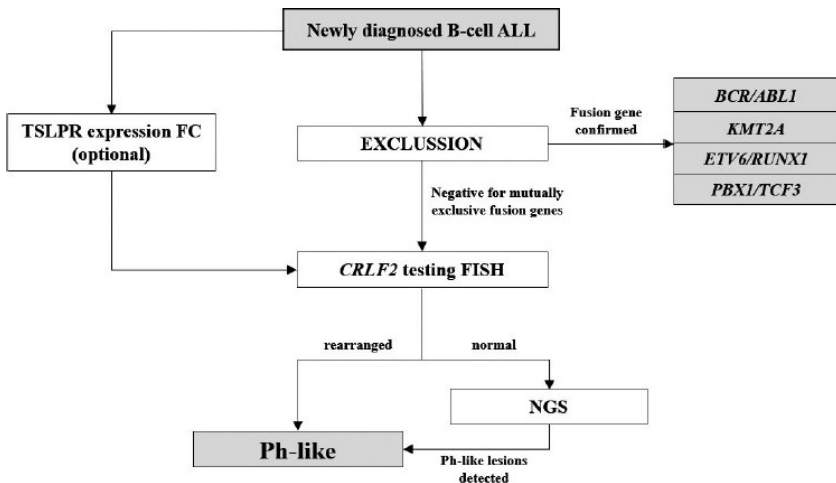
Entre los 44 pacientes analizados en el momento diagnóstico, el método Sanger no detectó ningún positivo, mientras que la NGS detectó mutaciones en tres: uno con la mutación V289A (VAF de 3,4 %); otro con las mutaciones D276G (VAF 4 %) y F359V (VAF 3,5 %), y un tercero con la mutación E255K (VAF 3,3 %) (el límite de detección de Sanger es 20 %). El primer paciente fue incluido en un ensayo clínico con ponatinib como primera línea; el segundo y tercero, en un ensayo sobre dasatinib y de blinatumomab como tratamientos de inducción. Los tres pacientes alcanzaron remisión completa y respuesta molecular (tiempo de seguimiento de al menos 29 meses).

Por ello, los autores señalan que el estudio de las mutaciones del dominio quinasa mediante NGS ayudarían a identificar pacientes con fenotipo mutado en los que el cambio por otro tratamiento TKI no sería efectivo y en los que sería mejor probar otras alternativas disponibles (96).

En el estudio de Podgornik *et al.* (94), los autores describen el algoritmo que utilizan para detectar pacientes con LLA-B de tipo Ph-like, en el que incluyen la secuenciación masiva, en concreto el panel *FusionPlex ALL*, con el que se identifican fusiones, mutaciones puntuales y niveles de expresión de 81 genes asociados a la LLA. Los autores se centran en el subtipo de LLA-B Ph-like, incorporado en la revisión de la OMS de 2016 (42), que se asocia con mal pronóstico y sólo puede detectarse de forma fiable con el análisis de la expresión génica.

De los 179 pacientes diagnosticados con LLA por los autores en los últimos ocho años, solo 65 presentaron datos citogenéticos e inmunofenotípicos compatibles con el tipo Ph-like (excluyen pacientes con fusiones mutuamente excluyentes y en los que no detectan reordenaciones del gen *CRLF2*, aunque también incluyen en el estudio cuatro de los seis pacientes con reordenación del *CRLF2* para validar los resultados). De esos 65, se evaluó la reordenación del gen *CRLF2* mediante FISH en 59 y se realizó secuenciación por NGS en 34 pacientes (la mitad en los que se quería hacer por falta de muestra, e incluyendo cuatro de los seis pacientes con *CRLF2-r*). La expresión de *TSLPR* se determinó en 20 pacientes. Los autores confirman la presencia de aberraciones tipo Ph like en nueve pacientes, tres de los cuales fueron identificados mediante NGS: dos con fusiones en la vía de señalización JAK-STAT (*EPOR/IGH* y *PCM1/JAK2*), y otro en la vía de señalización ABL (*TRF2/PDGFRb*). Con la técnica FISH, se confirmaron las reordenaciones de los genes *IGH*, *JAK2* y *PDGFRb*.

El algoritmo que se propone para detectar este tipo de pacientes se muestra en la siguiente figura (ver Figura 18).



**Figura 18.** Algoritmo propuesto para reconocer LLA tipo Ph-like combinando los métodos diagnósticos rutinarios disponibles, de Podgornik *et al.* (94).

Por último, el estudio de Lange *et al.* (97) evalúa la incorporación de la NGS del ARN en el algoritmo de identificación del tipo de leucemia que presentan los pacientes. Los autores utilizaron una única plataforma para secuenciar el transcriptoma con el fin de detectar anomalías relevantes y comparar los resultados obtenidos mediante técnicas convencionales. Se utilizó el panel de *TruSight RNA Pan-Cancer* (Illumina) (secuenciación del ARN de 1385 genes) para secuenciar el ARN de 136 pacientes diagnosticados con alguna neoplasia hematológica.

Se utilizó el *machine learning* con los datos del perfil de expresión para clasificar la leucemia (método que se denominó RANKING). Se detectaron los genes de fusión y se cuantificó la sobreexpresión de los genes *EVI1*, *CCND1* y *BCL2*. Se analizaron los SNVs/*indels*, utilizando un panel virtual mielode (54 genes) o linfoide (72 genes) según el tipo de paciente.

Para la validación del análisis de SNV/*indels*, se utilizaron 63 de las muestras que contaban con datos previos de RT-PCR o secuenciación Sanger para *NPM1*, *CEBPA* y *KIT* (n = 35) o con el panel TMSP (n = 28). También se analizó un set de 27 muestras en las que no se habían detectado SNVs o *indels* previos, y las variantes identificadas fueron secuenciadas por Sanger, MLPA o ddPCR en ADN o ARN (según VAF mayor o menor al 10 %). Para la detección de genes de fusión, se utilizaron las primeras 40 muestras de 136, con las que se validaron los límites para la interpretación de los datos. Un grupo de 96 pacientes fue analizado posteriormente como set de aplicación de RANKING, aplicando los criterios que fueron definidos con los resultados obtenidos con las primeras 40 muestras. Los genes de fusión adicional fueron confirmados cuando fue posible mediante PCR y FISH.

Para la detección de sobreexpresión de genes, se utilizaron 84 muestras de las 136 en las que se conocía el tipo de neoplasia hematológica.

RANKING predijo de forma correcta la clasificación de todos los pacientes con LMA y LLA, mejorando la clasificación de tres pacientes. Comparando los resultados con los obtenidos por técnicas convencionales, solo se perdió una variante, y la sobreexpresión de *BCL3* no se observó debido a que la t(14;18)(q32;q21) solo se encontraba en el 2 % de las células.

Este método identificó también seis genes de fusión adicionales y la sobreexpresión de *CCND1*, debido a la t(11;14)(q13;q32) en dos muestras.

Los autores concluyen que la combinación de la secuenciación dirigida de ARN y el flujo del análisis de los datos pueden mejorar la detección de variantes relevantes, y que los patrones de expresión pueden ayudar a establecer la clasificación de las neoplasias hematológicas.

#### IV.2.1.4. Validez externa de la NGS y comparación de diferentes paneles de genes en el diagnóstico de las leucemias agudas

Son cinco artículos los que se han incluido en este apartado. En el primer estudio, se valora la concordancia de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios que utilizan el mismo panel y la misma plataforma de secuenciación (75). En el segundo estudio, cada laboratorio utiliza la plataforma y el panel de genes que más le conviene, evaluando si todas las variantes de las muestras secuenciadas son detectadas (76). En los dos estudios siguientes se compara el rendimiento de diferentes paneles de genes en diferentes centros, pero con la misma plataforma de secuenciación (77, 78). Y, por último, en el quinto estudio se comparan diferentes paneles de NGS y su capacidad para detectar las mismas alteraciones genéticas (79).

En cuanto al tipo de leucemia aguda, tres se centran en la LMA (75-77), uno en las neoplasias mieloides (79) y solo uno en la LLA pediátrica (78). También cabe señalar que tres de los cinco estudios fueron realizados en España (76, 78, 79).

En el caso de la LMA, Sargas *et al.* (76) reportan los resultados del Programa Español de Tratamientos en Hematología (PETHEMA), un grupo de investigación constituido por hematólogos clínicos e investigadores de laboratorio de la red de hospitales del sistema sanitario público español cuyo interés se encuentra en llevar adelante proyectos de investigación médica en el entorno de la especialidad de Hematología y Hemoterapia. Este grupo alcanzó un consenso con relación a los criterios de calidad de la NGS y al reporte de las variantes para proporcionar resultados moleculares a los hospitales de forma estandarizada, demostrando que esta estrategia era factible en el contexto de un grupo científico.

Para la validación cruzada, se realizaron dos rondas: en la primera (pre-estandarización), se describió la situación basal de los laboratorios de referencia. Para ello, se distribuyeron cuatro muestras (que incluían 24 variantes) que fueron secuenciadas mediante NGS según los protocolos de cada centro. En esta primera ronda, se encontró que la concordancia entre centros fue del 60,98 %, y que la variabilidad era importante en los genes seleccionados para la NGS y las condiciones de los laboratorios. La tasa de error global fue del 39,02 %, siendo mayor para variantes con un VAF menor del 10 % (77,04 %  $\pm$  6,98 vs. 18,56 %  $\pm$  29,24,  $p < 0,001$ ).

Con esos resultados, y tras establecer unos criterios mínimos de calidad, se realizó una segunda ronda de validación. Los criterios de calidad fueron una profundidad de 1.000x y una uniformidad mayor al 85 %. Para el repor-

te de variantes se estableció un VAF mínimo de 5, con la excepción de variantes patogénicas con fuerte evidencia clínica (como TP53 o FLT3), que también se reportaban si el VAF era superior al 1 %.

Se valoró la detección de variantes, el VAF y la dispersión entre los centros en seis muestras que presentaban 30 variantes (cinco con un VAF menor al 5 %).

La concordancia entre centros subió hasta el 85,57 %, y la tasa de error se redujo en un 14,43 %, aunque fue significativamente mayor para las variantes con un VAF menor al 5 % ( $28,57 \% \pm 14,28$  vs.  $12,27 \% \pm 14,39$ ,  $p = 0,031$ ), y todos los centros clasificaron correctamente las variantes detectadas.

Para la validación clínica, se incluyeron en el estudio 823 muestras de 751 pacientes con LMA, aunque no se señala cuántas muestras analiza cada laboratorio y si los resultados fueron validados mediante secuenciación Sanger cuando fuera posible.

Los autores destacan que esta estrategia de cooperación a nivel nacional, por la que se ha establecido una red diagnóstica molecular avanzada en siete laboratorios experimentados con NGS y que cuenten con una metodología de análisis y reporte armonizada, es factible en el contexto de un grupo científico.

| Table S1. Gene panels employed by central laboratories. |                                      |                            |                                   |                              |
|---|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Gene  | HULF, HUVR                           | H12O                       | HUDN, HURS                        | UNAV, HUS                    |
|   | AML OncoPrint Research (Ion Torrent) | Custom panel (Ion Torrent) | Myeloid Tumor Solution (Illumina) | Custom PanMyeloid (Illumina) |
| ASXL1   | All exons                            | All exons                  | 9, 11, 12                         | 12                           |
| CEBPA   | All exons                            | All exons                  | All exons                         | All exons                    |
| FLT3  | 8, 11 to 16, 20, 23, 24              | All exons                  | 13 to 15, 20                      | 14 to 16, 20                 |
| IDH1  | 4                                    | All exons                  | 4                                 | 4                            |
| IDH2  | 4                                    | All exons                  | 4                                 | 4                            |
| NPM1  | 11                                   | All exons                  | 10, 11                            | 10, 11                       |
| RUNX1   | All exons                            | All exons                  | All exons                         | All exons                    |
| TP53  | All exons                            | All exons                  | All exons                         | All exons                    |
| ABL1  | 4 to 9                               | -                          | 4 to 9                            | -                            |
| BRAF  | 15                                   | -                          | 15                                | -                            |
| CALR  | All exons                            | All exons                  | 9                                 | 9                            |
| CBL   | 8, 9                                 | All exons                  | 8, 9                              | 8, 9                         |
| CSF3R   | 14, 17                               | All exons                  | All exons                         | 14 to 17                     |
| DNMT3A  | 11 to 23                             | All exons                  | All exons                         | All exons                    |
| ETV6  | All exons                            | All exons                  | All exons                         | All exons                    |
| EZH2  | All exons                            | All exons                  | All exons                         | All exons                    |
| GATA2   | 4, 5                                 | -                          | -                                 | 2 to 6                       |
| HRAS  | 2, 3                                 | -                          | 2, 3                              | -                            |
| JAK2  | 12 to 15                             | All exons                  | All exons                         | 12 to 15                     |
| KIT   | 2, 8 to 11, 13, 17, 18               | All exons                  | 2, 8 to 11, 13, 17, 18            | 2, 8 to 11, 13, 14, 17, 18   |
| KRAS  | 2 to 6                               | All exons                  | 2, 3                              | 2 to 4                       |
| MPL   | 3 to 4, 10, 12                       | All exons                  | 10                                | 3 to 6, 10, 12               |
| NRAS  | 2 to 4                               | All exons                  | 2, 3                              | 2 to 4                       |
| PTPN11  | 3, 12, 13                            | -                          | 3, 7, 13                          | 3, 7, 13                     |
| SETBP1  | 4                                    | All exons                  | 4                                 | 4                            |
| SF3B1   | 14 to 21                             | All exons                  | 10 to 16                          | 11 to 16                     |
| SRSF2   | 1                                    | All exons                  | 1                                 | 1                            |
| TET2  | All exons                            | All exons                  | All exons                         | All exons                    |
| U2AF1   | 2, 6                                 | All exons                  | 2, 6                              | 2, 6                         |
| WT1   | 7, 9                                 | All exons                  | 6 to 10                           | 7, 9                         |

HULF: Hospital Universitario La Fe, HUVR: Hospital Universitario Virgen del Rocío, H12O: Hospital Universitario 12 de Octubre, HUDN: Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, HURS: Hospital Universitario Reina Sofía, UNAV: CIMA LAB Diagnostics, HUS: Hospital Universitario de Salamanca.

**Figura 19.** Paneles de genes utilizados por los laboratorios, de Sargas *et al.* (76)

Los laboratorios utilizaban las plataformas de secuenciación de Ion Torrent o de Illumina. La valoración de su rendimiento se realiza teniendo en cuenta la tasa de error y la desviación estándar del VAF, y no se observaron diferencias en ningún caso.

En relación con el diagnóstico de la LMA, en otro artículo realizado en Australasia (77) se compararon los resultados obtenidos por ocho laboratorios al secuenciar 10 muestras de aspirado de médula ósea de los mismos pacientes con LMA. En este caso, todos utilizaban la misma plataforma de secuenciación (plataforma Illumina). En cuanto a los paneles de genes, cuatro utilizaban paneles customizados y los cuatro restantes paneles comerciales (dos TSMP, uno MYS y el último el *FusionPlex Myeloid panel* (ArcherDx)).

Aunque había una variabilidad significativa en los genes incluidos en los paneles (media de 39, rango de 9 a 70), los laboratorios tenían que testar un mínimo de nueve genes, incluyendo FLT3, NPM1, RUNX1, TP53, CEPBA y ASXL1, puesto que estos genes permiten clasificar cada muestra con los criterios ELN. Los genes DNMT3A, IDH1 y IDH2, también fueron incluidos en el conjunto mínimo de genes, por ser potencialmente útiles para la estratificación del riesgo o selección de dianas terapéuticas. De los ocho laboratorios, cuatro utilizaban un *pipeline* bioinformático customizado y los cuatro restantes *pipelines* comerciales.

Con relación a la identificación y cálculo del *allelic ratio* de FLT3-ITD, la mayoría de los laboratorios realizaban electroforesis capilar. Cuando los datos de este test y los de la secuenciación masiva se combinaban, la concordancia de variantes génicas incluidas en la estratificación del riesgo de ELN era del 94 % (siendo menor la concordancia para las variantes que no se incluían en la estratificación de ELN). Cuando la concordancia se evaluaba incluyendo solo los laboratorios que secuenciaban el gen, la mayoría (70 %) de las variantes era concordante en un 100 %.

El otro estudio sobre la validez externa de la secuenciación masiva en LMA es el de Haslam *et al.* (75). Los autores evalúan los resultados obtenidos por tres laboratorios diagnósticos de Reino Unido e Irlanda con un panel de genes comercial para la LMA (*Ion Ampliseq AML Panel*), utilizando la plataforma de secuenciación *Ion PGM*. En este caso, las mutaciones de los genes NPM1 y FLT3-ITD se valoran mediante PCR y electroforesis capilar.

Se distribuyeron seis muestras de pacientes con LMA a cada centro, que utilizaron una plataforma común de secuenciación, paneles y *pipelines* bioinformáticos. Parte de las muestras (QC#3, QC#5 y QC#6) fueron secuenciadas de forma duplicada en los centros 1, 3 y 3, respectivamente, para valorar tanto el rendimiento inter como intra-laboratorio.

La profundidad media de lectura por muestra fue de 2.725x (rango de 629 a 5.600). Se detectaron un total de 16 mutaciones somáticas en las seis muestras de LMA, con una media de 2,7 mutaciones por muestra (rango de 1 a 4). 15 de las 16 mutaciones fueron identificadas por los tres centros. Las

frecuencias alélicas oscilaron entre el 5,6 y 53,3 % (mediana de 44,4 %), con un alto nivel de concordancia de la frecuencia entre centros para las mutaciones detectadas.

El análisis por duplicado de las muestras mostró la concordancia entre las carreras, con el mismo número de variantes detectadas a frecuencias similares por todos los centros. Los autores señalan que la incorporación de este panel de genes complementaría y potenciaría las herramientas disponibles para identificar mutaciones relevantes diagnósticas y pronósticas en pacientes con LMA. Como una de las limitaciones es el pequeño número de genes incluidos, la incorporación de un mayor número de genes mutados en LMA mejoraría su aplicabilidad.

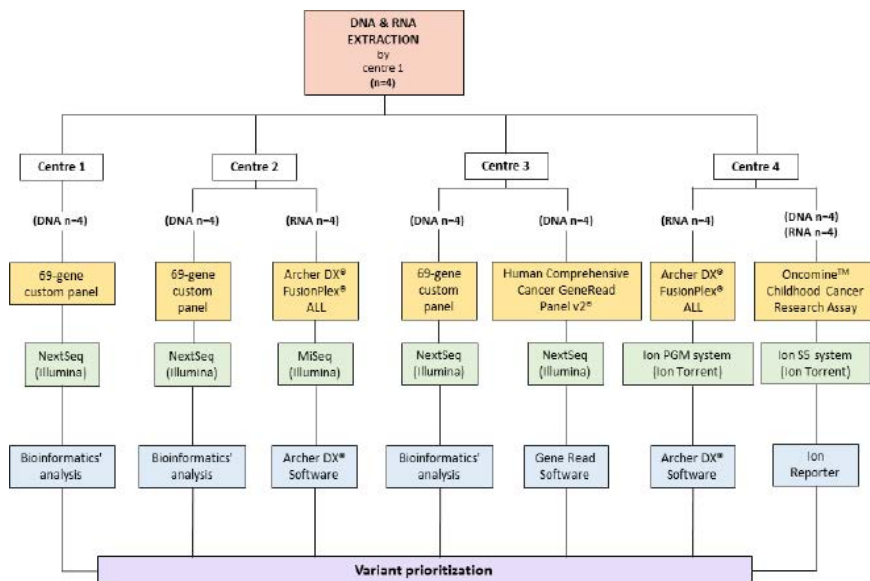
En relación con la LLA, solo se ha identificado un artículo (78). Se trata de un proyecto colaborativo del Comité Biológico del grupo de Leucemia de la Sociedad Española de Hematología Pediátrica y Oncología (SE-HOP) planteado como base para armonizar la implementación de un panel de NGS para el estudio de la LLA de célula B precursora (BCP-ALL en inglés) pediátrica en diferentes centros nacionales. En este estudio se comparan los resultados de secuenciación de las muestras de cuatro pacientes con un panel customizado frente a tres paneles comerciales (*OncoPrint Childhood Cancer Research Assay* (Thermo Fisher Scientific); *FusionPlex ALL*, y el panel *Human Comprehensive Cancer Panel GeneRead Panel v2*© (Qiagen)), con el fin de describir los pros y los contras de cada panel y mostrar los puntos críticos en la elección del panel para mejorar el diagnóstico de la LLA-B.

Para valorar el rendimiento de los diferentes paneles, se distribuyó el ADN y ARN de cuatro pacientes con LLA-B, que habían sido previamente caracterizados por el centro 1 por métodos convencionales. Para evaluar la armonización entre diferentes centros en la implementación de la NGS, las muestras fueron enviadas a los centros 2, centro 3 y centro 4.

A diferencia de Sargas *et al.* (76), los autores no consensuaron de forma previa a iniciar el estudio los *pipelines* bioinformáticos y la manera de hacer el reporte de los resultados.

El panel customizado fue diseñado para cribar variantes genéticas de tipo SNV y CNV. Se seleccionaron 69 genes de interés para el diagnóstico, pronóstico o de interés terapéutico para la LLA-B, de acuerdo con la literatura.

En la siguiente figura se resume el proceso de secuenciación seguido por cada centro.



**Figura 20.** Proceso de secuenciación seguido por cada centro (obtenida de Sargas *et al.* (76))

En los cuatro paneles se solapaban 14 genes involucrados en la LLA para la detección de SNVs (BRAF, CREBBP, CRLF2, EZH2, FLT3, IL7R, JAK1, JAK2, JAK3, KRAS, NF1, NRAS, PAX5, y PTPN11).

Tres de los cuatro paneles fueron diseñados para mejorar el diagnóstico de la LLA-B. En cuanto a los pros y los contras de cada panel, el panel customizado fue el más específico en detectar mutaciones en la LLA pediátrica, pero no cubría los genes de fusión. El *FusionPlex ALL* está específicamente diseñado para la detección de genes de fusión en LLA. El panel Oncomine™ Childhood Cancer Research Assay (OCCRA) está diseñado para identificar mutaciones y fusiones en cáncer pediátrico (incluyendo tumores sólidos y hematológicos). Por último, el panel *Human Comprehensive Cancer GeneRead Panel v2* fue diseñado para estudiar diferentes tipos de cáncer. Así, aunque dos de los cuatro paneles (OCCRA y *FusionPlex ALL*) detectaban genes de fusión (con 21 genes de fusión comunes), el diseño de los cuatro paneles no incluía el estudio de genes de fusión altamente relevantes en el diagnóstico de LLA-B.

Los autores de este estudio señalan la importancia de evaluar la composición de los paneles antes de implementarlos en los hospitales.

La interacción entre los clínicos y los expertos moleculares en este estudio colaborativo: 1) ayudó a definir un set mínimo de genes útiles en la

LLA-B pediátrica; 2) fomentó la investigación colaborativa; y, 3) proporciona un paso hacia el consenso en la NGS, para optimizar su uso en beneficio de los pacientes.

Aunque los autores señalan que el rendimiento de los paneles fue bueno en diferentes centros y plataformas, se observa, por ejemplo, que no todas las variantes fueron detectadas con el panel customizado en todos los centros.

Por último, se ha identificado un estudio (79) sobre el rendimiento diagnóstico de cuatro paneles diseñados para el estudio de neoplasias mieloides desde el punto de vista técnico y clínico. Aunque participan varios centros, no se trata de un estudio de implementación de la secuenciación ni de la validez externa de un panel, sino de la comparación entre diferentes paneles de genes.

Los autores encuentran que existe riesgo de detectar mutaciones diferentes según el panel que se escoja, y que esto se explica por el diseño del panel y el análisis de los datos de secuenciación.

En este estudio, se seleccionaron 32 muestras de médula ósea de pacientes con neoplasias mieloides (17 con LMA, siete con neoplasias mieloproliferativas (MPN en inglés), seis con síndrome mielodisplásico (MDS en inglés) y dos con leucemia mielógena crónica (CMML en inglés)). 17 de las muestras fueron analizadas con el panel TSMP, 16 con *SureSeq Core MPN Panel* y *SureSeq AML Panel* (SureSeq) (Oxford Gene Technology), 15 con el panel MYS y las 32 muestras fueron testadas con el panel customizado *Pan-Myeloid Panel (PMP)* de la universidad de Navarra y del Hospital Universitario de Salamanca.

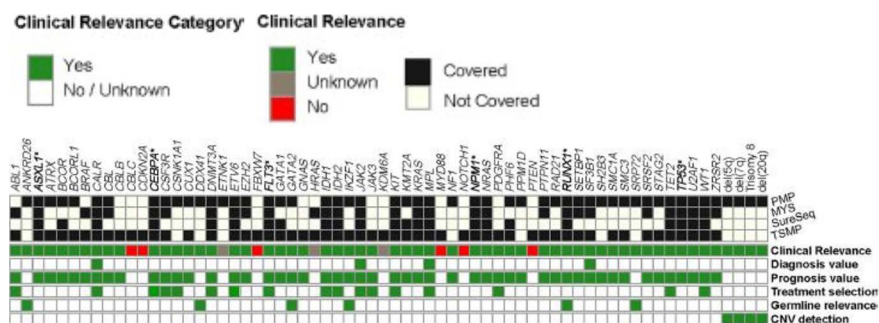
De los cuatro paneles a estudio, uno se basa en amplicones (TSMP) y los tres restantes en captura por hibridación. La preparación de las librerías duró un día para los paneles TSMP y *SureSeq*, pero para los paneles PMP y MYS fueron necesarios dos días.

Aunque los paneles eran compatibles con el secuenciador MiSeq, el tiempo de secuenciación fue diferente para cada panel por el número necesario de ciclos: 50h, (250x2 ciclos) para el que más tiempo necesitaba (panel PMP) y menos de 24h (151x2 ciclos) para el panel más rápido (*SureSeq*) (ver Figura 21).

|                              | PMP (SOPHIA GENETICS) | MYS (SOPHIA GENETICS) | SureSeq (OGT)                              | TSMP (Illumina) |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|--|-----------------|
| Number of samples            | 32                    | 15                    | 16   | 17              |
| Type of library preparation  | Hybridization capture | Hybridization capture | Hybridization capture                      | Amplicon-based  |
| Wet-lab working time (days)  | 2                     | 2                     | 1  | 1               |
| Possibility of customization | Yes                   | Yes                   | Yes  | No              |
| Sequencing cycles and time   | 251cycles/50h         | 251cycles/48h         | 151cycles/24h                              | 201cycles/40h   |
| Analysis Software            | SOPHIA DDM            | SOPHIA DDM            | Under development at the time of the study | Variant Studio  |

**Figura 21.** Características del rendimiento de los paneles (Aguilera-Díaz et al. (79))

Los cuatro paneles incluyeron los mismos 19 genes relevantes en neoplasias mieloides, ampliamente descritos en diferentes estudios: ASXL1, CALR, CEBPA, DNMT3A, ETV6, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2, TP53, U2AF1, WT1. Sin embargo, las regiones diana diferían entre los cuatro paneles. El diseño de los paneles y la relevancia clínica de los genes se presentan en la figura 22:



**Figura 22.** Genes incluidos en cada panel y relevancia clínica de cada uno de ellos

El resto de los genes incluidos en los paneles eran útiles por diferentes motivos. El panel *SureSeq* no incluía los genes esenciales para el estudio de MDS, pero sí para LMA y MPN. El panel MYS fue diseñado para caracterizar el estado mutacional de MDS, MPN y LMA, pero no incluye genes relevantes como los reguladores de la transcripción GATA2, IKZF1, y PHF6. El panel TSMP incluía algunos genes relevantes para neoplasias linfoides, como MYD88, NOTCH1 y PTEN y era el único que incluía genes relevantes mieloides como CSNK1A1, NF1, PPM1D, y SH2B3, aunque las mutaciones recientes descritas en exones de FLT3, solo las cubre el panel de *SureSeq* AML.

Se define como error de secuenciación a aquellas variantes con un VAF <5 %, presentes de forma recurrente en el 30 % o más de las muestras analizadas por cualquiera de los paneles, y localizadas en una región repetitiva. Se detectaron 20 errores de secuenciación: ocho presentes en todos los paneles y cuatro en más de un panel. El panel TSM, basado en amplicones, era el que mayor número de errores de secuenciación (n = 15) presentaba, seguido de PMP (n = 6), *SureSeq* AML (n = 3) y panel MYS (n = 2).

Las variantes fueron clasificadas por dos genetistas en base a su relevancia clínica en las neoplasias mieloides y solo se mantuvieron las variantes con un VAF de 5 % y una cobertura mínima de 100 lecturas, para evitar posibles errores de secuenciación.

Se observó que había diferencia en la profundidad de cobertura de los paneles. Además, se identificaron 11 variantes clínicas discordantes entre paneles, con una tendencia a la pérdida de inserciones largas.

Los datos demuestran que hay un riesgo alto de encontrar diferentes mutaciones dependiendo del panel utilizado, debido al diseño y método de análisis utilizado. Los autores señalan que la secuenciación masiva de los genes CEBPA, CALR y FLT3 sigue siendo un reto en comparación con las técnicas convencionales y que es difícil armonizar el tiempo recomendado para el reporte de los resultados siguiendo las recomendaciones actuales de ELN, por lo que las técnicas moleculares convencionales siguen siendo necesarias para el correcto diagnóstico de las neoplasias mieloides por ahora.

En el Anexo IV se encuentra la tabla descriptiva de todos los estudios individuales incluidos y en el Anexo V, la valoración de la calidad de los estudios incluidos siguiendo los criterios más relevantes del marco EGAPP.

#### IV.2.1.5. Resumen de los paneles incluidos en los estudios y sus características

En el Anexo VI se ha incluido una tabla en la que se resumen los paneles comerciales que muchos de los estudios incluidos han utilizado, así como las características más relevantes de los mismos.

### IV.2.2. Estudios sobre eficiencia de la NGS

Aunque no se seleccionó ningún estudio para su análisis, de los tres estudios elegidos para la lectura a texto completo (109-111) se pudo extraer algún aspecto económico. Así, en el estudio de Tan Ds *et al.* (109) se describe el marco regulatorio y la cantidad reembolsada por la utilización de la NGS en procesos diagnósticos en diferentes países (Ver la tabla 1).

**Tabla 1. Marco regulatorio y opciones de reembolso de procesos diagnósticos basados en NGS en diferentes países**

| País           | Marco regulatorio   | Cantidad reembolsada  |
|----------------|---|---|
| Estados Unidos | La FDA regula los diagnósticos basados en NGS como un dispositivo de clase II que requiere PMN 510 (k) o dispositivo de clase III mediante PMA. La mayoría de los CDx son dispositivos de clase III que requieren PMA y datos clínicos de eficacia/seguridad. | Hasta 3.500 \$ por prueba para diagnóstico avanzado de cáncer.                            |
| Reino Unido    | La MHRA espera seguir el nuevo IVDR de la UE. Los diagnósticos basados en NGS se consideran dispositivos de clase C que requieren marcado CE; sin declaración, requieren datos clínicos que demuestren seguridad y eficacia.                                  | Reembolso total, estimado en alrededor de 500 \$ por prueba.                              |
| Francia        | Bajo el nuevo marco EU IVDR, se espera que los diagnósticos basados en NGS estén regulados como dispositivos de Clase C que requieren una marca CE; sin declaración, requieren datos clínicos que demuestren seguridad y eficacia.                            | Reembolso total, estimado en alrededor de 700 \$ por prueba.                              |
| Australia      | Bajo el marco de la TGA, se espera que los diagnósticos basados en NGS estén regulados como IVD de Clase III (similar a CDx). La propuesta también pide auditorías obligatorias y su inclusión en el ARTG.  | No especificado, se basará en la rentabilidad según la evaluación del MSAC.               |
| Japón          | PMDA regula los diagnósticos basados en NGS como dispositivos médicos de clase II o III; el rendimiento clínico de la prueba de CGP es evaluado por un panel de expertos y la utilidad clínica se establece a través de la implementación.                    | Reembolso de hasta el 70 %, estimado en alrededor de 4.000 \$ por prueba.                 |
| Corea          | MFDS regula los diagnósticos basados en NGS como dispositivos de clase II o III, similar a la FDA de EE.UU. la mayoría de los IVD requieren pruebas adicionales a los estándares de productos coreanos;   | Se espera un reembolso de hasta el 80 % si se incluye en la lista de reembolsos del MoHW. |

.../...

.../....

| País     | Marco regulatorio  | Cantidad reembolsada  |
|----------|--|---|
| Singapur | El borrador de la guía de HSA regula los diagnósticos basados en NGS como IVD, y el borrador se actualizará después de la consulta y los comentarios de las partes interesadas en el segundo semestre de 2019. Se requiere documentación de métodos, análisis de datos, estudios preclínicos y estudios clínicos, así como una evaluación basada en evidencia para justificar la inclusión de genes. | Limitado a alrededor de 430 \$ en MediSave para todos los diagnósticos de cáncer, aunque la cantidad es insuficiente ya que las imágenes y otros diagnósticos a menudo agotan este límite de gastos |

Dispositivos médicos de clase I, riesgo bajo a moderado (la mayoría no requiere aprobación regulatoria); Dispositivos médicos de clase II, riesgo moderado a alto (algunos requieren pruebas del producto / datos clínicos); Dispositivos médicos de clase III: alto riesgo (la mayoría requiere ensayos clínicos).

**Leyenda siglas:**

PMM: notificación previa a comercialización (*pre-market notification*); PMA: autorización previa a comercialización (*pre-market approval*); CDx: tests de diagnóstico complementario (*companion diagnostics*); MHRA: Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios del Reino Unido (*Medicines & Healthcare products Regulatory Agency*); IVDR: Reglamento Europeo de Diagnóstico In Vitro (*in vitro diagnostic medical devices regulation*); UE: Unión Europea; TGA: Administración de productos terapéuticos de Australia (*Therapeutic Goods Administration*); IVD: diagnóstico in vitro (*in vitro diagnosis*); ARTG: Registro Australiano de Productos Terapéuticos (*Australian Register of Therapeutic Goods*); MSAC: Comité Asesor de Servicios Médicos de Australia (*Medical Services Advisory Committee*); PMDA: Agencia de productos farmacéuticos y dispositivos médicos de Japón (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*); CGP: perfil genómico completo (*comprehensive genomic profiling*); MFDS: Ministerio de Seguridad Alimentaria y Farmacéutica de Corea (*Ministry of Food and Drug Safety*); MoHW: Ministerio de Salud y Bienestar de Corea (*Ministry of health and welfare*); HSA: autoridad nacional para la regulación de productos sanitarios de Singapur (*Health Sciences Authority*).

En el estudio de Gupta DG *et al.* (110) se indica el coste aproximado de algunas de las técnicas con las que se compara la NGS, como la PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR en inglés) y los *microarrays* de expresión. Se trata de un estudio realizado en India, y se señala que el coste de los *micorarrays* realizados en 12 casos fue de 6.892 dólares americanos, es decir, de 580 \$ por muestra. En cuanto al costo de la cuantificación por RQ-PCR de 9 genes fue de 42 \$ por muestra.

En el último estudio (111), se describe cómo se debería organizar la implementación de la NGS en el diagnóstico de las neoplasias mieloides, realizando una serie de consideraciones con relación al diseño, implementación y utilidad clínica de la NGS en neoplasias mieloides.

Los autores señalan que, de forma ideal, un panel basado en NGS debería incluir genes clínicamente relevantes con alta S para detectar variantes de baja frecuencia, con un tiempo de respuesta rápido para facilitar de forma conveniente la toma de decisiones sobre el manejo de los pacientes (111). Existe un número creciente de paneles comercializados disponibles que cubren los genes relacionados con las neoplasias mieloides, como sugiere la OMS (12) y la clasificación ELN (13). Estos paneles prediseñados son una herramienta relativamente fiable para muchos laboratorios, que prefieren productos ya listos para ser utilizados y que pueden ser ejecutados con una inversión mínima. Sin embargo, el diseño de un panel específico supone un mayor beneficio, incluyendo la flexibilidad de adición de nuevos genes de interés específicos para las necesidades de los pacientes y de investigación, así como la optimización tecnológica y analítica diseñada para la infraestructura e instrumentos de la institución. Además, como todas las pruebas de laboratorio modernas, los paneles de NGS requieren de acreditación por organismos relevantes. Este proceso exige una alta inversión en recursos humanos y económicos que podrían no ser viables para todos los laboratorios de diagnóstico clínico, lo que enfatiza aún más la necesidad de un sistema centralizado (111).

La NGS no se financia ni reembolsa en muchos sistemas sanitarios del mundo, y para que sea utilizada de forma amplia, debería ser coste-efectiva y eficiente para ser utilizada a gran escala (111). Para implementar esta tecnología, es necesaria una infraestructura de alto grado y un despliegue informático. Por ello, el argumento a favor del uso centralizado por regiones en laboratorios expertos es fuerte, ya que se tendrían resultados uniformes y fiables y capacidad de secuenciar muchas muestras de forma eficiente.

### IV.2.3. Estudios sobre barreras, valores y preferencias

En la búsqueda realizada sobre las barreras, valores y preferencias para la implementación de la NGS en la práctica clínica habitual para el diagnóstico de las leucemias agudas, no se han identificado estudios que abordaran de forma específica estos aspectos (ni cuantitativos ni cualitativos). Sí se ha identificado una revisión narrativa sobre los retos de introducir la NGS en el diagnóstico de neoplasias mieloides de uso rutinario (115), y entre los estudios incluidos en el análisis de la validez externa de la NGS (que también se han identificado en esta búsqueda), dos estudios españoles describen cómo se ha establecido una colaboración a nivel nacional de diferentes laboratorios con el fin de estandarizar la utilización de la NGS en pacientes con leucemia aguda, tanto con LMA (76) como con LLA-B pediátrica (78).

En la revisión narrativa de Bacher *et al.* (105), se señalan los retos que existen a diferentes niveles para la implementación de la NGS:

1. Retos relacionados con la validez científica de los nuevos marcadores de NGS, como la distinción entre mutaciones relacionadas con la leucemia o con polimorfismos genéticos y mutaciones pasajeras, entre mutaciones somáticas y la hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP en inglés) o la discriminación entre mutaciones somáticas o variantes genéticas germinales patogénicas.
2. Retos técnicos, relacionados con la detección de alteraciones genéticas verdaderas (y no artefactos del proceso de NGS, en la PCR, la secuenciación, etc.).
3. Aspectos económicos y organizativos. El coste de una prueba simple de NGS dependerá del número de genes que se vaya a secuenciar, así como el tiempo necesario para procesar la información. En la actualidad, el reto se encuentra en iniciar el tratamiento diana con IDH1, IDH2 o inhibidores de FLT3 lo antes posible y por ello los laboratorios siguen realizando pruebas convencionales (análisis de fragmentos para FLT3-ITD o TKD) de forma paralela a la NGS, aunque ésta proporcione los mismos resultados unos días más tarde. Esto aumenta el esfuerzo y los costes de los análisis moleculares. Por ello, es necesario establecer algoritmos de buenas prácticas que eviten realizar análisis por duplicado.
4. Aproximaciones interdisciplinarias. Para una correcta interpretación de la variedad de resultados en el contexto del diagnóstico hematológico, es esencial la interacción constante entre los científicos de laboratorio, los técnicos y los clínicos.

Para establecer una red nacional de laboratorios de referencia para la NGS en LMA en el contexto del grupo científico PETHEMA, los laboratorios debían de cumplir con los siguientes criterios: 1) eran laboratorios para los que se podía asegurar un apoyo logístico apropiado; y, 2) contaban con una localización geográfica estratégica según la densidad de población y distancia (76).

Cada laboratorio pudo escoger la plataforma y el panel de NGS que iban a utilizar en el estudio, con el único requisito de incluir ocho genes obligatorios (por su impacto en la selección del tratamiento y estratificación del riesgo: ASXL1, CEBPA, FLT3, IDH1, IDH2, NPM1, RUNX1, y TP53), así como el mayor número posible de los 22 genes clasificados como recomendados. Tras la valoración inicial, se observó que era necesario consensuar un conjunto de genes relevantes para la LMA y unos criterios de calidad mínimos para la secuenciación, que fueron una profundidad de 1.000x y una uniformidad mayor al 85 %. Para el reporte de variantes, se estableció como punto de corte un VAF mínimo de 5 %, a excepción de las variantes patogénicas con evidencia clínica fuerte (como TP53 o FLT3), que también eran reportadas si el VAF era superior al 1 %.

Los autores observaron que, al implementar estos criterios, la concordancia de los resultados aumentaba y la tasa de error se reducía para todas las variantes, de ahí la importancia de consensuar y estandarizar los procesos entre los laboratorios que pueden formar parte de la red para ofrecer un servicio fiable.

En el estudio de Vega-García *et al.* (78), estudio colaborativo del Comité Biológico del grupo de Leucemia de la SEHOP, se pretendía armonizar la implementación de un panel de NGS en el estudio de la LLA-B pediátrica en diferentes centros españoles. Los autores identifican los pasos críticos de la NGS y las posibles aproximaciones para afrontarlos (78). Se señala la importancia de evaluar la composición de los posibles paneles de NGS antes de implementarlos en los hospitales, destacando la importancia de la interacción entre clínicos y expertos moleculares para definir un conjunto mínimo de genes relacionados con la LLA-B pediátrica y fomentar la investigación colaborativa.

Aunque en estos estudios no se mencionen los aspectos éticos, legales y sociales para realizar pruebas genéticas, los marcos de evaluación sí tienen en cuenta estos aspectos. Así, en el marco de la *National Academy of Science* (41), se señalan una serie de consideraciones que deberían ser tenidas en cuenta cuando se realizan pruebas genéticas, como la posibilidad de que el riesgo genético identificado pueda ser compartido con otros familiares, el impacto que los resultados de las pruebas puedan tener en las decisiones

reproductivas y el potencial de los resultados para generar estigma o discriminación. Se señala que el rápido desarrollo de la tecnología genómica y la incertidumbre sobre las implicaciones que los resultados pueden tener en la salud aumentan las consideraciones éticas relacionadas con las desigualdades en el cuidado de la salud, con compartir los datos clínicos y el alcance del informe con los resultados que se han obtenidos a escala genómica.

En este marco se detalla que, cuando una persona tiene un diagnóstico de anomalía genética, el diagnóstico puede tener implicaciones para otros miembros de la familia (41). Así, las pruebas genéticas pueden ayudar a distinguir las mutaciones germinales de las somáticas, lo que puede tener sus implicaciones. En algunos estudios sobre la NGS en leucemia aguda, se ha analizado la posibilidad de que las mutaciones sean de origen germinal. Así, en el estudio de Kim *et al.* (99), los autores identifican mutaciones germinales en ocho de 95 pacientes con LMA, observando que la mitad de los casos tenían mutaciones en genes que suponían un mayor riesgo para otros cánceres. Por ello, señalan que habría que proporcionar un mayor consejo genético a estos pacientes y sus familiares, junto con la recomendación de seguimiento y de un programa de prevención (99).

En todo caso, la intención del consejo genético debería ser el de dar apoyo, pero no el de recomendar una acción en particular (41).

Otra razón de preocupación es el estigma y la discriminación a personas que tienen susceptibilidad genética. Los seguros privados pueden utilizar la información genética para tomar decisiones relacionadas con otro tipo de coberturas, como seguro de vida, etc. A este respecto, existe una preocupación real de discriminación por parte de los seguros a pacientes que participan en ensayos clínicos que incluyen pruebas genéticas.

Se señala también la potencial existencia de desigualdades en la atención sanitaria debido a que la mayoría de los estudios de variantes genéticas se han realizado en poblaciones europeas, por lo que puede que, en otras poblaciones, la presencia de esas variantes sugiera de forma errónea la presencia de un riesgo genético.

En relación con compartir los datos clínicos, las tecnologías de secuenciación y otras aproximaciones que testan el genoma identifican a menudo variantes nuevas y raras de significado clínico incierto. Estos resultados generan incertidumbre y limitan la utilidad clínica de la prueba. Así, en Szankasi *et al.* (101) de las 15 mutaciones adicionales que la NGS identificó en el gen BCR-ABL1, solo una era de significado incierto porque no había sido reportada previamente en pacientes resistentes a TKI.

Resolver esa incertidumbre es un reto importante para la genética clínica, para lo que se necesitan estudios observacionales longitudinales que demuestren una asociación entre las variantes genéticas y los resultados clínicos (41).

Por último, se señala que una de las consecuencias de las pruebas de WGS y WES es el potencial de producir gran cantidad de información que no es directamente relevante a la pregunta clínica para la que se realiza la prueba, pudiendo generar información secundaria sobre susceptibilidad al cáncer, arritmias heredadas y un amplio abanico de otras condiciones genéticas, dependiendo del análisis que se realice de la secuencia de ADN, por lo que las preguntas clave serían: el alcance del consentimiento informado; la opción de los pacientes para conocer resultados secundarios; si los resultados de condiciones que debutan en edad adulta deberían ser reportados en el caso de los niños; y si el análisis de dianas secundarias debería realizarse en pacientes que han declinado conocer los resultados (41).

En cuanto a los valores y preferencias tanto de profesionales sanitarios como de pacientes, aunque no se han identificado estudios específicos en leucemia aguda, sí se han encontrado tres estudios sobre los valores y preferencias de pacientes con cáncer y oncólogos acerca del uso de la NGS. En una revisión reciente en relación con el conocimiento y las expectativas de pacientes y oncólogos sobre la NGS multigénica tumoral, se señala que la comprensión y expectativas que tenían a menudo los pacientes con la NGS no eran realistas (112), por lo que es importante que éstos entiendan de forma clara la utilidad clínica real de esta prueba diagnóstica. También se señala que los oncólogos deben asegurarse que ellos mismos tienen suficiente conocimiento de los beneficios y limitaciones de la NGS y que deben proveer a sus pacientes con recursos educativos apropiados, además de proporcionar información clara sobre la posibilidad e implicaciones de los resultados secundarios que puedan ser obtenidos por la NGS (112).

En otro estudio reciente sobre la confianza de los oncólogos médicos con las pruebas genómicas, más del 75 % de los que las utilizaban estaban moderadamente o muy convencidos de utilizar los resultados de paneles multimarcadores tumorales para guiar el manejo del paciente. Los oncólogos tenían más confianza en utilizar pruebas de genes únicos y menor confianza en la WGS o de la WES (113).

Por último, también se ha tenido en cuenta otro artículo en el que se describen las conclusiones de un foro nacional sobre diagnóstico molecular del Reino Unido sobre las barreras que impiden la adopción de nuevas pruebas de diagnóstico molecular y las posibles soluciones al respecto (114). En este foro, se señaló que eran necesarios fondos y cambios en la forma de

establecer las tarifas, evaluaciones rigurosas de las pruebas disponibles para tratar de homogeneizar las pruebas diagnósticas utilizadas por los hospitales. También se identificó la necesidad de conocer mejor los requerimientos regulatorios y éticos para pruebas diagnósticas moleculares y sobre la acreditación de los laboratorios que las realizan, proponiendo una interacción desde el inicio del desarrollo de estas pruebas con los reguladores. Se consideró necesario contar también con una infraestructura informática robusta, tanto para el análisis y almacenamiento de datos como para un almacenamiento seguro. Otro de los puntos clave fue la necesidad de diseminar la información sobre los nuevos test a los profesionales sanitarios y una mejor comunicación al paciente sobre las pruebas moleculares, la necesidad urgente de formar al personal en el diagnóstico molecular y por último, la necesidad de monitorizar de forma obligatoria no solo el grado de adopción, sino también el impacto clínico que la utilización de la prueba diagnóstica ha tenido, como por ejemplo, el cambio en el tratamiento asignado gracias a los resultados (114).

# V. Discusión

## V.1. Papel de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas

Gracias a los nuevos datos genéticos de las últimas décadas que han supuesto el descubrimiento de la implicación de nuevas vías biológicas, el diagnóstico de las neoplasias hematológicas ha ido evolucionando hasta la integración de los datos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares, que son la base de la clasificación de la OMS (116).

Aunque el cariotipo/FISH siguen siendo técnicas esenciales para el diagnóstico, clasificación, estratificación pronóstica y tratamiento de las enfermedades oncohematológicas, la NGS puede ayudar a personalizar el manejo y tratamiento de estos pacientes. Hace años que los laboratorios realizan, además de técnicas citogenéticas convencionales, algunas técnicas de biología molecular clásica (secuenciación Sanger, sistema de mutación refractario a la amplificación por PCR (ARMS-PCR en inglés), qPCR con transcripción inversa (RT-qPCR en inglés)), necesarias tanto para establecer el diagnóstico como para la estratificación pronóstica de estos pacientes (116). Pero estudios recientes han observado, por ejemplo, que no todas las fusiones son detectadas por las técnicas convencionales porque quedan fuera del rango de *primers* o sondas diseñadas para tal fin. De hecho, hay estudios que describen la identificación de nuevos reordenamientos y genes de fusión no detectados mediante técnicas convencionales con valor pronóstico o clínico (98, 100).

Así, estudios en pacientes citogenéticamente normales han identificado mediante NGS alteraciones que no habían sido detectadas por técnicas convencionales y que han permitido una mejor estratificación del riesgo de los pacientes (88, 93, 100). En otros casos, el uso de la NGS ayuda a cambiar el diagnóstico o el riesgo (82, 104), permitiendo identificar pacientes que, por las mutaciones que presentan, pueden ser candidatos a ser incluidos en ensayos clínicos en marcha (82). Por ello, la NGS puede ayudar a definir y personalizar mejor el tratamiento de estos pacientes. Como ejemplo, en el caso de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica, hay muchos ensayos clínicos en marcha con terapias nuevas dirigidos a diferentes subgrupos genómicamente definidos (16).

También se han encontrado estudios en los que la NGS ha identificado con mayor S que la secuenciación Sanger mutaciones de resistencia a determinados tratamientos en pacientes con LLA tipo Ph+, lo que ha permitido

escoger tratamientos más eficaces en esos casos o cambiar la decisión de realizar o no un trasplante de médula ósea (95, 96, 101). La NGS es capaz de identificar la presencia de esas mutaciones incluso de forma previa a la recaída, lo que podría influir en la elección inicial del manejo del paciente al ayudar a identificar pacientes de alto riesgo en los que el cambio por otro tratamiento TKI no sería eficaz, y que debería ser evitado ahora que hay mejores alternativas disponibles (96). En el caso de pacientes pediátricos con LLA Ph+ (86), la NGS podría ayudar a estratificar mejor el riesgo de estos pacientes que presentan una respuesta heterogénea al tratamiento, analizando las CNVs para identificar marcadores de mal pronóstico, como las deleciones en el gen *IKZF1*, que llevarían a un mejor ajuste del tratamiento en cada caso. Así, en guías como la de la NCCN®, ya se recomienda el uso de la NGS en el diagnóstico de las LLA para identificar genes de fusión que se asocian con el fenotipo Ph-like, como los relacionados con *ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *CSF1R*, *EPOR*, *JAK2*, or *PDGFRB* y mutaciones en *FLT3*, *IL7R*, *SH2B3*, *JAK1*, *JAK3*, y *JAK2* (en combinación con fusiones del gen *CRLF2* (11). Por lo tanto, la NGS puede ayudar a personalizar el manejo de los pacientes con leucemia aguda. Sin embargo, para valorar la implementación de la NGS, se necesita asegurar su validez y utilidad clínica, algo difícil de determinar debido a la alta heterogeneidad encontrada en la evidencia disponible.

## V.2. Sobre la validez y utilidad de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas

En la revisión de la evidencia realizada para este informe, se han identificado muchos estudios que describen una gran cantidad de técnicas de secuenciación masiva y de programas bioinformáticos para el análisis de los datos, lo que complica el análisis debido a la heterogeneidad y a los problemas de validez externa de los resultados obtenidos. Esto hace que, a pesar de la identificación de numerosos estudios sobre la validez analítica, clínica y la utilidad clínica de la NGS en el diagnóstico de pacientes con leucemia aguda, la alta heterogeneidad no permita establecer su valor con precisión.

Para plantear la implementación de una estrategia de NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas, el primer requisito indispensable es que el panel o estrategia de NGS elegida tiene que haber demostrado una validez analítica, tanto individual como en diferentes centros en grupos cooperativos (78). La validez analítica se refiere a la precisión y consistencia de la tecno-

logía en detectar el estado verdadero de la variante genética en cuestión, es decir, si la variante está o no presente en la muestra (40). Por lo tanto, la mejor manera de demostrar la validez de la NGS sería incluir un amplio número de muestras bien caracterizadas en los que se realizara la prueba por diferentes laboratorios. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados identificados para este informe evalúan la validez de la NGS en un único laboratorio. Solo en cinco artículos participa más de un laboratorio en el estudio, aunque solo en uno de ellos (75) se valora la concordancia de los resultados de los laboratorios que evalúan los mismos pacientes, utilizando el mismo panel y plataforma de secuenciación. En el resto de los estudios, el objetivo es valorar si los laboratorios, independientemente del panel que utilicen, son capaces de detectar todas las alteraciones de una serie de muestras caracterizadas previamente, evaluando si una estrategia de este tipo podría ser implementada para ser utilizada en el diagnóstico y manejo de estos pacientes (76-78).

La validez clínica se refiere a la habilidad de la prueba para definir o predecir de forma precisa y fiable el fenómeno, por lo que debe haber una asociación entre el gen o variante y el fenotipo. Esta asociación puede depender de la finalidad diagnóstica o predictiva de la prueba o si se basa en la detección de un gen o de variantes claramente asociadas a la enfermedad de interés, o en la detección de variantes, algunas de las cuales nunca o raramente han sido vistas antes. Esto es especialmente importante en la discusión de la validez clínica de la NGS (40), sobre todo teniendo en cuenta la variabilidad en el número de genes y en la de las regiones incluida en la NGS.

En cuanto a la utilidad clínica, se debería valorar el impacto clínico de las variantes identificadas, es decir, si su identificación ha supuesto un cambio en el diagnóstico, estratificación o en la elección del tratamiento correspondiente (40). Como ya se ha mencionado, hay estudios que sí reportan los cambios en la estratificación del riesgo o en el tratamiento del paciente que han impulsado los resultados de la NGS, lo que podría ayudar a definir en qué casos y para qué pacientes podría ser más útil la implementación de esta estrategia. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que junto a las variantes de las que se conoce su relación con la enfermedad, también se identifican otras de significado dudoso (116), por lo que habría que establecer cómo manejar esta información. A este respecto, es muy importante contar con el conocimiento de las bases de datos validadas para estudio de las variantes según la patología y la forma de compartir el conocimiento generado en forma de datos “reales” que permitan la aplicación de herramientas de análisis avanzado. Este conocimiento redundará sin duda en la atención de los pacientes en un futuro próximo.

## V.2.1. Tipo de NGS y de alteraciones a identificar

Aunque las técnicas de WGS y WES permiten la detección de un mayor número de alteraciones, son caras, lentas y requieren de más trabajo. Por ello, los paneles dirigidos de NGS han adquirido prioridad sobre estas técnicas de secuenciación masiva (35).

Entre las indicaciones de la NGS en pacientes con leucemia aguda, se ha valorado su utilización como prueba para detectar en un solo paso y de forma más rápida y económica las principales alteraciones genéticas con el objetivo de permitir realizar el diagnóstico de una forma más rápida, simple y económica (35). Sin embargo, se considera que el uso de la NGS es más una prueba que complementa a las técnicas que se utilizan en el diagnóstico rutinario (80, 99).

Una de las complicaciones de evaluar la validez de la NGS es que no todas las estrategias se dirigen a detectar el mismo tipo de alteraciones. Algunos de los estudios evalúan la validez de la NGS para identificar CNVs y sustituir al cariotipo convencional (89), otros se centran en la identificación de *indels* o SNPs (90, 93) o genes de fusión (98, 99), aunque también hay estrategias dirigidas a valorar varios tipos de alteraciones al mismo tiempo (35, 80-52, 86, 91). Esto dificulta la comparación de estudios y paneles y lleva a reflexionar sobre lo que es importante incluir en el panel, o si es necesario incorporar la detección de estas alteraciones en único panel o en más de uno según el tipo de alteración genética (78).

La S de la NGS varía en función del tipo de alteración genética a detectar e incluso en función de los genes de los que se trate (35, 116), siendo necesario un mayor porcentaje de células que presenten esas aberraciones según el caso. Así, el porcentaje necesario de células varía del 5 % (en el caso de variantes tipo SNVs e *indels*) (76) al 20 % para CNVs (91) o del 25 % para la detección de translocaciones en MYC (85). El rendimiento de la NGS puede depender también del gen o de los genes incluidos en el proceso. Así, en el caso del gen CEPBA, aunque la S de detección de mutaciones por paneles comerciales como el TSMP (S del 47 %) es baja (87), se ha demostrado que la NGS específica para el gen CEPBA vía Nexera XT (mediante amplificación de PCR de largo alcance) sí era capaz de identificar mutaciones presentes en este gen con alta S y E (ambas de un 97 %) (87). Otro gen complicado de secuenciar es el gen FLT3, para el que se ha descrito que la presencia de mutaciones bialélicas otorga un pronóstico favorable a los pacientes con LMA (95). La duplicación interna en tándem de éste ocurre en un 20-30 % de las LMA (84) y los estudios generalmente continúan utilizando el análisis por fragmentos y la secuenciación Sanger para su caracterización,

o excluyen directamente este gen del diseño del panel (93). Sin embargo, existe evidencia que demuestra que la utilización de *pipelines* bioinformáticos específicos mejora el grado de detección de ITD (70, 84, 90) o de mutaciones en el dominio quinasa del FLT3, incluso mutaciones no identificadas por electroforesis capilar que tienen impacto en el tratamiento del paciente (84). Por lo que, aunque algunos estudios siguen utilizando métodos convencionales para analizar las alteraciones de este gen, puede que ya no haga falta si se constata que el rendimiento de la NGS para detectar dichas alteraciones mejora.

En cuanto a la detección de CNVs a nivel génico o exónico, este paso sigue siendo un reto. Aunque se han identificado estudios que comparan el uso de la NGS frente al cariotipo convencional, cada estudio evalúa algoritmos informáticos diferentes con sus propias fortalezas y debilidades, y cuando un algoritmo es muy sensible, puede producir más FP (70). Sin embargo, la NGS ha demostrado que puede obtener información útil incluso en pacientes que presentaban un cariotipo aparentemente normal o más claramente, cuando éste no se ha podido realizar (80). Así, en Montaña *et al.* (92), la NGS ayudó a clasificar tres pacientes de los 21 en los que no se pudo realizar un cariotipo convencional.

Por lo tanto, en muestras iniciales con una alta carga de células tumorales la NGS puede tener un rendimiento superior frente a otras técnicas convencionales para detectar: 1) aneuploidías, hiperdiploidías altas (>51 cromosomas), hipodiploidías bajas (31-39 cromosomas) y casi haploides (24-30 cromosomas); 2) genes de fusión recurrentes (ETV6-RUNX1, BCR-ABL1 y MLLr); 3) amplificación intracromosómica del cromosoma 21 (iAMP21) y reordenaciones CRLF2; 4) CNVs, en particular alteraciones en IKZF1, PAX5, CDKN2A, ETV6, BTG1 y RB1; 5) genes candidatos “accionables” que solo pueden ser detectados por NGS; y, 6) polimorfismos o mutaciones germinales asociadas con respuesta al tratamiento (99).

Por último, en relación con los genes de fusión, la NGS de ARN tiene la ventaja de contar con una alta S y E, siendo capaz de identificar además: 1) fusiones no detectadas por técnicas convencionales por tratarse de *partners* desconocidos (103); y, 2) genes de fusión que se encuentran próximos entre sí y que son difíciles de visualizar mediante técnicas convencionales (como ocurre con STIL-TAL1 y P2RY8-CRLF2) (103). Por lo tanto, la NGS de ARN podría ser una herramienta muy útil para identificar genes de fusión importantes para la estratificación o para la elección del tratamiento del paciente. De hecho, ya se recomienda su uso en pacientes con LLA (11).

## V.2.2. Número de genes cubiertos por la NGS

En la revisión realizada para este informe, se ha observado gran variabilidad en los genes que los paneles o los estudios incluyen, desde los 199 genes en el estudio de Kim *et al.* (98) hasta los 19 genes del estudio de Alonso *et al.* (93). El número de genes incluidos en los paneles pueden llevar a la reducción de la eficiencia del panel y su S, puesto que cuanto mayor sea el número incluido, la media de lecturas por gen será menor para un panel grande que para uno pequeño si el rendimiento de secuenciación es el mismo. En el caso de la secuenciación de ARN, se podrían pasar por alto fusiones que existen en baja proporción, aunque también es cierto que la S en estos casos se podría aumentar si se aumentaran los outputs de la secuenciación (99).

Por otro lado, aunque diferentes paneles incluyan los mismos genes a secuenciar, puede que éstos no detecten las mismas alteraciones porque no incluyen las mismas regiones (76, 77), o porque en el caso de las fusiones, no se incluyen todos los genes *partner* o las sondas para detectar los puntos de corte que no sean los más habituales (35, 78). Así, puede que la utilización de diferentes paneles aumente el riesgo de detectar mutaciones discordantes, lo que se explicaría por la variabilidad en el diseño del panel y en el análisis de los datos de secuenciación (79). Por ello, para implementar la NGS de forma rutinaria en el diagnóstico de pacientes con leucemia aguda, habría que establecer cuáles son los genes que hay que incluir de forma obligatoria para cubrir todas las alteraciones que tienen una relación demostrada con las leucemias agudas y cuáles son los genes que sería de interés añadir, para que la NGS fuera lo más eficiente posible. Así, por ejemplo, en el estudio de Sargas *et al.* (76) se estableció que todos los laboratorios tenían que secuenciar de forma obligatoria ocho genes implicados en la LMA y el mayor número de otros 22 genes que se recomendaba secuenciar. Y, por otro lado, en el estudio de Corboy *et al.* (77) fueron nueve los genes requeridos, incluyendo los seis que permiten clasificar los pacientes según los criterios ELN (FLT3, NPM1, RUNX1, TP53, CEPBA y ASXL1) y tres más (DNMT3A, IDH1 e IDH2) por ser genes potencialmente útiles para la estratificación del riesgo o elección de terapias dirigidas.

## V.3. Implementación de la NGS en el diagnóstico de las agudas

### V.3.1. Aspectos organizativos

A pesar del potencial de la NGS para mejorar el diagnóstico y manejo de los pacientes con leucemia aguda, hay una serie de barreras que han impedido que esta tecnología sea ampliamente adoptada en la práctica clínica. Teniendo en cuenta los resultados del foro Nacional sobre diagnóstico molecular del Reino Unido (114) y de los retos descritos en otros estudios, para implementar la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas habría que tener en cuenta lo siguiente:

#### **1. Decidir qué genes, qué tipo de alteraciones y qué estrategia se va a utilizar.**

La complejidad de la tecnología, los análisis bioinformáticos, y las diferentes opciones disponibles en cuanto a diversidad de pruebas y criterios a la hora de reportar las variantes identificadas, dificultan el consenso entre diferentes laboratorios para la introducción de la NGS en la práctica clínica (76). Por ello, una estrategia para permitir la implementación de la NGS a nivel nacional podría ser la estrategia del grupo español de investigación PETHEMA, que estableció una red de laboratorios para la NGS de pacientes con LMA, pero dejando libertad para que cada laboratorio utilizara el panel que mejor se adecuara a sus necesidades. Así, se superaba uno de los retos para la implementación de la NGS relacionado con la variabilidad interlaboratorio para el análisis de los mismos biomarcadores (114). El único requisito era la secuenciación obligatoria de ocho genes implicados en la LMA y del máximo de los otros 22 recomendados (76). Esta estrategia puede ser más flexible y puede facilitar la implementación de la secuenciación, siempre y cuando se realicen controles regulares para asegurar la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados que obtiene cada laboratorio, independientemente del panel o plataforma que se elija. Sin embargo, al tratarse en este caso del uso de la NGS en el diagnóstico clínico, la validez analítica del panel o paneles elegidos debería ser un prerrequisito para su uso en clínica habitual (78).

Asimismo, en el manejo de las leucemias infantiles en España, se utilizan las recomendaciones propuestas por el grupo de leucemias de SEHOP/PETHEMA, que están consensuadas con otros grupos internacionales. Los estudios genéticos con valor pronóstico a realizar en los pacientes pediátricos están bien establecidos y se utilizan de manera uniforme en las unidades de

hematología y oncología pediátricas españolas. Por ello, las decisiones sobre el tipo de genes, las alteraciones genéticas y los métodos de estudios están bien consensuadas a nivel nacional. En los estudios de recaídas, o en algunas formas menos frecuentes de leucemias infantiles, puede haber mayor variabilidad entre los centros, pero de forma global, en la mayoría de los pacientes pediátricos, se aplican las recomendaciones propuestas por grupos colaborativos internacionales y de los expertos de SEHOP/PETHEMA.

## **2. Definir la demanda y las necesidades de infraestructura, así como de personal cualificado para la realización e interpretación de los resultados.**

Es posible que, debido a la elevada inversión inicial, la necesidad de personal altamente cualificado y un flujo de muestras suficiente para garantizar los tiempos de respuesta y precios asumibles, el uso de esta tecnología no se extienda por todos los laboratorios de diagnóstico clínico que realizan pruebas moleculares, sino que se restrinja a un conjunto de laboratorios de referencia repartidos por el territorio nacional (116). Por ello, es necesario asegurar la cobertura de todos los pacientes y, sobre todo, cómo se van a realizar los envíos a los centros de referencia para que ello no suponga también un retraso del diagnóstico en función del lugar de residencia del paciente y que la carga de trabajo ha de poder ser asumida por los centros de referencia. En el estudio de Sargas *et al.* (76), con el modelo que utilizaron se pudieron recoger y secuenciar 751 muestras en un año, demostrando una capacidad suficiente para implementar la NGS en la práctica clínica.

En España existe una larga experiencia de trabajo en red y de derivación de las muestras a laboratorios de referencia para completar los estudios diagnósticos de leucemia, tanto en pacientes adultos como pediátricos. En los protocolos de diagnóstico y tratamiento de LLA y LMA, propuestos por PETHEMA para adultos y por SEHOP/PETHEMA para pacientes pediátricos, se establecen algunos centros de referencia y se proponen circuitos de derivación de las muestras para la realización de los estudios con valor pronóstico necesarios para el diagnóstico y la estratificación de los pacientes, que no están disponibles en todos los centros.

Para que cada laboratorio de referencia sea capaz de secuenciar las muestras recibidas deberían contar también con personal cualificado tanto para realizar la secuenciación, como para el análisis bioinformático y la interpretación de los resultados. La complejidad de los datos generados requiere de personal altamente cualificado en biología computacional, lo que sólo es posible en laboratorios diagnósticos muy implicados con la investigación (116). Asimismo, la coordinación entre los laboratorios que realicen la secuenciación sería muy importante de cara a construir la estrategia que per-

mita interpretar el significado de las variantes genéticas de significado incierto (116). Asimismo, habría que considerar cómo será la interacción con el centro que envía la muestra, puesto que no hay que olvidar que los resultados de la NGS deberían ser interpretados en el contexto de otros resultados de laboratorio relacionados con citomorfología, histopatología, inmunofenotipo, genética molecular tradicional, citogenética y datos y diagnóstico clínico (115).

La integración de los resultados de NGS con los datos clínicos y el resto de estudios diagnósticos es crucial, por lo que aunque el diagnóstico definitivo del tipo de leucemia debe ser establecido por los especialistas en hematología, la valoración interdisciplinar de todos los resultados en comités clínico-moleculares puede contribuir a una mayor precisión diagnóstica y a una terapia más adecuada en cada paciente.

De todos modos, cabe destacar que no son sólo las leucemias agudas las que requieren estudio de variantes genómicas patogénicas o probablemente patogénicas mediante NGS, con implicación asistencial directa, sino que existen otras patologías hematológicas en las que también es necesario su estudio, tales como los MDS, la leucemia mielomonocítica crónica o MPN crónicas como la mielofibrosis. Dado que en un estudio de NGS, la eficiencia viene determinada por el número de muestras que sean analizables de forma conjunta en una misma carrera (pudiendo incluir casos de diferentes patologías pero que comparten tecnologías a estudio), la determinación del número de muestras y de los genes a analizar por patología podría ayudar a que el uso de recursos fuera más eficiente.

### **3. Definir los requerimientos regulatorios, las necesidades de acreditación de los laboratorios y de información para poder monitorizar y evaluar la fiabilidad de los resultados y el impacto clínico en los pacientes con leucemia aguda.**

Uno de los problemas con la implementación de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas son los requerimientos regulatorios, puesto que prácticamente todos los paneles utilizados en los estudios son solo de uso en investigación y no cuentan con el certificado para su uso en diagnóstico in vitro. A este respecto, habría que explorar la posibilidad de establecer algún mecanismo de seguimiento y mecanismos de evaluación de los resultados como prueba que sirva para su uso como prueba diagnóstica clínica.

Aunque tanto el grupo PETHEMA, que ya recoge muestras de pacientes con LMA para su secuenciación, como el grupo biológico de leucemias infantiles de SEHOP/PETHEMA que realiza estudios conjuntos de investigación, ofrecen un trabajo en red de investigación, pero que todavía no puede aplicarse a nivel asistencial (76).

Por otro lado, como en cualquier otra práctica diagnóstica, los laboratorios deben asegurar la calidad de los procesos preanalíticos, analíticos y postanalíticos de la secuenciación NGS (15) y deberían estar acreditados por organismos (nacionales o internacionales) que garanticen las buenas prácticas de trabajo y el correcto monitoreo de los procesos. Este proceso se podría dividir en tres fases: 1) Familiarización; 2) Puesta a punto; 3) Validación e implementación (15).

#### **4. Definir programas de formación y recursos para informar tanto a profesionales asistenciales como a los pacientes sobre la validez y utilidad de la NGS en las leucemias agudas, así como la posibilidad de obtener resultados genéticos secundarios no relacionados con la leucemia.**

Conocer la base de la NGS debería ser indispensable para todo aquel profesional sanitario que tenga contacto con dicha tecnología o tenga que interpretar o tener en cuenta los resultados obtenidos con la misma. Por ello, sería indispensable formar a los profesionales y proporcionar recursos que puedan utilizar para ellos y para sus pacientes. Las expectativas de los pacientes con el uso de esta tecnología pueden ser muy altas (112), más si cabe en el caso de pacientes pediátricos. Por ello, los profesionales sanitarios deberían conocer la base de la NGS y ser capaces de trasladar de la manera más clara posible a los pacientes lo que esta tecnología les puede ofrecer. Asimismo, se les debería explicar a los pacientes que existe la posibilidad de que la NGS identifique resultados secundarios que el paciente pueda no querer conocer, con la opción de recibir consejo genético siempre y cuando se estime oportuno.

### V.3.2. Eficiencia

Aunque se ha señalado que la NGS supone, en relación con los recursos económicos y de tiempo, un indudable avance frente a la secuenciación Sanger (116) no se han identificado estudios que valoren el coste-efectividad o coste-utilidad del uso de la NGS en comparación con las técnicas convencionales que se utilizan en el diagnóstico clínico de los pacientes con leucemia aguda. Sería de interés no solo conocer la inversión inicial que habría que hacer para adquirir los equipos necesarios para la NGS, sino también el coste de los equipos profesionales cualificados para ello y el coste que tendría la NGS por paciente. En el caso de la valoración de los costes, habría que tener en cuenta también que los secuenciadores son utilizados también para el estudio de variantes genómicas patogénicas o probablemente patogénicas en otras patologías. Así, como se ha comentado anteriormente, la existencia

de un acuerdo de plataformas compartidas entre distintas especialidades (tumores sólidos, hematología, microbiología, etc.) permitiría llegar a una gestión coste-eficiente.

Por otro lado, el coste de la NGS dependerá de cómo afecte la realización de la NGS en la decisión de realizar o no otras pruebas diagnósticas convencionales, así como el impacto que los resultados puedan tener en el manejo del paciente. Asimismo, también habría que tener en cuenta el impacto de no detectar alteraciones de genes accionables que solo la NGS podría identificar. De momento, no se han encontrado estudios al respecto.

### V.3.3. Aspectos éticos y legales, valores y preferencias

Como ya se ha señalado en el apartado V.3.1, las cuestiones éticas ligadas a la secuenciación masiva son muchas (15). Las pruebas genéticas tienen implicaciones personales y sociales que hay que considerar a la hora de definir la forma apropiada de utilizar dichas pruebas. Estas implicaciones tienen que ver con el riesgo genético que pueden compartir miembros de la misma familia, el impacto de los resultados en la toma de decisiones reproductivas y la posibilidad de que la información genética encontrada genere un estigma o discriminación del individuo. Además, el rápido desarrollo de la tecnología genómica y la incertidumbre sobre las implicaciones que el riesgo genético pueda tener en la salud del individuo, alcanzan consideraciones éticas relacionadas con las desigualdades en salud, con compartir los datos clínicos y el alcance que debe tener el informe de los resultados de las pruebas genéticas (41).

# VI. Conclusiones

Teniendo en cuenta lo expuesto en los apartados anteriores, las conclusiones de este informe serían las siguientes:

1. Existe gran heterogeneidad en las estrategias y paneles de NGS utilizados en los estudios, lo que dificulta la valoración de la evidencia en referencia a la validez analítica y clínica. Sin embargo, establecer de forma consensuada los criterios de calidad e interpretación de resultados, así como la realización de estudios de concordancia y validación interlaboratorios, pueden ayudar a aumentar la validez y utilidad clínica de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas.

Para ello, ayudaría definir lo siguiente:

- Cuáles son los genes que habría que secuenciar y la evidencia que apoya la validez clínica de cada biomarcador (incluyendo genes para los que se están desarrollando tratamientos dirigidos), algo que ya se está trabajando a nivel nacional e internacional.
  - Tipo de alteraciones genéticas que habría que buscar para cada gen y si pueden ser analizadas en un único panel (CNVs, SNS, *indels*, genes de fusión...).
  - Si hay alteraciones para las que sería recomendable continuar utilizando métodos convencionales (FLT3-ITD, CEBPA...).
  - Estandarización del proceso y de las herramientas (*pipelines*) informáticas a utilizar para el análisis de los datos.
  - Características del informe a presentar.
2. Son pocos los estudios que evalúan la utilidad clínica de la NGS en leucemias agudas. Además, sus resultados no son fácilmente comparables. Sin embargo, la NGS puede ayudar a obtener datos relevantes en pacientes en los que no se pueden realizar cariotipos convencionales y puede aportar información complementaria a la obtenida por técnicas convencionales que ayuda a clasificar mejor el riesgo de los pacientes y a escoger el mejor tratamiento en algunos casos, como en las LLA de tipo Ph+. Por ello, sería recomendable definir en qué pacientes puede ser más útil la utilización de la NGS (e incluso el tipo de alteraciones a detectar puede depender del tipo de paciente) y qué impacto tienen los resultados en su estratificación o manejo.
  3. No se han identificado estudios que valoren el coste-efectividad o coste-utilidad de la adición de la NGS frente al uso de técnicas con-

vencionales en el diagnóstico de las leucemias agudas. Sin embargo, sería de interés conocer el impacto económico que supone el hecho de no detectar alteraciones que solo la NGS puede identificar, así como el impacto que tendría en los recursos el uso de plataformas compartidas entre diferentes patologías.

4. Existen iniciativas de redes de investigación a nivel estatal, tanto para LMA como LLA, para estandarizar el uso de la NGS en el diagnóstico de estos pacientes. De hecho, existen consensos entre estas redes para el diagnóstico y tratamiento de las LMA y LLA que incluyen los genes que habría que secuenciar para poder utilizar el mejor tratamiento posible a cada paciente. Así, estas redes pueden ser un buen punto de partida para diseñar un modelo de implementación de la NGS en el diagnóstico de las leucemias agudas, teniendo en cuenta que en este caso se estaría valorando el uso de la NGS en el diagnóstico clínico y no como herramienta de investigación.
5. Tanto los profesionales sanitarios como los pacientes a los que se les aplica la técnica deberían contar con información sobre las implicaciones que los hallazgos de la NGS pueden tener para no crear falsas expectativas, así como la posibilidad de encontrar otros resultados no relacionados con la leucemia y la elección del paciente a conocer o no dichos resultados.

## VII. Bibliografía

1. Instituto nacional del cáncer (NIH) de EE.UU. Definición de leucemia aguda. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/leucemia-aguda> (accedido 04/11/21).
2. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Apr;36(4):607-20.
3. Mera Reina Claudia, Roa Lara Angélica, Ramírez Clavijo Sandra. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto- renovación. *Rev. Cienc. Salud [Internet].* 2007 June [cited 2021 Dec 01]; 5(1): 67-89. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-72732007000100007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732007000100007&lng=en).
4. Betts JG, Desaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse D, *et al.* The Cardiovascular System: Blood. Differentiation of Formed Elements from Stem Cells. In: *Anatomy and physiology.* Houston, TX: OpenStax, Rice University; 2022. Recuperada de: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/18-2-production-of-the-formed-elements>
5. Lassaletta Atienza A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integral* 2012; XVI (6): 453-462. Disponible en: <https://www.pediatriaintegral.es/numeros-anteriores/publicacion-2012-07/leucemias-leucemia-linfoblastica-aguda/>
6. Rabin KR, Poplack DG. Management strategies in acute lymphoblastic leukemia. *Oncology.* 2011; 25(4): 328-35.
7. Solans M, Sanvisens A, Amejjide A, Merino S, Rojas D, Alemán A, Banqueri E, Chico M, Marcos AI, de Castro V, Gil L, de Munain AL, Puigdemont M, Sánchez MJ, Perucha J, Ruiz-Armengol P, Chirlaque MD, Guevara M, Carulla M, Marcos- Gragera R. Incidence of myeloid neoplasms in Spain (2002-2013): a population-based study of the Spanish network of cancer registries. *Sci Rep.* 2022 Jan 10;12(1):323.
8. Cheng MJ, Hourigan CS, Smith TJ. Adult Acute Myeloid Leukemia Long-term Survivors. *J Leuk (Los Angel).* 2014 Apr 10;2(2):26855.
9. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc.* 2016 Nov;91(11):1645-66.
10. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017 Jun 30;7(6):e577.
11. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Lymphoblastic Leukemia. Version 1.2022. Disponible en: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/all.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf).

12. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J.* 2016 Jul 1;6(7):e441.
13. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017 Jan 26;129(4):424-447.
14. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costas D, Espinet B, Foot N, Jeffries S, Martin K, O'Connor S, Schouman J, Talley P, Telfrod N, Stioui S, Zemanova Z, Hastings RJ. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia* (2019) 33:1851– 1867
15. Jauk F. Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. *Hematología* 2019;23:21-38.
16. Tran TH, Hunger SP. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia and precision medicine opportunities. *Semin Cancer Biol.* 2022 Sep;84:144-152.
17. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia. Version 2.2022. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf).
18. Zoni Matta A.C., Martínez López, J. Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas. Madrid. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de la Comunidad de Madrid. 2015.
19. Hernández JM, Granada I, Solé F. De la citogenética convencional al análisis por micromatrices. Cincuenta años del cromosoma Filadelfia:137 (5):2011. *Medicina Clínica*:221-229.
20. Chari R, Lockwood WW, Lam WL. Computational methods for the analysis of array comparative genomic hybridization. *Cancer Inform.* 2007 Feb 10;2:48-58.
21. Lalonde E, Wertheim G, Li MM. Clinical Impact of Genomic Information in Pediatric Leukemia. *Front Pediatr.* 2017 Dec 14;5:263.
22. Schrijver I, Aziz N, Fakras DH. Opportunities and challenges associated with clinical diagnostic genome sequencing: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2012;14:525-540.
23. Majewski J, Schwartztruber J, Lalonde E, Montpetit A y Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet.* 2011;48:580-589.
24. Lee H, Deignan JL, Dorrani N y col. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA.* 2014;312:1880-1887.

25. Bodian DL, Kothiyal P y Hauser NS. Pitfalls of clinical exome and gene panel testing: alternative transcripts. *Genet Med.* 2019;21:1240-1245.
26. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK y Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013;155:27-38.
27. Yohe S y Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141:1544-1557.
28. Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet.* 2009;10:669-680.
29. Soto J, Rodriguez-Antolin C, Vallespin E, de Castro Carpeño J y Ibanez de Caceres I. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. *Transl Res.* 2016;169:1-18e1.
30. Sastre L. Exome sequencing: what clinicians need to know. *Advances in Genomics and Genetics.* 2014;4:15-27.
31. Heyer EE, Deveson IW, Wooi D y col. Diagnosis of fusion genes using targeted RNA sequencing. *Nature.* 2019;10:1388.
32. Richards S, Aziz N, Bale S y col. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-424.
33. Li MM, Dato M, Duncavage EJ. Clinical Implementation of the Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of AMP, ASO and CAP. *Cancer Genetics.* 2017;26:214-215.
34. Hehir-Kwa JY, Claustres M, Hastings RJ. Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:1601-1606.
35. Montaña A, Hernández-Sánchez J, Forero-Castro M, Matorra-Miguel M, Lumbreras E, Miguel C, Santos S, Ramírez-Maldonado V, Fuster JL, de Las Heras N, García-de Coca A, Sierra M, Dávila J, de la Fuente I, Olivier C, Olazabal J, Martínez J, Vega-García N, González T, Hernández-Rivas JM, Benito R. Comprehensive Custom NGS Panel Validation for the Improvement of the Stratification of B-Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *J Pers Med.* 2020 Sep 21;10(3):137.
36. Pitini E, D'Andrea E, De Vito C, Rosso A, Unim B, Marzuillo C, Federici A, Di Maria E, Villari P. A proposal of a new evaluation framework towards implementation of genetic tests. *PLoS One.* 2019 Aug 5;14(8):e0219755.
37. Colàs-Campàs L, Blanco-Silvente L, Espallargues M. Secuenciación de nueva generación (NGS) para el diagnóstico molecular y selección de dianas terapéuticas en enfermedades oncológicas. Madrid: Ministerio de Sanidad. Barcelona:

Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya; 2021. (Colección: Informes, estudios e investigación / Ministerio de Sanidad. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias).

38. Zoni Matta A.C., Martínez López, J. Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas. Madrid. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de la Comunidad de Madrid. 2015. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.
39. López de Argumedo M, Reviriego E, Gutiérrez A, Bayón JC. Actualización del Sistema de Trabajo Compartido para Revisiones Sistemáticas de la Evidencia Científica y Lectura Crítica (Plataforma FLC 3.0). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco; 2017. Informes de Evaluación de Tecnología Sanitarias: OS-TEBA.
40. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, Haddow JE, Piper M, Calonge N, Dotson WD, Douglas MP, Berg AO; EGAPP Working Group. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med.* 2009 Jan;11(1):3-14.
41. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Health Care Services; Board on the Health of Select Populations; Committee on the Evidence Base for Genetic Testing. An Evidence Framework for Genetic Testing. Washington (DC): National Academies Press (US); 2017 Mar 27.
42. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391-405.
43. Heuser M, Ofran Y, Boissel N, Brunet Mauri S, Craddock C, Janssen J, Wierzbowska A, Buske C; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: [clinicalguidelines@esmo.org](mailto:clinicalguidelines@esmo.org). Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020 Jun;31(6):697-712.
44. Ayala R, Rapado I, Onecha E, Martínez-Cuadrón D, Carreño-Tarragona G, Bergua JM, Vives S, Algarra JL, Tormo M, Martínez P, Serrano J, Herrera P, Ramos F, Salamero O, Lavilla E, Gil C, López Lorenzo JL, Vidrales MB, Labrador J, Falantes JF, Sayas MJ, Paiva B, Barragán E, Prosper F, Sanz MÁ, Martínez-López J, Montesinos P, On Behalf Of The Programa Para El Estudio de la Terapeutica En Hemopatias Malignas Pethema Cooperative Study Group. The Mutational Landscape of Acute Myeloid Leukaemia Predicts Responses and Outcomes in Elderly Patients from the PETHEMA-FLUGAZA Phase 3 Clinical Trial. *Cancers (Basel).* 2021 May 18;13(10):2458.

45. Janic D, Peric J, Karan-Djurasevic T, Kostic T, Marjanovic I, Stanic B, Pejanovic N, Dokmanovic L, Lazic J, Krstovski N, Virijevic M, Tomin D, Vidovic A, Suvajdzic-Vukovic N, Pavlovic S, Tosic N. Application of targeted next generation sequencing for the mutational profiling of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Med Biochem.* 2020 Jan 10;39(1):72-82.
46. Sánchez R, Ribera J, Morgades M, Ayala R, Onecha E, Ruiz-Heredia Y, Juárez- Rufián A, de Nicolás R, Sánchez-Pina J, Vives S, Zamora L, Mercadal S, Coll R, Cervera M, García O, Ribera JM, Martínez-López J. A novel targeted RNA-Seq panel identifies a subset of adult patients with acute lymphoblastic leukemia with BCR-ABL1-like characteristics. *Blood Cancer J.* 2020 Apr 24;10(4):43.
47. Akin DF, Oner DA, Kurekci E, Akar N. Determination of CEBPA mutations by next generation sequencing in pediatric acute leukemia. *Bratisl Lek Listy.* 2018;119(6):366-372.
48. Hussaini MO, Mirza AS, Komrokji R, Lancet J, Padron E, Song J. Genetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia Interrogated by Next-generation Sequencing: A Large Cancer Center Experience. *Cancer Genomics Proteomics.* 2018 Mar-Apr;15(2):121-126.
49. Marceau-Renaut A, Duployez N, Ducourneau B, Labopin M, Petit A, Rousseau A, Geffroy S, Bucci M, Cuccuini W, Fenneteau O, Ruminy P, Nelken B, Ducassou S, Gandemer V, Leblanc T, Michel G, Bertrand Y, Baruchel A, Leverger G, Preudhomme C, Lapillonne H. Molecular Profiling Defines Distinct Prognostic Subgroups in Childhood AML: A Report From the French ELAM02 Study Group. *Hemisphere.* 2018 Feb 21;2(1):e31.
50. Zakaria Z, Othman N, Ismail A, Kamaluddin NR, Esa E, Abdul Rahman EJ, Mat Yusoff Y, Mohd Fauzi F, Sew Keoh T. Whole-Exome Sequencing of ETV6/RUNX1 in Four Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Cases. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017 Apr 1;18(4):1169-1175.
51. Yap KL, Furtado LV, Kiyotani K, Curran E, Stock W, McNeer JL, Kadri S, Segal JP, Nakamura Y, Le Beau MM, Gurbuxani S, Raca G. Diagnostic evaluation of RNA sequencing for the detection of genetic abnormalities associated with Ph-like acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Lymphoma.* 2017 Apr;58(4):950-958.
52. Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park MJ, Ohki K, Shimada A, Takita J, Tomizawa D, Kudo K, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Tawa A, Ito E, Horibe K, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2016 Nov;175(3):476-489.
53. Kadia TM, Jain P, Ravandi F, Garcia-Manero G, Andreef M, Takahashi K, Borthakur G, Jabbour E, Konopleva M, Daver NG, Dinardo C, Pierce S, Ka-

- nagal-Shamanna R, Patel K, Estrov Z, Cortes J, Kantarjian HM. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. *Cancer*. 2016 Nov 15;122(22):3484-3491.
54. Gianfelici V, Chiaretti S, Demeyer S, Di Giacomo F, Messina M, La Starza R, Peragine N, Paoloni F, Geerdens E, Pierini V, Elia L, Mancini M, De Propriis MS, Apicella V, Gaidano G, Testi AM, Vitale A, Vignetti M, Mecucci C, Guarini A, Cools J, Foà R. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications. *Haematologica*. 2016 Aug;101(8):941-50.
  55. Thakral G, Vierkoetter K, Namiki S, Lawicki S, Fernandez X, Ige K, Kawahara W, Lum C. AML multi-gene panel testing: A review and comparison of two gene panels. *Pathol Res Pract*. 2016 May;212(5):372-80.
  56. Prassek VV, Rothenberg-Thurley M, Sauerland MC, Herold T, Janke H, Ksienzyk B, Konstandin NP, Goerlich D, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Braess J, Schneider S, Subklewe M, Bohlander SK, Hiddemann W, Spiekermann K, Metzeler KH. Genetics of acute myeloid leukemia in the elderly: mutation spectrum and clinical impact in intensively treated patients aged 75 years or older. *Haematologica*. 2018 Nov;103(11):1853-1861.
  57. Papuc SM, Erbescu A, Cisleanu D, Ozunu D, Enache C, Dumitru I, Lupoia Andrus E, Gaman M, Popov VM, Dobre M, Stanca O, Angelescu S, Berbec N, Colita A, Vladareanu AM, Bumbea H, Arghir A. Delineation of Molecular Lesions in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis: Integrated Next Generation Sequencing and Cytogenomic Studies. *Genes (Basel)*. 2021 May 30;12(6):846.
  58. Yasuda T, Sanada M, Nishijima D, Kanamori T, Iijima Y, Hattori H, Saito A, Miyoshi H, Ishikawa Y, Asou N, Usuki K, Hirabayashi S, Kato M, Ri M, Handa H, Ishida T, Shibayama H, Abe M, Iriyama C, Karube K, Nishikori M, Ohshima K, Kataoka K, Yoshida K, Shiraishi Y, Goto H, Adachi S, Kobayashi R, Kiyoi H, Miyazaki Y, Ogawa S, Kurahashi H, Yokoyama H, Manabe A, Iida S, Tomita A, Horibe K. Clinical utility of target capture-based panel sequencing in hematological malignancies: A multicenter feasibility study. *Cancer Sci*. 2020 Sep;111(9):3367-3378.
  59. Su L, Tan Y, Lin H, Liu X, Yu L, Yang Y, Liu S, Bai O, Yang Y, Jin F, Sun J, Liu C, Liu Q, Gao S, Li W. Mutational spectrum of acute myeloid leukemia patients with double CEBPA mutations based on next-generation sequencing and its prognostic significance. *Oncotarget*. 2018 Jan 3;9(38):24970-24979.
  60. Rowsey RA, Smoley SA, Williamson CM, Vasmatzis G, Smadbeck JB, Ning Y, Greipp PT, Hoppman NL, Baughn LB, Ketterling RP, Peterson JF. Characterization of TCF3 rearrangements in pediatric B-lymphoblastic leukemia/lymphoma by mate-pair sequencing (MPseq) identifies complex genomic rearrangements and a novel TCF3/TEF gene fusion. *Blood Cancer J*. 2019 Oct 1;9(10):81.

61. Leung GMK, Zhang C, Ng NKL, Yang N, Lam SSY, Au CH, Chan TL, Ma ESK, Tsui SP, Ip HW, So JCC, Ng MHL, Cheng KCK, Wong KF, Siu LLP, Yip SF, Lin SY, Lau JSM, Luk TH, Lee HKK, Lau CK, Kho B, Kwong YL, Leung AYH. Distinct mutation spectrum, clinical outcome and therapeutic responses of typical complex/monosomy karyotype acute myeloid leukemia carrying TP53 mutations. *Am J Hematol*. 2019 Jun;94(6):650-657.
62. Docking TR, Parker JDK, Jädersten M, Duns G, Chang L, Jiang J, Pilsworth JA, Swanson LA, Chan SK, Chiu R, Nip KM, Mar S, Mo A, Wang X, Martinez-Høyer S, Stubbins RJ, Mungall KL, Mungall AJ, Moore RA, Jones SJM, Birol I, Marra MA, Hogge D, Karsan A. A clinical transcriptome approach to patient stratification and therapy selection in acute myeloid leukemia. *Nat Commun*. 2021 Apr 30;12(1):2474.
63. Onecha E, Ruiz-Heredia Y, Martínez-Cuadrón D, Barragán E, Martínez-Sánchez P, Linares M, Rapado I, Perez-Oteyza J, Magro E, Herrera P, Rojas JL, Gorrochategui J, Villoria J, Boluda B, Sargas C, Ballesteros J, Montesinos P, Martínez-López J, Ayala R. Improving the prediction of acute myeloid leukaemia outcomes by complementing mutational profiling with ex vivo chemosensitivity. *Br J Haematol*. 2020 May;189(4):672-683.
64. Lin PH, Li HY, Fan SC, Yuan TH, Chen M, Hsu YH, Yang YH, Li LY, Yeh SP, Bai LY, Liao YM, Lin CY, Hsieh CY, Lin CC, Lin CH, Lien MY, Chen TT, Ni YH, Chiu CF. A targeted next-generation sequencing in the molecular risk stratification of adult acute myeloid leukemia: implications for clinical practice. *Cancer Med*. 2017 Feb;6(2):349-360.
65. Navrkalova V, Plevova K, Hynst J, Pal K, Mareckova A, Reigl T, Jelinkova H, Vrzalova Z, Stranska K, Pavlova S, Panovska A, Janikova A, Doubek M, Kotaskova J, Pospisilova S. LYmphoid NeXt-Generation Sequencing (LYNX) Panel: A Comprehensive Capture-Based Sequencing Tool for the Analysis of Prognostic and Predictive Markers in Lymphoid Malignancies. *J Mol Diagn*. 2021 Aug;23(8):959-974.
66. Chen X, Zhu H, Qiao C, Zhao S, Liu L, Wang Y, Jin H, Qian S, Wu Y. Next-generation sequencing reveals gene mutations landscape and clonal evolution in patients with acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2021 Dec;26(1):111-122.
67. Lay L, Stroup B, Payton JE. Validation and interpretation of IGH and TCR clonality testing by Ion Torrent S5 NGS for diagnosis and disease monitoring in B and T cell cancers. *Pract Lab Med*. 2020 Nov 25;22:e00191.
68. Rosenthal SH, Gerasimova A, Ma C, Li HR, Grupe A, Chong H, Acab A, Smolgovsky A, Owen R, Elzinga C, Chen R, Sugganth D, Freitas T, Graham J, Champion K, Bhattacharya A, Racke F, Lacbawan F. Analytical validation and performance characteristics of a 48-gene next-generation sequencing panel for detecting potentially actionable genomic alterations in myeloid neoplasms. *PLoS One*. 2021 Apr 28;16(4):e0243683.

69. Prieto-Conde MI, Corchete LA, García-Álvarez M, Jiménez C, Medina A, Balanzategui A, Hernández-Ruano M, Maldonado R, Sarasquete ME, Alcoceba M, Puig N, González-Calle V, García-Sanz R, Gutiérrez NC, González-Díaz M, Chillón MC. A New Next-Generation Sequencing Strategy for the Simultaneous Analysis of Mutations and Chromosomal Rearrangements at DNA Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. *J Mol Diagn.* 2020 Jan;22(1):60-71.
70. Kim B, Kim S, Lee ST, Min YH, Choi JR. FLT3 Internal Tandem Duplication in Patients With Acute Myeloid Leukemia Is Readily Detectable in a Single Next- Generation Sequencing Assay Using the Pindel Algorithm. *Ann Lab Med.* 2019 May;39(3):327-329.
71. Kim B, Lee H, Kim E, Shin S, Lee ST, Choi JR. Clinical utility of targeted NGS panel with comprehensive bioinformatics analysis for patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2019 Dec;60(13):3138-3145.
72. Tsai HK, Brackett DG, Szeto D, Frazier R, MacLeay A, Davineni P, Manning DK, Garcia E, Lindeman NI, Le LP, Lennerz JK, Gibson CJ, Lindsley RC, Kim AS, Nardi V. Targeted Informatics for Optimal Detection, Characterization, and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplications Across Multiple Next- Generation Sequencing Platforms. *J Mol Diagn.* 2020 Sep;22(9):1162-1178.
73. Akhter A, Mughal MK, Elyamany G, Sinclair G, Azma RZ, Masir N, Shuib S, Rashid-Kolvear F, Shabani-Rad MT, Stewart DA, Mansoor A. Multiplexed automated digital quantification of fusion transcripts: comparative study with fluorescent in-situ hybridization (FISH) technique in acute leukemia patients. *Diagn Pathol.* 2016 Sep 15;11(1):89.
74. Haley L, Parimi V, Jiang L, Pallavajjala A, Hardy M, Yonescu R, Morsberger L, Stinnett V, Long P, Zou YS, Gocke CD. Diagnostic Utility of Gene Fusion Panel to Detect Gene Fusions in Fresh and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Cancer Specimens. *J Mol Diagn.* 2021 Oct;23(10):1343-1358.
75. Haslam K, Catherwood MA, Dobbin E, Sproul A, Langabeer SE, Mills KI. Inter- Laboratory Evaluation of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia. *Mol Diagn Ther.* 2016 Oct;20(5):457-61.
76. Sargas C, Ayala R, Chillón MC, Larráyoiz MJ, Carrillo-Cruz E, Bilbao C, Yébenes- Ramírez M, Llop M, Rapado I, García-Sanz R, Vázquez I, Soria E, Florido-Ortega Y, Janusz K, Botella C, Serrano J, Martínez-Cuadrón D, Bergua J, Amigo ML, Martínez-Sánchez P, Tormo M, Bernal T, Herrera-Puente P, García R, Algarra L, Sayas MJ, Costilla-Barriga L, Pérez-Santolalla E, Marchante I, Lavilla-Rubira E, Noriega V, Alonso-Domínguez JM, Sanz MÁ, Sánchez-García J, Gómez-Casares MT, Pérez-Simón JA, Calasanz MJ, González-Díaz M, Martínez-López J, Barragán E, Montesinos P. Networking for advanced molecular diagnosis in acute myeloid leukemia patients is possible: the PETHEMA NGS-AML project. *Haematologica.* 2021 Dec 1;106(12):3079-3089.

77. Corboy G, Othman J, Lee L, Wei A, Ivey A, Blombery P, Agarwal R, Fong C, Brown A, Scott H, Grove C, Louw A, Enjeti A, Iland H, Paul C, Bohlander S, Kakadia P, Horan M, Stevenson W. Laboratory quality assessment of candidate gene panel testing for acute myeloid leukaemia: a joint ALLG / RCPAQAP initiative. *Pathology*. 2021 Jun;53(4):487-492.
78. Vega-Garcia N, Benito R, Esperanza-Cebollada E, Llop M, Robledo C, Vicente- Garcés C, Alonso J, Barragán E, Fernández G, Hernández-Sánchez JM, Martín- Izquierdo M, Maynou J, Minguela A, Montañó A, Ortega M, Torrebaddell M, Cervera J, Sánchez J, Jiménez-Velasco A, Riesco S, Hernández-Rivas JM, Lassaletta Á, Fernández JM, Rives S, Dapena JL, Ramírez M, Camós M, On Behalf Of The Group Of Leukemia Of The Spanish Society Of Pediatric Hematology And Oncology Sehop. Helpful Criteria When Implementing NGS Panels in Childhood Lymphoblastic Leukemia. *J Pers Med*. 2020 Nov 26;10(4):244.
79. Aguilera-Diaz A, Vazquez I, Ariceta B, Mañú A, Blasco-Iturri Z, Palomino-Echeverría S, Larrayoz MJ, García-Sanz R, Prieto-Conde MI, Del Carmen Chillón M, Alfonso-Pierola A, Prosper F, Fernandez-Mercado M, Calasanz MJ. Assessment of the clinical utility of four NGS panels in myeloid malignancies. Suggestions for NGS panel choice or design. *PLoS One*. 2020 Jan 24;15(1):e0227986.
80. Chicano M, Carbonell D, Suárez-González J, Lois S, Ballesteros-Culebras M, Andrés-Zayas C, Muñoz P, Rodríguez-Macias G, Bastos-Oreiro M, Font P, Ballesteros M, Kwon M, Anguita J, Díez-Martín JL, Buño I, Martínez-Laperche C. Next Generation Cytogenetics in Myeloid Hematological Neoplasms: Detection of CNVs and Translocations. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 15;13(12):3001.
81. Carbonell D, Suárez-González J, Chicano M, Andrés-Zayas C, Díez-Díez M, Rodríguez-Macias G, Muñoz P, Kwon M, Anguita J, Díez-Martín JL, Buño I, Martínez-Laperche C. Genetic biomarkers identify a subgroup of high-risk patients within low-risk NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2021 May;62(5):1178-1186.
82. Carbonell D, Suárez-González J, Chicano M, Andrés-Zayas C, Triviño JC, Rodríguez-Macias G, Bastos-Oreiro M, Font P, Ballesteros M, Muñoz P, Balsalobre P, Kwon M, Anguita J, Díez-Martín JL, Buño I, Martínez-Laperche C. Next- Generation Sequencing Improves Diagnosis, Prognosis and Clinical Management of Myeloid Neoplasms. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 13;11(9):1364.
83. Kim B, Kim E, Lee ST, Cheong JW, Lyu CJ, Min YH, Choi JR. Detection of recurrent, rare, and novel gene fusions in patients with acute leukemia using next- generation sequencing approaches. *Hematol Oncol*. 2020 Feb;38(1):82-88.
84. Kim B, Lee H, Shin S, Lee ST, Choi JR. Clinical Evaluation of Massively Parallel RNA Sequencing for Detecting Recurrent Gene Fusions in Hematologic Malignancies. *J Mol Diagn*. 2019;21(1):163-170.

85. Kim B, Lee H, Jang J, Kim SJ, Lee ST, Cheong JW, Lyu CJ, Min YH, Choi JR. Targeted next generation sequencing can serve as an alternative to conventional tests in myeloid neoplasms. *PLoS One*. 2019 Mar 6;14(3):e0212228.
86. He R, Devine DJ, Tu ZJ, Mai M, Chen D, Nguyen PL, Oliveira JL, Hoyer JD, Reichard KK, Ollila PL, Al-Kali A, Tefferi A, Begna KH, Patnaik MM, Alkhatteeb H, Viswanatha DS. Hybridization capture-based next generation sequencing reliably detects FLT3 mutations and classifies FLT3-internal tandem duplication allelic ratio in acute myeloid leukemia: a comparative study to standard fragment analysis. *Mod Pathol*. 2020 Mar;33(3):334-343.
87. Alimohamed MZ, Johansson LF, de Boer EN, Splinter E, Klous P, Yilmaz M, Bosga A, van Min M, Mulder AB, Vellenga E, Sinke RJ, Sijmons RH, van den Berg E, Sikkema-Raddatz B. Genetic Screening Test to Detect Translocations in Acute Leukemias by Use of Targeted Locus Amplification. *Clin Chem*. 2018 Jul;64(7):1096-1103.
88. Aoe M, Ishida H, Matsubara T, Karakawa S, Kawaguchi H, Fujiwara K, Kanamitsu K, Washio K, Okada K, Shibakura M, Shimada A. Simultaneous detection of ABL1 mutation and IKZF1 deletion in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia using a customized target enrichment system panel. *Int J Lab Hematol*. 2018 Aug;40(4):427-436.
89. Ng CWS, Kosmo B, Lee PL, Lee CK, Guo J, Chen Z, Chiu L, Lee HK, Ho S, Zhou J, Lin M, Tan KML, Ban KHK, Tan TW, Chng WJ, Yan B. CEBPA mutational analysis in acute myeloid leukaemia by a laboratory-developed next-generation sequencing assay. *J Clin Pathol*. 2018 Jun;71(6):522-531.
90. Vosberg S, Herold T, Hartmann L, Neumann M, Opatz S, Metzeler KH, Schneider S, Graf A, Krebs S, Blum H, Baldus CD, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK, Mansmann U, Greif PA. Close correlation of copy number aberrations detected by next-generation sequencing with results from routine cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Jul;55(7):553-67.
91. Benard-Slagter A, Zondervan I, de Groot K, Ghazavi F, Sarhadi V, Van Vlierberghe P, De Moerloose B, Schwab C, Vettenranta K, Harrison CJ, Knuutila S, Schouten J, Lammens T, Savola S. Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for Detection of Key Copy Number Alterations in T- and B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *J Mol Diagn*. 2017 Sep;19(5):659-672.
92. Au CH, Wa A, Ho DN, Chan TL, Ma ES. Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms. *Diagn Pathol*. 2016 Jan 22;11:11.
93. Shen W, Paxton CN, Szankasi P, Longhurst M, Schumacher JA, Frizzell KA, Sorrells SM, Clayton AL, Jattani RP, Patel JL, Toydemir R, Kelley TW, Xu X. Detection of genome-wide copy number variants in myeloid malignancies using next-generation sequencing. *J Clin Pathol*. 2018 Apr;71(4):372-378.

94. Montañó A, Hernández-Sánchez J, Forero-Castro M, Matorra-Miguel M, Lumbreras E, Miguel C, Santos S, Ramírez-Maldonado V, Fuster JL, de Las Heras N, García-de Coca A, Sierra M, Dávila J, de la Fuente I, Olivier C, Olazabal J, Martínez J, Vega-García N, González T, Hernández-Rivas JM, Benito R. Comprehensive Custom NGS Panel Validation for the Improvement of the Stratification of B-Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *J Pers Med*. 2020 Sep 21;10(3):137.
95. Alonso CM, Llop M, Sargas C, Pedrola L, Panadero J, Hervás D, Cervera J, Such E, Ibáñez M, Ayala R, Martínez-López J, Onecha E, de Juan I, Palanca S, Martínez- Cuadrón D, Rodríguez-Veiga R, Boluda B, Montesinos P, Sanz G, Sanz MA, Barragán E. Clinical Utility of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia Diagnostics. *J Mol Diagn*. 2019 Mar;21(2):228-240.
96. Podgornik H, Doplihar Kebe A, Klun J, Reberšek K, Šučurović S, Škerget M, Zver S. Recognition of Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia as part of routine diagnostic work-up. *Int J Lab Hematol*. 2022 Feb;44(1):142-149.
97. Soverini S, De Benedittis C, Polakova KM, Linhartova J, Castagnetti F, Guggliotta G, Papayannidis C, Mancini M, Klamova H, Salvucci M, Crugnola M, Iurlo A, Albano F, Russo D, Rosti G, Cavo M, Baccarani M, Martinelli G. Next-generation sequencing for sensitive detection of BCR-ABL1 mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):21982-90.
98. Soverini S, Martelli M, Bavaro L, De Benedittis C, Papayannidis C, Sartor C, Sorà F, Albano F, Galimberti S, Abruzzese E, Annunziata M, Russo S, Stulle M, Imovilli A, Bonifacio M, Maino E, Stagno F, Maria Basilio C, Borlenghi E, Fozza C, Mignone F, Minari R, Stella S, Baccarani M, Cavo M, Martinelli G. Next- generation sequencing improves BCR-ABL1 mutation detection in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2021 Apr;193(2):271-279.
99. de Lange K, de Boer EN, Bosga A, Alimohamed MZ, Johansson LF, Mulder AB, Vellenga E, van Diemen CC, Deelen P, van den Berg E, Sikkema-Raddatz B. Targeted RNA-Sequencing Enables Detection of Relevant Translocations and Single Nucleotide Variants and Provides a Method for Classification of Hematological Malignancies-RANKING. *Clin Chem*. 2020 Dec 1;66(12):1521-1530.
100. Grioni A, Fazio G, Rigamonti S, Bystry V, Daniele G, Dostalova Z, Quadri M, Saitta C, Silvestri D, Songia S, Storlazzi CT, Biondi A, Darzentas N, Cazzaniga G. A Simple RNA Target Capture NGS Strategy for Fusion Genes Assessment in the Diagnostics of Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hemasphere*. 2019 Jun 4;3(3):e250.

101. Szankasi P, Schumacher JA, Kelley TW. Detection of BCR-ABL1 mutations that confer tyrosine kinase inhibitor resistance using massively parallel, next generation sequencing. *Ann Hematol.* 2016 Jan;95(2):201-10.
102. Engvall M, Cahill N, Jonsson BI, Höglund M, Hallböök H, Cavelier L. Detection of leukemia gene fusions by targeted RNA-sequencing in routine diagnostics. *BMC Med Genomics.* 2020 Jul 29;13(1):106.
103. Yeung C, Qu X, Sala-Torra O, Woolston D, Radich J, Fang M. Mutational profiling in acute lymphoblastic leukemia by RNA sequencing and chromosomal genomic array testing. *Cancer Med.* 2021 Aug;10(16):5629-5642.
104. Mareschal S, Palau A, Lindberg J, Ruminy P, Nilsson C, Bengtzén S, Engvall M, Eriksson A, Neddermeyer A, Marchand V, Jansson M, Björklund M, Jardin F, Rantalainen M, Lennartsson A, Cavelier L, Grönberg H, Lehmann S. Challenging conventional karyotyping by next-generation karyotyping in 281 intensively treated patients with AML. *Blood Adv.* 2021 Feb 23;5(4):1003-1016.
105. Mack EKM, Marquardt A, Langer D, Ross P, Ultsch A, Kiehl MG, Mack HID, Haferlach T, Neubauer A, Brendel C. Comprehensive genetic diagnosis of acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Haematologica.* 2019 Feb;104(2):277-287.
106. Hiemenz MC, Ostrow DG, Busse TM, Buckley J, Maglinte DT, Bootwalla M, Done J, Ji J, Raca G, Ryutov A, Xu X, Zhen CJ, Conroy JM, Hazard FK, Deignan JL, Rogers BB, Treece AL, Parham DM, Gai X, Judkins AR, Triche TJ, Biegel JA. OncoKids: A Comprehensive Next-Generation Sequencing Panel for Pediatric Malignancies. *J Mol Diagn.* 2018 Nov;20(6):765-776.
107. Hansen MC, Herborg LL, Hansen M, Roug AS, Hokland P. Combination of RNA- and exome sequencing: Increasing specificity for identification of somatic point mutations and indels in acute leukaemia. *Leuk Res.* 2016 Dec;51:27-31.
108. Izevbaye I, Liang LY, Mather C, El-Hallani S, Maglantay R Jr, Saini L. Clinical Validation of a Myeloid Next-Generation Sequencing Panel for Single-Nucleotide Variants, Insertions/Deletions, and Fusion Genes. *J Mol Diagn.* 2020 Feb;22(2):208-219.
109. Tan DS, Tan DS, Tan IBH, Yan B, Choo SP, Chng WJ, *et al.* Recommendations to improve the clinical adoption of NGS-based cancer diagnostics in Singapore. *Asia Pac J Clin Oncol* 2020 Aug;16(4):222-31.
110. Gupta DG, Varma N, Kumar A, Naseem S, Sachdeva MUS, Binota J, *et al.* PHI- RACE: PGIMER in-house rapid & cost-effective classifier for the detection of BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia in Indian patients. *Leuk Lymphoma* 2021 Nov 16;1-11.
111. Hughes CFM, Gallipoli P, Agarwal R. Design, implementation and clinical utility of next generation sequencing in myeloid malignancies: acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Pathology* 2021 Apr;53(3):328-38.

112. Shirdarreh M, Aziza O, Pezo RC, Jerzak KJ, Warner E. Patients' and Oncologists' Knowledge and Expectations Regarding Tumor Multigene Next-Generation Sequencing: A Narrative Review. *Oncologist*. 2021 Aug;26(8):e1359-e1371.
113. de Moor JS, Gray SW, Mitchell SA, Klabunde CN, Freedman AN. Oncologist Confidence in Genomic Testing and Implications for Using Multimarker Tumor Panel Tests in Practice. *JCO Precis Oncol*. 2020 Jun 11;4:PO.19.00338.
114. Macklin PS, Pillay N, Lee JL, *et al*. CM-Path Molecular Diagnostics Forum—consensus statement on the development and implementation of molecular diagnostic tests in the United Kingdom. *Br J Cancer*. 2019;121(9):738-743.
115. Bacher U, Shumilov E, Flach J, Porret N, Joncourt R, Wiedemann G, Fiedler M, Novak U, Amstutz U, Pabst T. Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood Cancer J*. 2018 Nov 12;8(11):113.
116. Fernández-Mercado M, Vázquez I, Larrayoz MI, Calasanz MJ. Medicina de precisión en onco-hematología: implementación de la secuenciación masiva en el diagnóstico integrado de neoplasias hematológicas. *Genética médica y genómica* [Internet]. 2017 [Consultado 11 Ene 2022]; 01 (3). Disponible en: [https://genotipia.com/revista\\_gm/onco-hematologia/](https://genotipia.com/revista_gm/onco-hematologia/)

# VIII. Anexos

## Anexo I. Estrategias de búsqueda

**Fecha de búsqueda: 6 de octubre de 2021**

### **Medline, vía Pubmed**

#### *Secuenciación Masiva*

- #1 Search: “High-Throughput Nucleotide Sequencing”[Mesh]
- #2 Search: ((next-gen\*[Title/Abstract] OR high-throughput[Title/Abstract] OR illumina[Title/Abstract] OR ion-torrent[Title/Abstract] OR ion-proton[Title/Abstract] OR massively-parallel[Title/Abstract]) AND sequenc\*[Title/Abstract])
- #3 Search #1 OR #2 112,684

#### *Leucemias*

- #4 Search: “Leukemia”[Mesh]
- #5 Search: leukemia[Title/Abstract] OR leukaemia[Title/Abstract] OR leucocythemia[Title/Abstract] OR leucocythaemia[Title/Abstract] OR leukemias[Title/Abstract] OR leukaemias[Title/Abstract] OR leucocythemias[Title/Abstract] OR leucocythaemias[Title/Abstract]
- #6 Search: #4 OR #5 332,541
- #7 Search: #3 AND #6 2,426

#### *Diagnóstico y manejo de salud*

- #8 Search: “Sensitivity and Specificity”[Mesh] OR “Predictive Value of Tests”[Mesh]
- #9 Search: “Diagnosis”[Mesh] OR “False Negative Reactions”[Mesh] OR “False Positive Reactions”[Mesh]
- #10 Search: “Prognosis”[Mesh]
- #11 Search: “Reproducibility of Results”[Mesh] OR “Data Accuracy”[Mesh]
- #12 Search: sensitivit\*[Title/Abstract] OR specificit\*[Title/Abstract] OR “predictive value”[Title/Abstract] OR “false negative”[Title/Abstract] OR “false positive”[Title/Abstract] OR “true positive”[Title/Abstract] OR “true negative”[Title/Abstract] OR npv[Title/Abstract] OR ppv[Title/Abstract] OR performance[Title/Abstract] OR diagnos\*[Title/Abstract] OR prognos\*[Title/Abstract] OR detect\*[Title/Abstract] OR accura\*[Title/Abstract] OR validit\*[Title/Abstract] OR utilit\*[Title/Abstract] OR reliabilit\*[Title/Abstract] OR reproducibilit\*[Title/Abstract]

- #13 Search: “Morbidity”[Mesh] OR “Basic Reproduction Number”[Mesh] OR “Incidence”[Mesh] OR “Prevalence”[Mesh]
- #14 Search: “Mortality”[Mesh] OR “mortality”[Subheading]
- #15 Search: “Quality of Life”[Mesh]
- #16 Search: morbidity\*[Title/Abstract] OR (reproduct\*[Title/Abstract] AND (number[Title/Abstract] OR rate[Title/Abstract] OR ratio[Title/Abstract])) OR incidenc\*[Title/Abstract] OR prevalenc\*[Title/Abstract] OR mortalit\*[Title/Abstract] OR ((fatality[Title/Abstract] OR death[Title/Abstract]) AND rate\*[Title/Abstract]) OR (quality[Title/Abstract] AND life[Title/Abstract])
- #17 Search: #8 OR #9 OR #10 OR #11 OR #12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16 14,983,918
- #18 Search: #7 AND #18 1,927
- #19 Search: #18 Filters: from 2015 - 2021 Sort by: Most Recent
- #20 Search: ((“2015/01/01”[Date - Create] : “3000”[Date - Create])) OR ((“2015/01/01”[Date - Publication] : “3000”[Date - Publication]))
- #21 Search: #18 AND #20
- #22 Search: #19 OR #21 **1,588**
- #23 Search: #22 Filters: English, Spanish **1,510**

*Valores, barreras, etc.*

- #24 Search: “Attitude”[Mesh] OR “Attitude to Health”[Mesh] OR “Health Knowledge, Attitudes, Practice”[Mesh]
- #25 Search: “Interviews as Topic”[Mesh] OR “Surveys and Questionnaires”[Mesh]
- #26 Search: “Patient Satisfaction”[Mesh] OR “Patient Preference”[Mesh]
- #27 Search: “Intention”[Mesh] OR “Motivation”[Mesh] OR “Qualitative Research”[Mesh]
- #28 Search: attitude\*[Title/Abstract] OR opinion\*[Title/Abstract] OR knowledge[Title/Abstract] OR interview\*[Title/Abstract] OR survey\*[Title/Abstract] OR questionnaire\*[Title/Abstract] OR satisfaction[Title/Abstract] OR preference\*[Title/Abstract] OR perspective\*[Title/Abstract] OR experience\*[Title/Abstract] OR need\*[Title/Abstract] OR value\*[Title/Abstract] OR motivation[Title/Abstract] OR expectati\*[Title/Abstract] OR intention\*[Title/Abstract] OR qualitative[Title/Abstract] OR mix-method\*[Title/Abstract] OR barrier\*[Title/Abstract] OR facilitator\*[Title/Abstract] OR challenge\*[Title/Abstract] OR confiden\*[Title/Abstract] OR enhance\*[Title/Abstract] OR implication\*[Title/Abstract]
- #29 Search: #24 OR #25 OR #26 OR #27 OR #28 9,850,011
- #30 Search: #7 AND #29 **877**
- #31 Search: #30 Filters: English, Spanish **846**

## **Embase, vía OvidWeb**

### *Secuenciación masiva*

- 1 high throughput sequencing/
- 2 (next-gen\* or high-throughput or illumina or ion-torrent or ion-proton or massively- parallel).ab,ti.
- 3 “sequenc\*”.ab,ti.
- 4 2 and 3
- 5 1 or 4 151764

### *Leucemia*

- 6 leukemia/
- 7 (leukemia or leukaemia or leucocythemia or leucocythaemia or leukemias or leukaemias or leucocythemias or leucocythaemias).ab,ti.
- 8 6 or 7 417973
- 9 5 and 8 6811

### *Diagnóstico y manejo de salud*

- 10 “sensitivity and specificity”/
- 11 predictive value/
- 12 diagnosis/
- 13 cancer diagnosis/ or diagnosis/
- 14 prognosis/ or cancer prognosis/
- 15 false negative result/
- 16 false positive result/
- 17 reproducibility/
- 18 data accuracy/
- 19 (sensitiv\* or specific\* or “predictive value” or “false negative” or “false positive” or “true positive” or “true negative” or npv or ppv or performance or diagnos\* or prognos\* or detect\* or accura\* or validit\* or utilit\* or reliabilit\* or reproducibilit\*).ab,ti.
- 20 10 or 11 or 12 or 13 or 14 or 15 or 16 or 17 or 18 or 19 10888464
- 21 morbidity/
- 22 basic reproduction number/
- 23 cancer incidence/ or incidence/
- 24 prevalence/
- 25 cancer mortality/ or mortality/
- 26 “quality of life”/
- 27 (morbidity\* or incidenc\* or prevalenc\* or mortalit\*).ab,ti.
- 28 (reproduct\* and (number or rate or ratio)).ab,ti.
- 29 ((fatality or death) and rate\*).ab,ti.
- 30 (quality and life).ab,ti.
- 31 21 or 22 or 23 or 24 or 25 or 26 or 27 or 28 or 29 or 30 4724054
- 32 20 or 31 13781900

|    |                                  |      |             |
|----|----------------------------------|------|-------------|
| 33 | 9 and 325654                     |      |             |
| 34 | limit 33 to conference abstracts |      |             |
| 35 | 33 not 34                        | 1792 |             |
| 36 | limit 35 to yr="2015 -Current"   |      | <b>1471</b> |
| 37 | limit 36 to (english or spanish) |      | <b>1405</b> |

*Valores, barreras, etc.*

|    |  |          |            |
|----|--|----------|------------|
| 38 | attitude to health/ or attitude/   |          |            |
| 39 | interview/   |          |            |
| 40 | questionnaire/   |          |            |
| 41 | satisfaction/ or customer satisfaction/ or patient satisfaction/   |          |            |
| 42 | patient preference/  |          |            |
| 43 | behavior/  |          |            |
| 44 | motivation/  |          |            |
| 45 | qualitative research/  |          |            |
| 46 | (attitude* or opinion* or knowledge or interview* or survey* or questionnaire* or satisfaction or preference* or perspective* or experience* or need* or value* or motivation or expectati* or intention* or qualitative or mix-method* or barrier* or facilitator* or challenge* or confiden* or enhance* or implication*).ab,ti. |          |            |
| 47 | 38 or 39 or 40 or 41 or 42 or 43 or 44 or 45 or 46   | 12493392 |            |
| 48 | 9 and 473043   |          |            |
| 49 | limit 48 to conference abstracts   |          |            |
| 50 | 48 not 49  |          | <b>848</b> |
| 51 | limit 50 to (english or spanish)   |          | <b>820</b> |

**Cochrane Library**

*Secuenciación masiva*

|    |  |  |  |
|----|--|--|--|
| #1 | MeSH descriptor: [High-Throughput Nucleotide Sequencing] explode all trees   |  |  |
| #2 | (next-gen* or high-throughput or illumina or ion-torrent or ion-proton or massively-parallel):ti AND (sequenc*):ti |  |  |
| #3 | (next-gen* or high-throughput or illumina or ion-torrent or ion-proton or massively-parallel):ab AND (sequenc*):ab |  |  |
| #4 | #1 OR #2 OR #3 26740   |  |  |

*Leucemia*

|    |   |     |  |
|----|---|-----|--|
| #5 | MeSH descriptor: [Leukemia] explode all trees   |     |  |
| #6 | (leukemia or leukaemia or leucocythemia or leucocythaemia or leukemias or leukaemias or leucocythemias or leucocythaemias):ti   |     |  |
| #7 | ((leukemia or leukaemia or leucocythemia or leucocythaemia or leukemias or leukaemias or leucocythemias or leucocythaemias)):ab |     |  |
| #8 | #5 OR #6 OR #7 14004  |     |  |
| #9 | #4 AND #8   | 350 |  |

*Medidas de resultado (diagnóstico, manejo, valores, barreras...)*

- #10 MeSH descriptor: [Sensitivity and Specificity] explode all trees
- #11 MeSH descriptor: [Predictive Value of Tests] explode all trees
- #12 MeSH descriptor: [Diagnosis] explode all trees
- #13 MeSH descriptor: [False Negative Reactions] explode all trees
- #14 MeSH descriptor: [False Positive Reactions] explode all trees
- #15 MeSH descriptor: [Prognosis] explode all trees
- #16 MeSH descriptor: [Reproducibility of Results] explode all trees
- #17 MeSH descriptor: [Data Accuracy] explode all trees
- #18 (sensitivit\* or specificit\* or “predictive value” or “false negative” or “false positive” or “true positive” or “true negative” or npv or ppv or performance or diagnos\* or prognos\* or detect\* or accura\* or validit\* or utilit\* or reliabilit\* or reproducibilit\*):ti
- #19 (sensitivit\* or specificit\* or “predictive value” or “false negative” or “false positive” or “true positive” or “true negative” or npv or ppv or performance or diagnos\* or prognos\* or detect\* or accura\* or validit\* or utilit\* or reliabilit\* or reproducibilit\*):ab
- #20 MeSH descriptor: [Morbidity] explode all trees
- #21 MeSH descriptor: [Basic Reproduction Number] explode all trees
- #22 MeSH descriptor: [Incidence] explode all trees
- #23 MeSH descriptor: [Prevalence] explode all trees
- #24 MeSH descriptor: [Mortality] explode all trees
- #25 MeSH descriptor: [Quality of Life] explode all trees
- #26 (morbidit\* or incidenc\* or prevalenc\* or mortalit\*):ti
- #27 (morbidit\* or incidenc\* or prevalenc\* or mortalit\*):ab
- #28 (reproduct\* and (number or rate or ratio)):ti
- #29 (reproduct\* and (number or rate or ratio)):ab
- #30 ((fatality or death) and rate\*):ti
- #31 (((fatality or death) and rate\*)):ab
- #32 (quality and life):ti,ab,kw
- #33 #10 OR #11 OR #12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16 OR #17 OR #18 OR #19 OR #20 OR #21 OR #22 OR #23 OR #24 OR #25 OR #26 OR #27 OR #28 OR #29 OR #30 OR #31 OR #32 851278
- #34 #9 AND #33 **277**  
Year: Custom year range 2015-2021 **200**

*Valores, barreras, etc.*

- #35 MeSH descriptor: [Attitude] explode all trees
- #36 MeSH descriptor: [Attitude to Health] explode all trees
- #37 MeSH descriptor: [Health Knowledge, Attitudes, Practice] explode all trees
- #38 MeSH descriptor: [Interviews as Topic] explode all trees

- #39 MeSH descriptor: [Surveys and Questionnaires] explode all trees  
 #40 MeSH descriptor: [Patient Satisfaction] explode all trees  
 #41 MeSH descriptor: [Patient Preference] explode all trees #42 M e S H  
 descriptor: [Intention] explode all trees  
 #43 MeSH descriptor: [Motivation] explode all trees  
 #44 MeSH descriptor: [Qualitative Research] explode all trees  
 #45 (attitude\* or opinion\* or knowledge or interview\* or survey\* or ques-  
 tionnaire\* or satisfaction or preference\* or perspective\* or experien-  
 ce\* or need\* or value\* or motivation or expectati\* or intention\* or  
 qualitative or mix-method\* or barrier\* or facilitator\* or challenge\* or  
 confiden\* or enhance\* or implication\*):ti  
 #46 (attitude\* or opinion\* or knowledge or interview\* or survey\* or ques-  
 tionnaire\* or satisfaction or preference\* or perspective\* or experien-  
 ce\* or need\* or value\* or motivation or expectati\* or intention\* or  
 qualitative or mix-method\* or barrier\* or facilitator\* or challenge\* or  
 confiden\* or enhance\* or implication\*):ab  
 #47 #35 OR #36 OR #37 OR #38 OR #39 OR #40 OR #41 OR #42 OR #43  
 OR #44 OR #45 OR #46 718399  
 #48 #9 AND #47 **168**

### **Cinahl, vía EbscoHost**

#### *Secuenciación masiva*

- S1 (MH “High-Throughput Screening Assays”)  
 S2 TI ( next-gen\* or high-throughput or illumina or ion-torrent or ion-  
 proton or massively-parallel ) OR AB ( next-gen\* or high-throughput  
 or illumina or ion-torrent or ion-proton or massively- parallel )  
 S3 TI sequenc\* OR AB sequenc\*  
 S4 S2 AND S3  
 S5 S1 OR S4 7,434

#### *Leucemia*

- S6 (MH “Leukemia”)  
 S7 TI ( leukemia or leukaemia or leucocythemia or leucocythaemia or  
 leukemias or leukaemias or leucocythemias or leucocythaemias ) OR  
 AB ( leukemia or leukaemia or leucocythemia or leucocythaemia or  
 leukemias or leukaemias or leucocythemias or leucocythaemias )  
 S8 S6 OR S7 27,727  
 S9 S5 AND S8 260

#### *Diagnóstico y manejo*

- S10 (MH “Sensitivity and Specificity”)  
 S11 (MH “Predictive Value of Tests”)  
 S12 (MH “Diagnosis”)

- S13 (MH “False Negative Results”)  
 S14 (MH “Prognosis”)  
 S15 (MH “Reproducibility of Results”)  
 S16 (MH “Validity”)  
 S17 TI ( sensitivit\* or specificit\* or “predictive value” or “false negative” or “false positive” or “true positive” or “true negative” or npv or ppv or performance or diagnos\* or prognos\* or detect\* or accura\* or validit\* or utilit\* or reliabilit\* or reproducibilit\* ) OR AB ( sensitivit\* or specificit\* or “predictive value” or “false negative” or “false positive” or “true positive” or “true negative” or npv or ppv or performance or diagnos\* or prognos\* or detect\* or accura\* or validit\* or utilit\* or reliabilit\* or reproducibilit\* )  
 S18 (MH “Mortality”)  
 S19 (MH “Morbidity”)  
 S20 (MH “Basic Reproduction Number”)  
 S21 (MH “Incidence”)  
 S22 (MH “Prevalence”)  
 S23 (MH “Quality of Life”)  
 S24 TI ( morbidit\* or incidenc\* or prevalenc\* or mortalit\* ) OR AB ( morbidit\* or incidenc\* or prevalenc\* or mortalit\* )  
 S25 TI ( reproduct\* and (number or rate or ratio) ) OR AB ( reproduct\* and (number or rate or ratio) )  
 S26 TI ( quality and life ) OR AB ( quality and life )  
 S27 S10 OR S11 OR S12 OR S13 OR S14 OR S15 OR S16 OR S17 OR S18 OR S19 OR S20 OR S21 OR S22 OR S23 OR S24 OR S25 OR S26 1,894,772  
 S28 S9 AND S27 **215**  
 S29 S28 Limitadores - Fecha de publicación: 20150101-20211231 **174**

*Valores, barreras, etc.*

- S30 (MH “Attitude”) OR (MH “Attitude to Illness”) OR (MH “Attitude to Disability”) OR (MH “Attitude to Death”) OR (MH “Consumer Attitudes”) OR (MH “Attitude to Risk”) OR (MH “Attitude to Health”)  
 S31 (MH “Health Knowledge”)  
 S32 (MH “Interviews”) OR (MH “Surveys”)  
 S33 (MH “Questionnaires”)  
 S34 (MH “Patient Satisfaction”)  
 S35 (MH “Patient Preference”)  
 S36 (MH “Intention”)  
 S37 (MH “Motivation”)  
 S38 (MH “Qualitative Studies”)

- S39 TI ( attitude\* or opinion\* or knowledge or interview\* or survey\* or questionnaire\* or satisfaction or preference\* or perspective\* or experience\* or need\* or value\* or motivation or expectati\* or intention\* or qualitative or mix-method\* or barrier\* or facilitator\* or challenge\* or confiden\* or enhance\* or implication\* ) OR AB ( attitude\* or opinion\* or knowledge or interview\* or survey\* or questionnaire\* or satisfaction or preference\* or perspective\* or experience\* or need\* or value\* or motivation or expectati\* or intention\* or qualitative or mix-method\* or barrier\* or facilitator\* or challenge\* or confiden\* or enhance\* or implication\* )
- S40 S30 OR S31 OR S32 OR S33 OR S34 OR S35 OR S36 OR S37 OR S38 OR S39 2,590,489
- S41 S9 AND S40 97

### **Estrategias de búsqueda estudios de costes**

**Fecha de búsqueda: 15 de diciembre de 2021 CEA Registry**

leukemia AND sequenc\* 0

#### **HTA International Database**

- #1 “High-Throughput Nucleotide Sequencing”[mh]
- #2 (next-gen\* OR high-throughput OR illumina OR ion-torrent OR ion-proton OR massively- parallel)[title]
- #3 (sequenc\*)[title]
- #4 #2 AND #3
- #5 (next-gen\* OR high-throughput OR illumina OR ion-torrent OR ion-proton OR massively- parallel)[abs]
- #6 (sequenc\*)[abs]
- #7 #5 AND #6
- #8 #1 OR #4 OR #7 168
- #9 “Leukemia”[mh]
- #10 (leukemia OR leukaemia OR leucocythemia OR leucocythaemia OR leukemias OR leukaemias OR leucocythemias OR leucocythaemias) [title]
- #11 (leukemia OR leukaemia OR leucocythemia OR leucocythaemia OR leukemias OR leukaemias OR leucocythemias OR leucocythaemias) [abs]
- #12 #9 OR #10 OR #11 225
- #13 #8 AND #12 3

#### *Estudios de costes*

- #14 “Economics”[mh]
- #15 “Models, Economic”[mh]

- #16 “Cost Allocation”[mh]
- #17 “Cost Control”[mh]
- #18 “Cost-Benefit Analysis”[mh]
- #19 “Costs and Cost Analysis”[mh]
- #20 “Health Care Costs”[mh]
- #21 “Health Expenditures”[mh]
- #22 “Decision Trees”[mh]
- #23 “Monte Carlo Method”[mh]
- #24 “Markov Chains”[mh]
- #25 (economic\* or cost\* or pric\* or expenditur\* or expens\* or financ\* or fee or fees or modelization)[title] OR (economic\* or cost\* or pric\* or expenditur\* or expens\* or financ\* or fee or fees or modelization)[abs]
- #26 (decision\* and (tree\* or analys\*))[title] OR (decision\* and (tree\* or analys\*))[abs]
- #27 (decision-tree\*)[title] OR (decision-tree\*)[abs]
- #28 (financial and impact\*)[title] OR (financial and impact\*)[abs]
- #29 (“monte carlo” OR markov)[title] OR (“monte carlo” OR markov)[abs]
- #30 #14 OR #15 OR #16 OR #17 OR #18 OR #19 OR #20 OR #21 OR #22 OR #23 OR #24 OR #25 OR #26 OR #27 OR #28 OR #29 5312
- #31 #13 AND #30 0

### **Medline, vía Pubmed**

#### *Secuenciacion Masiva*

- #1 Search: “High-Throughput Nucleotide Sequencing”[Mesh]
- #2 Search: ((next-gen\*[Title/Abstract] OR high-throughput[Title/Abstract] OR illumina[Title/Abstract] OR ion-torrent[Title/Abstract] OR ion-proton[Title/Abstract] OR massively-parallel[Title/Abstract]) AND sequenc\*[Title/Abstract])
- #3 Search #1 OR #2 116,318

#### *Leucecias*

- #4 Search: “Leukemia”[Mesh]
- #5 Search: leukemia[Title/Abstract] OR leukaemia[Title/Abstract] OR leucocythemia[Title/Abstract] OR leucocythaemia[Title/Abstract] OR leukemias[Title/Abstract] OR leukaemias[Title/Abstract] OR leucocythemias[Title/Abstract] OR leucocythaemias[Title/Abstract]
- #6 Search: #4 OR #5 334,704
- #7 Search: #3 AND #6 2,520

#### *Costes*

- #8 “Economics”[Mesh]
- #9 Search: “Models, Economic”[Mesh]

- #10 Search: “Costs and Cost Analysis”[Mesh] OR “Cost Allocation”[Mesh] OR “Cost-Benefit Analysis”[Mesh] OR “Cost Control”[Mesh] OR “Health Care Costs”[Mesh] OR “Health Expenditures”[Mesh]
- #11 Search: “Decision Trees”[Mesh] OR “Monte Carlo Method”[Mesh] OR “Markov Chains”[Mesh]
- #12 Search: cost\*[Title/Abstract] OR economic\*[Title/Abstract] OR pric\*[Title/Abstract] OR expenditure\*[Title/Abstract] OR fee[Title/Abstract] OR fees[Title/Abstract] OR modelization[Title/Abstract]
- #13 Search: decision\*[Title/Abstract] AND (tree\*[Title/Abstract] OR analys\*[Title/Abstract])
- #14 Search: decision-tree\*[Title/Abstract]
- #15 Search: financial[Title/Abstract] AND impact\*[Title/Abstract]
- #16 Search: “monte carlo”[Title/Abstract] OR markov[Title/Abstract]
- #17 Search: #8 OR #9 OR #10 OR #11 OR #12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16 1,646,148
- #18 Search: #7 AND #17 147
- #19 Search: #18 Filters: English, Spanish 143

### **Embase, vía OvidWeb**

#### *Secuenciación masiva*

- 1 high throughput sequencing/  
 2 (next-gen\* or high-throughput or illumina or ion-torrent or ion-proton or massively- parallel).ab,ti.  
 3 “sequenc\*”.ab,ti.  
 4 2 and 3  
 5 1 or 4 155829

#### *Leucemia*

- 6 leukemia/  
 7 (leukemia or leukaemia or leucocythemia or leucocythaemia or leukemias or leukaemias or leucocythemias or leucocythaemias).ab,ti.  
 8 6 or 7 420487  
 9 5 and 8 6956

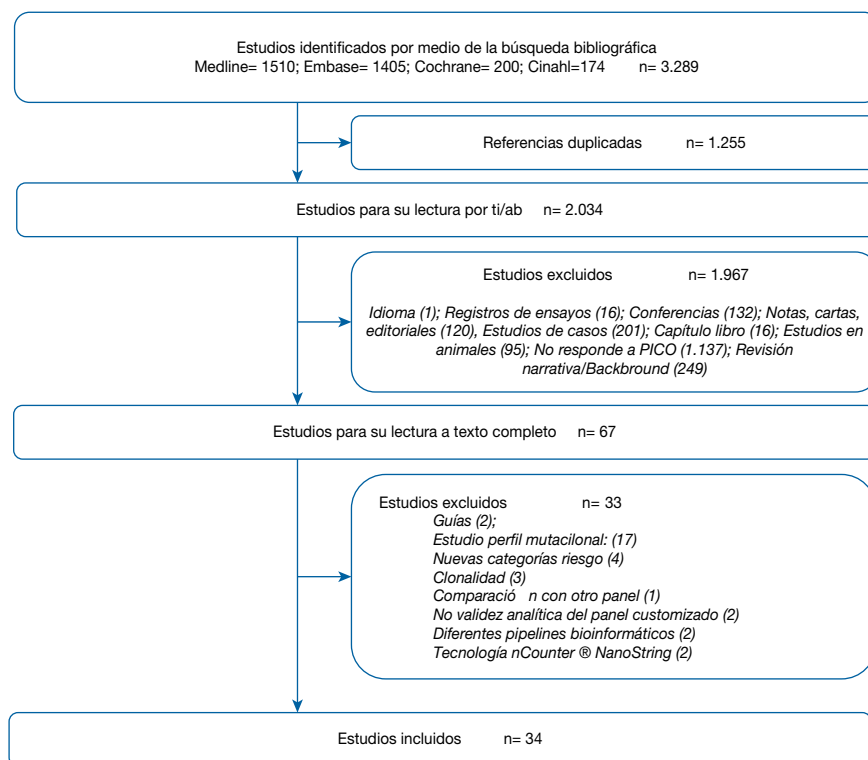
#### *Costes*

- 10 economics/ or health economics/  
 11 “cost utility analysis”/ or “cost benefit analysis”/ or “health care cost”/ or “cost”/ or “cost effectiveness analysis”/ or “cost control”/ or “program cost effectiveness”/  
 12 (economic\* or cost\* or pric\* or expenditur\* or expens\* or financ\* or fee or fees or modelization).ab,ti.  
 13 economic model/  
 14 “decision tree”/

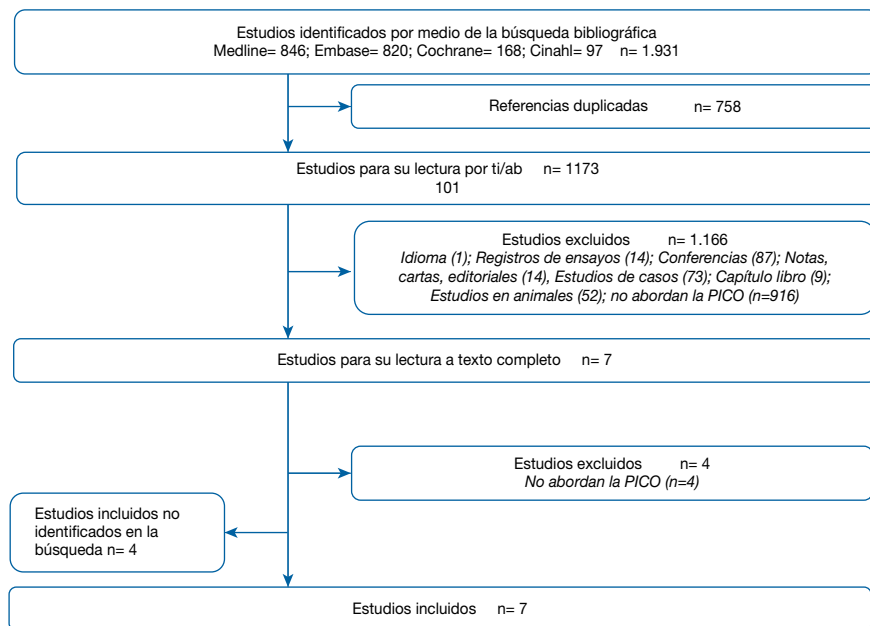
|    |   |            |
|----|---|------------|
| 15 | Monte Carlo method/   |            |
| 16 | Markov chain/   |            |
| 17 | (decision* and (tree* or analys*)).ab,ti.                             |            |
| 18 | “decision-tree*” .ab,ti.  |            |
| 19 | (financial and impact*).ab,ti.  |            |
| 20 | (“monte carlo” or markov).ab,ti.                                      |            |
| 21 | 10 or 11 or 12 or 13 or 14 or 15 or 16 or 17 or 18 or 19 or 20 xxxxxx |            |
| 22 | 9 and 22679   |            |
| 23 | limit 22 to conference abstracts                                      |            |
| 24 | 22 not 23   | 144        |
| 23 | limit 22 to (english or spanish)                                      | <b>143</b> |

## Anexo II. Diagramas de flujo de todas las búsquedas realizadas

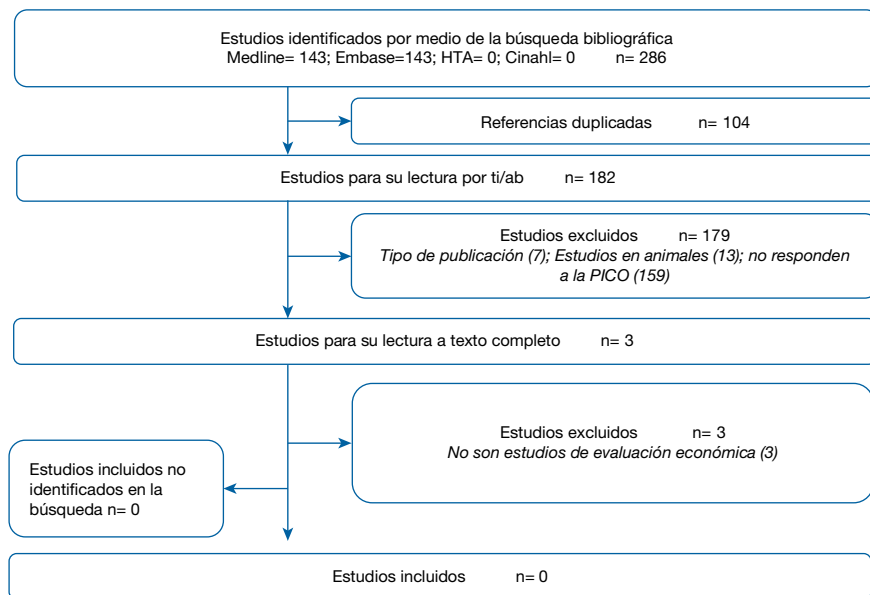
Diagrama de flujo de utilidad y validez de la NGS en leucemias agudas



## Diagrama de flujo de Valores/Barreras para el uso de la NGS en leucemias agudas



## Diagrama de flujo de estudios de costes sobre el uso de NGS en leucemias agudas



## Anexo III. Estudios excluidos

### 1. Estudios excluidos de la búsqueda de validez y utilidad

| Nº | Referencia                            | Razón para exclusión   |
|----|---------------------------------------|--|
| 1  | Akhter <i>et al.</i> , 2016           | Se estudia la tecnología nCounter® de NanoString.  |
| 2  | Gianfelici V <i>et al.</i> , 2016     | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 3  | Kadia TM <i>et al.</i> , 2016         | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 4  | Shiba N <i>et al.</i> , 2016          | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 5  | Thakral G <i>et al.</i> , 2016        | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 6  | Lin <i>et al.</i> , 2017              | Escalas de riesgo para clasificar a los pacientes.   |
| 7  | Yap KL <i>et al.</i> , 2017           | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 8  | Zakaria Z <i>et al.</i> , 2017        | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 9  | Hussaini <i>et al.</i> , 2018         | Comparan resultados de dos paneles de genes, sin comprobar con otras técnicas convencionales.                  |
| 10 | Marceau-Renaut A <i>et al.</i> , 2018 | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 11 | Prassek VV <i>et al.</i> , 2018       | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 12 | Su <i>et al.</i> , 2018               | Perfil mutacional de pacientes con LMA y mutación doble en CEPBA, validando solo una muestra aleatoria.        |
| 13 | Akin <i>et al.</i> , 2019             | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 14 | Kim 2019                              | Uso diferentes <i>pipelines</i> bioinformáticos para mejorar proceso de identificación de variantes genéticas. |
| 15 | Kim <i>et al.</i> , 2019              | No se evalúa la validez analítica del panel customizado.   |
| 16 | Leung <i>et al.</i> , 2019            | Investigan o describen nuevas categorías de riesgo.  |

.../...

.../...

| Nº | Referencia                        | Razón para exclusión   |
|----|-----------------------------------|--|
| 17 | Rowsey RA <i>et al.</i> , 2019    | Nuevas reordenaciones de un gen en concreto o genes de fusión.   |
| 18 | Janic <i>et al.</i> , 2020        | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 19 | Lay L 2020                        | Estudio de clonalidad por NGS.   |
| 20 | Onecha <i>et al.</i> , 2020       | Escalas de riesgo para clasificar a los pacientes.   |
| 21 | Prieto-Conde <i>et al.</i> , 2020 | No se evalúa la validez analítica del panel customizado.   |
| 22 | Sánchez <i>et al.</i> , 2020      | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 23 | Tsai 2020                         | Uso diferentes <i>pipelines</i> bioinformáticos para mejorar proceso de identificación de variantes genéticas. |
| 24 | Yasuda <i>et al.</i> , 2020       | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 25 | Ayala R <i>et al.</i> , 2021      | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |
| 26 | Chen <i>et al.</i> , 2021         | Estudio de clonalidad por NGS.   |
| 27 | Docking <i>et al.</i> , 2021      | Escalas de riesgo para clasificar a los pacientes.   |
| 28 | Haley L <i>et al.</i> , 2021      | Se estudia la tecnología nCounter® de NanoString.  |
| 29 | Navrkalova 2021                   | Estudio de clonalidad por NGS.   |
| 30 | Rosenthal <i>et al.</i> , 2021    | Se comparan los resultados obtenidos con los de otro panel, no con técnicas convencionales.                    |
| 31 | Papuc <i>et al.</i> , 2021        | Describen perfil mutacional de los pacientes por NGS, sin comprobar resultados por otras técnicas.             |

## Referencias

Akhter A, Mughal MK, Elyamany G, Sinclair G, Azma RZ, Masir N, Shuib S, Rashid- Kolvear F, Shabani-Rad MT, Stewart DA, Mansoor A. Multiplexed automated digital quantification of fusion transcripts: comparative study with fluorescent in-situ hybridization (FISH) technique in acute leukemia patients. *Diagn Pathol.* 2016 Sep 15;11(1):89.

Gianfelici V, Chiaretti S, Demeyer S, Di Giacomo F, Messina M, La Starza R, Peragine N, Paoloni F, Geerdens E, Pierini V, Elia L, Mancini M, De Propris MS, Apice-Illa V, Gaidano G, Testi AM, Vitale A, Vignetti M, Mecucci C, Guarini A, Cools J,

Foà R. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications. *Haematologica*. 2016 Aug;101(8):941-50.

Kadia TM, Jain P, Ravandi F, Garcia-Manero G, Andreef M, Takahashi K, Borthakur G, Jabbour E, Konopleva M, Daver NG, Dinardo C, Pierce S, Kanagal-Shamanna R, Patel K, Estrov Z, Cortes J, Kantarjian HM. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. *Cancer*. 2016 Nov 15;122(22):3484-3491.

Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park MJ, Ohki K, Shimada A, Takita J, Tomizawa D, Kudo K, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Tawa A, Ito E, Horibe K, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016 Nov;175(3):476-489.

Thakral G, Vierkoetter K, Namiki S, Lawicki S, Fernandez X, Ige K, Kawahara W, Lum C. AML multi-gene panel testing: A review and comparison of two gene panels. *Pathol Res Pract*. 2016 May;212(5):372-80.

Lin PH, Li HY, Fan SC, Yuan TH, Chen M, Hsu YH, Yang YH, Li LY, Yeh SP, Bai LY, Liao YM, Lin CY, Hsieh CY, Lin CC, Lin CH, Lien MY, Chen TT, Ni YH, Chiu CF. A targeted next-generation sequencing in the molecular risk stratification of adult acute myeloid leukemia: implications for clinical practice. *Cancer Med*. 2017 Feb;6(2):349-360.

Yap KL, Furtado LV, Kiyotani K, Curran E, Stock W, McNeer JL, Kadri S, Segal JP, Nakamura Y, Le Beau MM, Gurbuxani S, Raca G. Diagnostic evaluation of RNA sequencing for the detection of genetic abnormalities associated with Ph-like acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Lymphoma*. 2017 Apr;58(4):950-958.

Zakaria Z, Othman N, Ismail A, Kamaluddin NR, Esa E, Abdul Rahman EJ, Mat Yusoff Y, Mohd Fauzi F, Sew Keoh T. Whole-Exome Sequencing of ETV6/RUNX1 in Four Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Cases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Apr 1;18(4):1169-1175.

Hussaini MO, Mirza AS, Komrokji R, Lancet J, Padron E, Song J. Genetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia Interrogated by Next-generation Sequencing: A Large Cancer Center Experience. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018 Mar-Apr;15(2):121-126.

Marceau-Renaut A, Duployez N, Ducourneau B, Labopin M, Petit A, Rousseau A, Geffroy S, Bucci M, Cucuini W, Fenneteau O, Ruminy P, Nelken B, Ducassou S, Gandemer V, Leblanc T, Michel G, Bertrand Y, Baruchel A, Leverger G, Preudhomme C, Lapillonne H. Molecular Profiling Defines Distinct Prognostic Subgroups in Childhood AML: A Report From the French ELAM02 Study Group. *Hemasphere*. 2018 Feb 21;2(1):e31.

Prassek VV, Rothenberg-Thurley M, Sauerland MC, Herold T, Janke H, Ksienzyk B, Konstantin NP, Goerlich D, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Braess J, Schneider S, Subklewe M, Bohlander SK, Hiddemann W, Spiekermann K, Metzeler KH. Genetics of acute myeloid leukemia in the elderly: mutation spectrum and clinical impact in intensively treated patients aged 75 years or older. *Haematologica*. 2018 Nov;103(11):1853-1861.

Su L, Tan Y, Lin H, Liu X, Yu L, Yang Y, Liu S, Bai O, Yang Y, Jin F, Sun J, Liu C, Liu Q, Gao S, Li W. Mutational spectrum of acute myeloid leukemia patients with double CEBPA mutations based on next-generation sequencing and its prognostic significance. *Oncotarget*. 2018 Jan 3;9(38):24970-24979.

Akin DF, Oner DA, Kurekci E, Akar N. Determination of CEBPA mutations by next generation sequencing in pediatric acute leukemia. *Bratisl Lek Listy*. 2018;119(6):366- 372.

Kim B, Kim S, Lee ST, Min YH, Choi JR. FLT3 Internal Tandem Duplication in Patients With Acute Myeloid Leukemia Is Readily Detectable in a Single Next-Generation Sequencing Assay Using the Pindel Algorithm. *Ann Lab Med*. 2019 May;39(3):327-329.

Kim B, Lee H, Kim E, Shin S, Lee ST, Choi JR. Clinical utility of targeted NGS panel with comprehensive bioinformatics analysis for patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2019 Dec;60(13):3138-3145.

Leung GMK, Zhang C, Ng NKL, Yang N, Lam SSY, Au CH, Chan TL, Ma ESK, Tsui SP, Ip HW, So JCC, Ng MHL, Cheng KCK, Wong KF, Siu LLP, Yip SF, Lin SY, Lau JSM, Luk TH, Lee HKK, Lau CK, Kho B, Kwong YL, Leung AYH. Distinct mutation spectrum, clinical outcome and therapeutic responses of typical complex/monosomy karyotype acute myeloid leukemia carrying TP53 mutations. *Am J Hematol*. 2019 Jun;94(6):650-657.

Rowsey RA, Smoley SA, Williamson CM, Vasmatzis G, Smadbeck JB, Ning Y, Greipp PT, Hoppman NL, Baughn LB, Ketterling RP, Peterson JF. Characterization of TCF3 rearrangements in pediatric B-lymphoblastic leukemia/lymphoma by mate-pair sequencing (MPseq) identifies complex genomic rearrangements and a novel TCF3/TEF gene fusion. *Blood Cancer J*. 2019 Oct 1;9(10):81.

Janic D, Peric J, Karan-Djurasevic T, Kostic T, Marjanovic I, Stanic B, Pejanovic N, Dokmanovic L, Ladic J, Krstovski N, Virijevec M, Tomin D, Vidovic A, Suvajdzic-Vukovic N, Pavlovic S, Tosic N. Application of targeted next generation sequencing for the mutational profiling of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Med Biochem*. 2020 Jan 10;39(1):72-82.

Lay L, Stroup B, Payton JE. Validation and interpretation of IGH and TCR clonality testing by Ion Torrent S5 NGS for diagnosis and disease monitoring in B and T cell cancers. *Pract Lab Med*. 2020 Nov 25;22:e00191.

Onecha E, Ruiz-Heredia Y, Martínez-Cuadrón D, Barragán E, Martínez-Sánchez P, Linares M, Rapado I, Pérez-Oteyza J, Magro E, Herrera P, Rojas JL, Gorrochategui

J, Villoria J, Boluda B, Sargas C, Ballesteros J, Montesinos P, Martínez-López J, Ayala R. Improving the prediction of acute myeloid leukaemia outcomes by complementing mutational profiling with ex vivo chemosensitivity. *Br J Haematol.* 2020 May;189(4):672-683.

Prieto-Conde MI, Corchete LA, García-Álvarez M, Jiménez C, Medina A, Balanzategui A, Hernández-Ruano M, Maldonado R, Sarasquete ME, Alcoceba M, Puig N, González-Calle V, García-Sanz R, Gutiérrez NC, González-Díaz M, Chillón MC. A New Next-Generation Sequencing Strategy for the Simultaneous Analysis of Mutations and Chromosomal Rearrangements at DNA Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. *J Mol Diagn.* 2020 Jan;22(1):60-71.

Sánchez R, Ribera J, Morgades M, Ayala R, Onecha E, Ruiz-Heredia Y, Juárez-Rufián A, de Nicolás R, Sánchez-Pina J, Vives S, Zamora L, Mercadal S, Coll R, Cervera M, García O, Ribera JM, Martínez-López J. A novel targeted RNA-Seq panel identifies a subset of adult patients with acute lymphoblastic leukemia with BCR-ABL1-like characteristics. *Blood Cancer J.* 2020 Apr 24;10(4):43.

Tsai HK, Brackett DG, Szeto D, Frazier R, MacLeay A, Davineni P, Manning DK, García E, Lindeman NI, Le LP, Lennerz JK, Gibson CJ, Lindsley RC, Kim AS, Nardi V. Targeted Informatics for Optimal Detection, Characterization, and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplications Across Multiple Next-Generation Sequencing Platforms. *J Mol Diagn.* 2020 Sep;22(9):1162-1178.

Yasuda T, Sanada M, Nishijima D, Kanamori T, Iijima Y, Hattori H, Saito A, Miyoshi H, Ishikawa Y, Asou N, Usuki K, Hirabayashi S, Kato M, Ri M, Handa H, Ishida T, Shibayama H, Abe M, Iriyama C, Karube K, Nishikori M, Ohshima K, Kataoka K, Yoshida K, Shiraishi Y, Goto H, Adachi S, Kobayashi R, Kiyoi H, Miyazaki Y, Ogawa S, Kurahashi H, Yokoyama H, Manabe A, Iida S, Tomita A, Horibe K. Clinical utility of target capture-based panel sequencing in hematological malignancies: A multicenter feasibility study. *Cancer Sci.* 2020 Sep;111(9):3367-3378.

Ayala R, Rapado I, Onecha E, Martínez-Cuadrón D, Carreño-Tarragona G, Bergua JM, Vives S, Algarra JL, Tormo M, Martínez P, Serrano J, Herrera P, Ramos F, Salamero O, Lavilla E, Gil C, López Lorenzo JL, Vidriales MB, Labrador J, Falantes JF, Sayas MJ, Paiva B, Barragán E, Prosper F, Sanz MÁ, Martínez-López J, Montesinos P, On Behalf Of The Programa Para El Estudio de la Terapeutica En Hemopatias Malignas Pethema Cooperative Study Group. The Mutational Landscape of Acute Myeloid Leukaemia Predicts Responses and Outcomes in Elderly Patients from the PETHEMA-FLUGAZA Phase 3 Clinical Trial. *Cancers (Basel).* 2021 May 18;13(10):2458.

Chen X, Zhu H, Qiao C, Zhao S, Liu L, Wang Y, Jin H, Qian S, Wu Y. Next-generation sequencing reveals gene mutations landscape and clonal evolution in patients with acute myeloid leukemia. *Hematology.* 2021 Dec;26(1):111-122.

Docking TR, Parker JDK, Jädersten M, Duns G, Chang L, Jiang J, Pilsworth JA, Swanson LA, Chan SK, Chiu R, Nip KM, Mar S, Mo A, Wang X, Martinez-Høyser S, Stubbins RJ, Mungall KL, Mungall AJ, Moore RA, Jones SJM, Birol İ, Marra MA,

Hogge D, Karsan A. A clinical transcriptome approach to patient stratification and therapy selection in acute myeloid leukemia. *Nat Commun.* 2021 Apr 30;12(1):2474.

Haley L, Parimi V, Jiang L, Pallavajjala A, Hardy M, Yonescu R, Morsberger L, Stinnett V, Long P, Zou YS, Gocke CD. Diagnostic Utility of Gene Fusion Panel to Detect Gene Fusions in Fresh and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Cancer Specimens. *J Mol Diagn.* 2021 Oct;23(10):1343-1358.

Navrkalova V, Plevova K, Hynst J, Pal K, Mareckova A, Reigl T, Jelinkova H, Vrzalova Z, Stranska K, Pavlova S, Panovska A, Janikova A, Doubek M, Kotaskova J, Pospisilova S. LYmphoid NeXt-Generation Sequencing (LYNX) Panel: A Comprehensive Capture- Based Sequencing Tool for the Analysis of Prognostic and Predictive Markers in Lymphoid Malignancies. *J Mol Diagn.* 2021 Aug;23(8):959-974.

Rosenthal SH, Gerasimova A, Ma C, Li HR, Grupe A, Chong H, Acab A, Smolgovsky A, Owen R, Elzinga C, Chen R, Suganth D, Freitas T, Graham J, Champion K, Bhattacharya A, Racke F, Lacbawan F. Analytical validation and performance characteristics of a 48-gene next-generation sequencing panel for detecting potentially actionable genomic alterations in myeloid neoplasms. *PLoS One.* 2021 Apr 28;16(4):e0243683.

Papuc SM, Erbescu A, Cisleanu D, Ozunu D, Enache C, Dumitru I, Lupoia Andrus E, Gaman M, Popov VM, Dobre M, Stanca O, Angelescu S, Berbec N, Colita A, Vladareanu AM, Bumbea H, Arghir A. Delineation of Molecular Lesions in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis: Integrated Next Generation Sequencing and Cytogenomic Studies. *Genes (Basel).* 2021 May 30;12(6):846.

## 2. Estudios excluidos de la búsqueda de estudios de costes

| Referencia                  | Razón para exclusión |
|-----------------------------|----------------------|
| Tan <i>et al.</i> , 2020    | No estudio de EE.    |
| Gupta <i>et al.</i> , 2021  | No estudio de EE.    |
| Hughes <i>et al.</i> , 2021 | No estudio de EE.    |

### Referencias

Tan DS, Tan DS, Tan IBH, Yan B, Choo SP, Chng WJ, *et al.* Recommendations to improve the clinical adoption of NGS-based cancer diagnostics in Singapore. *Asia Pac J Clin Oncol* 2020 Aug;16(4):222-31.

Gupta DG, Varma N, Kumar A, Naseem S, Sachdeva MUS, Binota J, *et al.* PHIRACE: PGIMER in-house rapid & cost effective classifier for the detection of BCR-

ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia in Indian patients. *Leuk Lymphoma*. 2022 Mar;63(3):633-643.

Hughes CFM, Gallipoli P, Agarwal R. Design, implementation and clinical utility of next generation sequencing in myeloid malignancies: acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Pathology* 2021 Apr;53(3):328-38.

## Anexo IV. Tablas de estudios individuales incluidos

| Estudios que combinan NGS de ADN total y Transcriptoma (ARNm total) o panel dirigido de ARN |   |
|---|---|
| Características   | Mareshal S <i>et al.</i> , 2021   |
| Enfermedad  | LMA   |
| Tipo de NGS   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- LC-WGS</li> <li>- WTS</li> </ul>   |
| Plataforma  | HiSeq 2500  |
| Detección de tipo de alteración   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- CNV</li> <li>- <i>Indels</i> SNP</li> <li>- Genes de fusión</li> </ul>   |
| Características del proceso   | <p>Para WTS: ARN total secuenciado, 69.3 millones de lecturas de 126 pb por paciente.</p> <p>Genes de fusión identificados por FusionCatcher</p> <p>KMT2A-PTD validados por RT-PCR.</p> <p>sWGS: ADN genómico secuenciado sin captura (11.5 millones de lecturas <i>single-end</i> de 51 pb por paciente) (0,23).</p>                           |
| Técnicas de comparación   | FISH para resultados discordantes entre sWGS y CCA.<br>RT-PCR para genes de fusión.   |
| Tamaño muestral   | 281 pacientes   |
|   | Mack <i>et al.</i> , 2019   |
| Enfermedad  | LMA   |
| Tipo de NGS   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- LC-WGS</li> <li>- TSMP (Illumina)</li> <li>- QIASeq™ Myeloid Neoplasms panel (Qiagen)</li> </ul>   |
| Plataforma  | MiSeq   |
| Detección de tipo de alteración   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- CNV</li> <li>- <i>Indels</i></li> <li>- SNP</li> <li>- Genes de fusión</li> </ul>  |
| Características del proceso   | <p>Estrategia que integra LC-WGS y dos paneles.</p> <p>Se utilizan diferentes <i>pipelines</i> informáticos (incluido ITD-SEEK) y nuevo algoritmo para duplicaciones parciales en tándem de KMT2A en Python.</p> <p>Análisis de CNV por un algoritmo propio CAI (N) (Chromosomal aberration identifier (Numerical)) implementado en Python.</p> |
| Técnicas de comparación   | Citogenética clásica y FISH.  |
| Tamaño muestral   | 33 pacientes (primero en líneas celulares y luego en ocho nuevos pacientes)   |

.../...

.../...

| Estudios que combinan NGS de ADN total y Transcriptoma (ARNm total) o panel dirigido de ARN |   |
|---|---|
| Características   | Mareshal S <i>et al.</i> , 2021   |
| <b>Resultados</b>   | <p>Grado de acuerdo fue alto entre CCA y NGK (96 %); Concordancia entre CCA y WTS del 99 %.</p> <p>De 281 pacientes, 17 cambian de riesgo al reemplazar la CCA por NGK: seis de riesgo intermedio a mayor riesgo; uno de riesgo intermedio a riesgo favorable; siete de riesgo adverso a intermedio y uno de riesgo adverso a favorable.</p> <p>No se identificaron diferencias en habilidad de CCA y NGK en identificar grupos con distinto pronóstico utilizando los criterios de ELN.</p> <p><b>Coste en tiempo:</b> en Estocolmo, 14 días para NGK (comparable a CCA).</p> <p><b>Coste económico:</b> comparable o menor para NGK frente CCA convencional y FISH para translocaciones/inversiones, o menor si no se incluye FISH.</p> |
|   | Mack <i>et al.</i> , 2019   |
|   | <p><b>Concordancia:</b><br/>De 33 pacientes, nueve cariotipos normales, clasificados de forma correcta.</p> <p>30 de las 31 CNVs (97 %) reportadas de forma correcta frente citogenética clásica y FISH.</p> <p>Análisis cegado de ocho pacientes adicionales reprodujo de forma precisa los resultados.</p> <p><b>Costes de servicio</b> por muestra comparables con costes totales de la citogenética convencional, FISH y el análisis mutacional.</p>  |

| Estudios que combinan secuenciación dirigida de ARN y ADN en el mismo panel de NGS |  |   |
|--|--|---|
| Características  | Hiemenz et al., 2018   | Izevbye et al., 2016  |
| <b>Enfermedad</b>  | Diferentes cánceres pediátricos (incluyen leucemias agudas)  | Neoplasias mieloides (agudas y crónicas), incluyendo LMA y algunos LLA  |
| <b>Tipo de NGS</b>   | NGS de ADN y ARN en un único panel (Oncokids)  | NGS de ADN y ARN en un único panel (OMIR).  |
| <b>Plataforma</b>  | Ion S5 y S5XL (Thermo Fisher Scientific)   | Ion S5 (Thermo Fisher Scientific).  |
| <b>Detección de tipo de alteración</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- SNVs</li> <li>- <i>Indels</i></li> <li>- Amplificación de genes</li> <li>- Fusiones de genes</li> </ul> | SNV, pequeños <i>indels</i> y genes de fusión. 526 amplicones de ADN y 700 de ARN.<br>Tamaño medio del amplicón de ADN de 279 pb, de ARN 143 pb.  |
| <b>Características del proceso</b>   | Análisis realizados de forma cegada. Lecturas de 200 pb.   | 40 genes y 29 genes de fusión descritos en neoplasias mieloides. Plataforma Ion S5 con buen rendimiento para la profundidad de lectura, <i>on-target reads</i> y uniformidad. Precisión y reproducibilidad fueron del 100 %.<br>Límite de detección de 5 % para ADN y reducción de 2-log del valor inicial de ARN para los genes de fusión. |
| <b>Técnicas de comparación</b>   | Genes de fusión: RT-PCR y secuenciación Sanger   | Otros paneles de NGS, técnicas convencionales para genes con alto contenido en GC (CALR, FLT3, KIT y CEBPA).<br>FISH y cariotipo para genes de fusión.  |
| <b>Tamaño muestral</b>   | Para ADN (todo tipo de muestras): 82<br>Para ARN (solo neoplasias hematológicas): 51 muestras  | 77 muestras de ADN (42 % LMA)<br>(49 con mutaciones y 28 sin).<br>71 muestras de ARN (44 % LMA) (45 con genes de fusión y 26 sin).  |

...

.../...

| Estudios que combinan secuenciación dirigida de ARN y ADN en el mismo panel de NGS |  |   |
|--|--|---|
| Características  | Hiemenz et al., 2018   | Izevbaye et al., 2016   |
| <b>Resultados</b>  | <p><b>1. Validación analítica (con AcroMetrix):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SNVs, de 293, identificados 290 (S 99 %; IC95 % de 97 a 99,8 %; E &gt;99,9 %; (IC95 % de &gt;99,9 a 100 %), VPP de 97,3 % (IC95 % de 94,8 a 98,6 %).</li> <li>- <i>Indels</i>: Con variant caller LAB (<i>in house variant caller</i>): 22 <i>indels</i> (S 100 %; IC95 % de 84,6 a 100 %), con dos FP (E &gt;99,9 %; IC95 % &gt;99,9 a 100 %) y VPP de 91,7 % (IC95 % de 73 a 99 %). Con Ion Reporter, cinco FN (S 77,3 %; IC95 % de 54,6 a 92,2 %) y un FP (E &gt;99,9 %; IC95 % de &gt;99,9 a 100 %)</li> </ul> <p><b>2. Validación casos previamente confirmados mediante métodos ortogonales</b></p> <p>(FISH, <i>microarray</i> de cromosomas (CMA), secuenciación Sanger o paneles de NGS): de 82 muestras, por secuenciación Sanger 18 muestras y 64 por NGS (99 SNVs, tres MNVs y 49 <i>Indels</i>):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SNVs: 98 de 99 (S 99 %; IC95 % de 94,5 a 99,9 %)</li> <li>- <i>Indels</i>: 44 de 49 (S 89,8 %; IC95 % de 77,8 a 96,7 %).</li> </ul> <p>Tres de los tres MNVs fueron detectados.</p> <p><b>3. Genes de fusión:</b> separado para neoplasias hematológicas (mejor calidad del ARN): 47 de 51 muestras concordantes (92,2 %; IC95 % de 81,1 a 97,8 %). Los cuatro discordantes son fusiones de ETV6-RUNX1 detectadas por FISH (Oncokids cubre solo el principal <i>breakpoint</i> de ETV6-RUNX1, 90 % de los casos de la fusión de estos dos genes), confirmados por RT-PCR y secuenciación Sanger.</p> | <p>Concordancia:<br/>91,3 % para ADN; 100 % para ARN.<br/>Para ADN: S y E de 96,7 % y 100 %.<br/>Para ARN: S y E de 99,8 % y 100 %.</p> |

| Estudios que combinan NGS del exoma (ADN) y del Transcriptoma (ARN) |   |
|---|---|
| <b>Características</b>  | Hansen <i>et al.</i> , 2016   |
| <b>Enfermedad</b>   | LMA citogenéticamente normal.   |
| <b>Tipo de NGS</b>  | Whole ARN<br>Secuenciación del exoma (ADN)  |
| <b>Plataforma</b>   | HiSeq (Illumina)  |
| <b>Detección de tipo de alteración</b>                              | SNV<br>Indels   |
| <b>Características del proceso</b>                                  | Estrategia para reducir el número de variantes a seleccionar, al comparar los resultados de diagnóstico-remisión y ARN vs. exoma.<br>Las muestras se prepararon con TruSeq Stranded mRNA Library Prep y el kit Nextera Rapid Capture Exome Sequencing (37 Mb, Illumina), por el proveedor del servicio de secuenciación (AROS Applied Biotechnology, Eurofins GenomicsGroup, Aarhus, DK). |
| <b>Técnicas de comparación</b>                                      | Todas las muestras testadas para mutaciones conductoras comunes con análisis de fragmentos de ADN por electroforesis capilar de laboratorio de rutina.  |
| <b>Tamaño muestral</b>  | Cinco pacientes (muestras de diagnóstico y de remisión, comparando exoma y ARN, por lo tanto son 20 muestras).  |
| <b>Resultados</b>   | Correlación entre biomarcadores de rutina en 29 de 30, excepción de una repetición interna en tándem de FLT3.<br>De forma adicional, el test reveló mutaciones en DNMT3A, IDH2, TET2 and IL32 (mutación de desplazamiento de pauta de lectura), no abarcados por paneles de rutina.   |

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) |  |  |                                 |                              |   |                       |  |   |
|---|--|--|---------------------------------|------------------------------|---|-----------------------|--|---|
| Características   | He R <i>et al.</i> , 2020  | Alonso <i>et al.</i> , 2019  | Alimohamed <i>et al.</i> , 2018 | Aoe M <i>et al.</i> , 2018   | Ng <i>et al.</i> , 2018                               | Bernard <i>et al.</i> | Carbonell <i>et al.</i> , 2021   | Au <i>et al.</i> , 2016   |
| <b>Enfermedad</b>   | LMA  | LMA<br>Secuenciación multiplex   | Leucemia aguda                  | LLA tipo Ph+<br>Pediátrica   | LMA (muestras de banco)                               | LLA tipo B y T        | LMA del tipo NPM1mut/<br>FLT3- ITDneg.   | LMA (46 pacientes) y otras neoplasias mieloides (cuatro pacientes). |
| <b>Tipo de NGS</b>  | OrcoHeme sequencing panel. 35 genes mutados en neoplasias mieloides (se centran en FLT3- ITD). | Panel Ion Ampliseq AML Community panel (Thermo Fisher Scientific). Panel de 19 genes | NGS por TLA                     | Panel customizado Haloplex.  | Panel customizado laboratorio CEBNIX. TSMP (Illumina) | Digital MLPA NGS.     | Dos paneles comerciales: LMA-GeneSGKit (Sistemas Genómicos) y MYS (SOPHIA Genetics). | TSMP (Illumina).  |
| <b>Plataforma</b>   | MiSeq o HiSeq (Illumina)   | Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific)   | NextSeq 500 (Illumina)          | MiSeq (Illumina)             | MiSeq (Illumina) para ambos paneles.                  | MiSeq (Illumina)      | NR   | MiSeq (Illumina).   |
| <b>Detección del tipo de alteración</b>   | FLT3-ITD y el ratio alélico.   | SNVs e indels  | Translocaciones recurrentes     | - SNVs<br>- Indels<br>- CNVs | - SNV<br>- Indels                                     | - CNAs                | - SNVs<br>- Indels   | - SNVs<br>- FLT3-ITD de forma específica                            |

.../...



.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) |  |                             |  |   |                            |                      |                                |                         |
|---|--|-----------------------------|--|---|----------------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Características   | He R <i>et al.</i> , 2020  | Alonso <i>et al.</i> , 2019 | Alimohamed <i>et al.</i> , 2018  | Aoe M <i>et al.</i> , 2018                    | Ng <i>et al.</i> , 2018    | Benard <i>et al.</i> | Carbonell <i>et al.</i> , 2021 | Au <i>et al.</i> , 2016 |
| <b>Tamaño muestral</b>  | 7.902 casos testados por NGS. 335 con FLT3-ITD. De 7.902, solo 402 tienen datos de análisis de fragmentos. | 162 pacientes.              | 36 pacientes con Leucemia aguda (17 con LLA y 16 con LMA).<br>Utilizan también líneas celulares para determinar límite de detección<br>Training set: 17 pacientes y líneas REH y FKH-1, y diluciones seriadas de líneas KOPN-8 y HAL-01. Se establecen puntos de corte para análisis e interpretación de datos y porcentaje mínimo de células aberrantes en muestra. Set test: 19 pacientes. Se repiten las diluciones para confirmar el % mínimo de células aberrantes. | Cinco pacientes pediátricos con LLA tipo Ph+. | 137 muestras de pacientes. | 544 muestras.        | 27 pacientes.                  | 50 pacientes.           |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) |   |  |  |   |   |  |  |   |
|---|---|--|--|---|---|--|--|---|
| Características   | He R et al., 2020   | Alonso et al., 2019  | Alimohamed et al., 2018  | Aoe M et al., 2018  | Ng et al., 2018   | Benard et al.  | Carbonell et al., 2021   | Au et al., 2016   |
| <b>Resultados</b>   | De 402 pacientes con análisis de fragmentos (y NGS), 136 con FLT3-ITD + y 266 -, (concordancia 100 %). En los 136 con resultado + con ambos test, 128 (94 %) alta concordancia para el ratio o alto/bajo. La NGS detectó otras siete mutaciones en regiones no cubiertas por análisis de fragmentos, beneficiosas para terapia con inhibidor de FLT3. | 45,70 % pacientes con marcador molecular analizado por CMBI vs. 88,89 % con al menos un marcador molecular útil con NGS. De acuerdo a la clasificación de 2016 de la OMS, 68 % de los pacientes pertenecen a la categoría de LMA con anomalías recurrentes. 18,5 % de éstos, con aberraciones citogenéticas y cambios moleculares. 20 % clasificados como LMA con cambios relacionados con mielodisplasia y 12 % como LMA <i>not otherwise specified</i> . | Límite de detección: 10 % células aberrantes (25 % para de MYC-t(8;13)(q24;q21.1). <i>Training set</i> , concordancia de 81 %.<br>Test set: concordancia de 100 % (E del 100 %, sin FP).<br>Se plantea el uso de la NGS por TLA multiplex como cribado de translocaciones en leucemia aguda. | SNVs e <i>indel</i> s: Un paciente con una mutación al diagnóstico y la misma en relapso con otra nueva mutación. El segundo paciente, un <i>indel</i> en diagnóstico. El tercer paciente, una mutación puntual y un <i>indel</i> en recaída. Todas validadas por Sanger.<br>Teniendo en cuenta MLPA como referencia para CNV: FP 2, FN 3. S = 91,7 % E = 0 % (hapoplex no detecta los negativos de MLPA como negativos). | CEBNX detecta 32 variantes: tres inserciones (9,4 %), 13 deleciones (40,6 %), 10 duplicados (31,3 %) y seis sustituciones (18,8 %) S 97 % (IC95 % de 82 a 100 %) E 97 % (IC95 % de 92 a 99 %) | S de 99 %; E de 98 %<br>Si se toman las otras técnicas como gold estándar. De 544, 5 FN y 11 FP. | La presencia de la variante FLT3D835 (identificada por NGS) se asociaba con una mayor probabilidad de recaída. | Concordancia de 95,5 %.<br>Tras la aplicación de nuevos algoritmos bioinformático ITDseek (que ayuda a identificar ITD-FLT3), la concordancia aumenta a 98,2 %. |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) |                           |   |                                 |                            |                         |                      |                                |                         |
|---|---------------------------|---|---------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Características   | He R <i>et al.</i> , 2020 | Alonso <i>et al.</i> , 2019   | Alimohamed <i>et al.</i> , 2018 | Aoe M <i>et al.</i> , 2018 | Ng <i>et al.</i> , 2018 | Benard <i>et al.</i> | Carbonell <i>et al.</i> , 2021 | Au <i>et al.</i> , 2016 |
|   |                           | <p>Se analiza la capacidad del panel para estratificar el riesgo del paciente de acuerdo a las escalas pronosticas de la ELN de 2017 y de Papaemmanuil <i>et al.</i></p> <p>El 46 % (n=74), 28 % (n=45) y 26 % (n=43) de los pacientes pertenecen a los grupos favorable, intermedio y no favorable de la escala de la ELN. Asimismo, el 96,29 % de los pacientes pudo ser clasificado en alguna categoría de la clasificación de Papaemmanuil.</p> |                                 |                            |                         |                      |                                |                         |

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) (continuación) |   |   |   |   |  |  |
|--|---|---|---|---|--|--|
| Características  | Chicano M et al., 2021  | Carbonell et al., 2019  | Shen W et al., 2018   | Vosberg et al., 2016  | Montaña A et al., 2020   | Kim B et al., 2019   |
| <b>Enfermedad</b>  | Neoplasias mieloides  | Neoplasias mieloides  | Neoplasias mieloides (incluyen pacientes con LMA)   | 22 pacientes con LMA con delección del brazo largo del cromosoma 9 (del(9q)) frente a grupo de 21 pacientes con LMA sin del(9q).<br>5 pacientes con del(9q) analizados con WES, GPS y array de SNP. | LLA-B  | Neoplasias mieloides   |
| <b>Tipo de NGS</b>   | Panel de enriquecimiento por captura de MyeloidNeoplasm- GeneSGKit (Sistemas Genómicos) | Dos paneles de captura: LMA-GeneSGKit (Sistemas Genómicos) (ndels y SNV) y MyeloidNeoplasm- GeneSGKit (ndels, SNV, translocaciones, CNVs y alteraciones numéricas grandes). | Secuenciación principal de SNP de todo el genoma (detección de CNV y CN-LOH de todo el genoma usando NGS) | - Secuenciación del exoma<br>- Secuenciación dirigida de amplicones (panel de genes custom Haloplex), 140 genes relacionados con LMA y mutaciones puntuales (secuencia diana total de 492 kb).      | Panel customizado (SureDesign Studio): 57,680 sondas para 1522 regiones (exones específicos de 150 genes asociados a LLA-B; 165 SNPs sobre farmacogenética de LLA... Cobertura de ~500 kb. | Panel customizado  |
| <b>Plataforma</b>  | MiSeq (Illumina)  | MiSeq (Illumina) para el <i>paired-end sequencing</i> .   | NextSeq (Illumina)  | Para panel customizado: MiSeq (Illumina)<br>Para el exoma: Illumina Genome Analyzer Ix (GA Iix, n58 AMIL samples) o HiSeq 2500 (Illumina).  | NextSeq o MiSeq (Illumina)   | NextSeq 550 instrument (Illumina)  |
| <b>Detección del tipo de alteración</b>  | - Variantes e <i>indels</i><br>- CNVs<br>- Translocaciones                              | - SNV e <i>indels</i><br>- CNVs<br>- Translocaciones<br>- Alteraciones numéricas grandes  | CNVs y CN-LOH (alteraciones estructurales).<br>Mutaciones genéticas diana.                                | CNAs  | - SNVs<br>- <i>Indels</i><br>- Genes fusión recurrentes<br>- CNVs<br>- Aneuploidías, SNPs  | - SNV<br>- FLI3 ITD<br>- CNV génicos<br>- CNVs<br>- Mutaciones cromosómicas somáticas y germinales |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) (continuación) |   |   |   |  |   |  |
|--|---|---|---|--|---|--|
| Características del proceso  | Chicano M <i>et al.</i> , 2021  | Carbonell <i>et al.</i> , 2019  | Shen W <i>et al.</i> , 2018   | Vosberg <i>et al.</i> , 2016   | Montaña A <i>et al.</i> , 2020  | Kim B <i>et al.</i> , 2019   |
|  | <p>Paired-end sequencing (2-101 pb).<br/>Incluye 35 genes, para el análisis de variantes e <i>indels</i>, 18 genes para CNVs y 14 para análisis de reordenaciones.<br/>El tamaño del objetivo es de 3 Mb.</p> | <p>Paired-end sequencing (2-101 pb).<br/>Dos paneles con algunos genes en común, pero no otros, y el segundo detecta CNVs, translocaciones.</p>   | <p>High-output flow cell con un kit 300 cycle paired end sequencing (illumina).<br/>Capaz de detectar CNVs presentes en un 20 %.<br/>Tamaño más pequeño de CNV identificado ganancia de 500 kb.</p> | <p>Para el panel customizado: secuenciación <i>paired-end</i> con longitud de lectura de 250 pb.<br/>Para la secuenciación del exoma: captura de ADN fragmentado y <i>paired-end sequencing</i>, resultando en 2 x 80 bp <i>paired-end sequence reads</i> o 2x101, dependiendo de la plataforma.<br/>Cobertura media: 323 pb (rango 28-383) o 1043 pb (rango 89-1273).</p> | <p>Paired-end sequencing (151-bp reads).<br/>Incluye total de 215 genes. Se incluyen todos los exones codificantes, también regiones intrónicas relacionadas con variantes patogénicas reportadas.</p>  | <p>Lecturas de 2x151 pb. Secuenciación de DNA.<br/>Incluye total de 215 genes. Se incluyen todos los exones codificantes, también regiones intrónicas relacionadas con variantes patogénicas reportadas.</p> |
| <b>Técnicas de comparación</b>   | <p>Citogenética (121 de 138) y/o MLPA cuando fue posible.<br/>NGS complementaria a técnicas convencionales.</p>   | <p>Validación de resultados:<br/>- SNV: PCR y en secuenciación Sanger.<br/>- Duplicaciones internas en tándem FLT3: amplificación de fragmentos por fluorescencia y electroforesis capilar.<br/>- Origen germinal o somático: pacientes con variantes en genes asociados a neoplasias mieloides hereditarias con VAF &gt; 0.4.<br/>- Alteraciones citogenéticas confirmadas por qPCR, FISH y/o cariotipo.</p> | <p>Microarrays de SNPs<br/>No hay técnica de comparación para mutaciones puntuales</p>  | <p>SNP array <i>profiling</i> (posiciones limitadas a regiones exónicas codificantes)<br/>Citogenética de rutina</p>   | <p>SNVs e <i>indels</i>: otras técnicas de NGS: 454 Junior sequencing (Roche) y targeted TruSeqCustom amplicon (TSCA) panel for ALL).<br/>Aneuploidia: cariotipo e array CGH.<br/>MLLr- FISH y cariotipo<br/>Genes fusión:<br/>Citogenética<br/>Polimorfismos y genes de fusión por Sanger.</p> | <p>Cariotipo convencional y FISH.<br/>Translocaciones recurrentes: RT- PCR.<br/>Duplicación<br/>FLT3- ITD: PCR y análisis de fragmentos.<br/>Secuenciación Sanger.</p>                                       |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) (continuación) |                               |  |   |   |  |  |
|--|-------------------------------|--|---|---|--|--|
| Características  | Chicano <i>M et al., 2021</i> | Carbonell <i>et al., 2019</i>  | Shen <i>W et al., 2018</i>                | Vosberg <i>et al., 2016</i>   | Montaño <i>A et al., 2020</i>  | Kim <i>B et al., 2019</i>                            |
| Tamaño muestral  | 135 pacientes                 | 121 pacientes con neoplasias mieloides (58 pacientes con LMA y 10 pacientes con leucemia que recaen) | 16 pacientes (seis son LMA y nueve sanos) | 90 pacientes emparejados de leucemia y remisión completa para WES (65 citogenética normal).<br>Del total, selección de cinco pacientes con LMA y delección parcial de brazo largo cromosoma 9 y VAF de 6 a 90 %, para caracterización por <i>array</i> de SNP.<br>Del total, 43 pacientes para gene panel sequencing (22 con delección cromosoma 9, incluye los 5 utilizados para WES y SNP <i>array</i> ) y 21 muestras control sin aberraciones en cromosoma 9.<br>Para análisis mutaciones germinales, seleccionan 25 pacientes con aberraciones cromosómicas bien definidas emparejadas con muestras controles germinales para WES y detección de CNAs. | 75 pacientes con LLA-B (no dicen cuantos adultos/niños).<br>10 pacientes + a BCR-ABL1; 10 a ETV6-RUNX1; 10 con hiperdiploidia (>51 cromosomas); 10 con reordenaciones MLL; tres con clones con hipodiploidia (<40 cromosomas); tres con iAMP21, y 29 sin alteraciones recurrentes u otros pacientes-B. | 129 pacientes con neoplasias mieloides (95 con LMA). |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) (continuación) |   |  |   |   |  |   |
|--|---|--|---|---|--|---|
| Características  | Chicano M <i>et al.</i> , 2021  | Carbonell <i>et al.</i> , 2019   | Shen W <i>et al.</i> , 2018   | Vosberg <i>et al.</i> , 2016  | Montaña A <i>et al.</i> , 2020   | Kim B <i>et al.</i> , 2019  |
| <b>Resultados</b>  | 121/135 con estudio citogenético completo: 64 alteraciones frecuentes (10 solo por citogenética y siete por NGS), 17 sin cariotipo: dos alteraciones frecuentes por NGS, una también por FISH. 66 alteraciones detectadas por citogenética y/o NGS: 48 por ambas técnicas; 10 solo por citogenética y ocho solo por NGS. Además de alteraciones frecuentes, se observaron 38 CNV (en 29 pacientes) (16 ganancias y 22 pérdidas), en algunos genes incluidos. Todos menos siete fueron confirmados por MLPA o citogenética. Impacto de NGS frente al cariotipo: detectaron 19 alteraciones frecuentes en 12 pacientes. En cinco, se presentaban en el contexto de cariotipo alterado, sin influir en el pronóstico. Los otros seis en el contexto de cariotipo normal (3) o sin cariotipo (3). De esos seis, cuatro cambiaban de intermedio a no favorable, y uno de intermedio a favorable. | 278 variantes patogénicas detectadas en 84 % pacientes. La NGS identificó el 82 % de las alteraciones estructurales caracterizadas por citogenética (25 de las 31 CNV y tres de las tres traslocaciones). La detección de variantes con NGS cambia el diagnóstico de siete pacientes y el pronóstico de 15, de riesgo intermedio a desfavorable y 44 pacientes calificados para su inclusión en ECA (22 eran LMA con detección de variantes en FLT3-TKD, IDH1, IDH2 y genes del espliceosoma). También analizan clonalidad y mutaciones germinales (tres variantes confirmadas como germinales). | <b>Concordancia:</b> Detectadas 52 CNVs somáticas, 11 CN-LOH y 39 mutaciones oncogénicas en 16 pacientes, y ninguna alteración en nueve individuos sanos. Todas las CNVs y CN- LOH confirmados por <i>microarrays</i> de SNP. <b>Costes:</b> Coste directo 850 \$ (menor que coste directo de <i>microarray</i> de SNP (650 \$) y panel de NGS dirigido (650 \$). | Resultados equivalentes en detección de CNA mediante las tres técnicas en cinco pacientes con tamaño clonal variable. <b>Identificación de CNA:</b> Por panel de genes sin control germinal emparejado: confirmaron resultados citogenéticos en 18/22 casos. En casos discordantes, tamaño clonal <33 % era limitante. Detección de CNA consistente con resultados citogenéticos en 83 % de las muestras; mientras que en seis de los 65 pacientes con LMA citogenéticamente normal, se identifica CNA no detectados por citogenética de rutina. Confirman trisomías, monosomías y delección parcial en 20 de las 25 muestras secuenciadas por WES. | 868 variantes totales (SNV/indels), 14 aneuploidías y 46 CNVs, en alguno de los genes estudiados. 35 pacientes con algún gen de fusión recurrente incluido en el panel. En los controles, ni SNVs/indels ni CNVs. Panel altamente reproducible (secuenciación de tres muestras duplicadas). S y E del 96.3 % y 90 % para SNV e indels (comparación con otras técnicas NGS), 89,7 % y 100 % para genes de fusión (vs FISH); 93,3 % y 100 % para aneuploidías (vs. Cariotipo) y 95,5 % y 100 % para CNVs (vs. MLPA) positivos. | 280 variantes en 65 genes. Para 34 pacientes con LMA y 16 MPN, secuenciación completa por NGS y sanger de 11 genes mutados con frecuencia. Concordancia perfecta. Entre 8,4-11,6 % pacientes con LMA y mutaciones germinales (no responden a quimio). Por PCR y análisis de fragmentos, 17 casos con mutación FLT3 con mutación FLT3 ITD. Con algoritmo GATK (optimizado para detectar SNVs), solo detecta ocho (47 %). Con algoritmo Pindel, todos. Detección o duplicación de exones o genes completos detectado en 19 pacientes, confirmados los CNVs por MLPA cuando fue posible. |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ADN (genoma completo, exoma completo o panel dirigido) (continuación) |                                |                                |                             |                              |                                |   |
|--|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|
| Características  | Chicano M <i>et al.</i> , 2021 | Carbonell <i>et al.</i> , 2019 | Shen W <i>et al.</i> , 2018 | Vosberg <i>et al.</i> , 2016 | Montaño A <i>et al.</i> , 2020 | Kim B <i>et al.</i> , 2019  |
|  |                                |                                |                             |                              |                                | <p>Tras excluir 25 casos con información citogenética incompleta, tasa de concordancia de 87,5 % (91/104). Con mayor resolución que cariotipo convencional, el análisis de NGS pudo detectar pequeñas deleciones intersticiales. Para detectar translocación, dos algoritmos: Break-Dancer y Delly. RT-PCR identifica 26 traslocaciones recurrentes: el primer algoritmo detecta tres (11,5 %), el segundo 17 (65,4 %). En 95 pacientes con LMA, confirmamos mutaciones germinales en ocho pacientes.</p> |

| Estudios sobre el uso de la NGS de ARN (paneles dirigidos o RNASeq) |  |  |  |   |   |  |
|---|--|--|--|---|---|--|
| Características   | Podgornik et al., 2021   | Haley et al., 2021   | Soverini et al., 2021  | de Lange et al., 2020   | Kim et al., 2019  | Kim et al., 2020                                       |
| <b>Enfermedad</b>   | LLA-B Ph-like, sin fusiones mutuamente excluyentes y sin CRLF2 por FISH.   | Diferentes tumores, pero dan datos para leucemias/linfomas.    | ALL Ph+  | Neoplasias hematológicas  | Leucemia aguda.   | Leucemia aguda (LMA o LLA)                             |
| <b>Tipo de NGS</b>  | Panel FusionPlex ALL   | Panel customizado creado con tecnología NanoString             | Seis amplicones de 400-pb por nested RT-PCR                                | Secuenciación del transcriptoma por el panel TruSight RNA Pan-Cancer (Illumina) (secuenciación del ARN de 1385 genes)                               | Dos paneles comerciales para NGS de ARN (TruSight RNA fusion panel (Illumina) y FusionPlex Pan-Heme panel (ArcherDx)), para la detección de genes de fusión recurrentes en oncohematología. | Panel de NGS de ARN (ArcherDx)                         |
| <b>Plataforma</b>   | MiniSeq sequencer (Illumina)   |  | Hasta abril de 2017 por GS Junior Instrument; desde mayo de 2017, MiSeq.   | NextSeq 550 or MiSeq (Illumina)   | MiniSeq (Illumina)  | NextSeq 550 (Illumina)                                 |
| <b>Detección de tipo de alteración</b>                              | Genes de fusión, mutaciones puntuales y nivel de expresión de 81 genes asociados a LLA   | Genes de fusión  | Mutaciones dominio quinasa de BCR-ABL1.                                    | - Detección variantes (SNV/indel)<br>- Genes de fusión<br>- Sobreexpresión  | Genes de fusión recurrentes en oncohematología.   | Genes de fusión.                                       |
| <b>Características del proceso</b>                                  | Se evalúa un algoritmo para ver en qué pacientes utilizar NGS para determinar genes de fusión no detectados por técnicas convencionales. | Tecnología NanoString fusión, método de hibridación multiplex. | Límite de detección de NGS: 3 %.   | Panel virtual mioelode (54 genes) o linfode (72 genes).<br>Los datos de expresión se generaron utilizando <i>pipeline</i> de RNA-seq.               |   | Tres millones de lecturas por muestra (2 x 151 cycles) |
| <b>Técnicas de comparación</b>                                      | Incluyen cuatro de los seis pacientes con reordenación del CRLF2 para validar los resultados   | FISH/RT-PCR, NGS   | Secuenciación Sanger. Límite de detección de secuenciación Sanger de 20 %. | Variantes validadas por Sanger, MLPA o ddPCR en ADN o ARN (según VAF mayor o menor al 10 %).<br>Genes de fusión con PCR y si fue posible, con FISH. | FISH, RT-PCR, secuenciación Sanger.   | FISH y RT-PCR.   |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ARN (paneles dirigidos o RNASeq) |  |  |   |   |  |   |
|---|--|--|---|---|--|---|
| Características   | Podgornik <i>et al.</i> , 2021   | Haley <i>et al.</i> , 2021   | Soverini <i>et al.</i> , 2021   | de Lange <i>et al.</i> , 2020   | Kim <i>et al.</i> , 2019   | Kim <i>et al.</i> , 2020  |
| <b>Tamaño muestral</b>  | 65 pacientes tipo LLA-B Ph-like  | 40 muestras de leucemias/lin formas primera validación.<br>73 pacientes con leucemia/linf ma validación clínica.   |   | 136 pacientes con neoplasias hematológica s.  | 24 pacientes.  | 134 pacientes.  |
| <b>Resultados</b>   | De esos 65, se evaluó la reordenación del gen CRLF2 mediante FISH en 59 y se realizó secuenciación por NGS en 34 pacientes (incluyendo cuatro de seis pacientes con CRLF2-r para validar la NGS).<br>Presencia de aberraciones de tipo Ph en nueve pacientes, tres identificados mediante NGS; dos con fusiones en vía señalización JAK-STAT y otra en vía ABL. Con FISH se confirmaron las reordenaciones | En la validación clínica, 73 pacientes.<br>Detección de fusiones en 16 pacientes de tipo BCR- ABL1, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA, ETV6-1/4, CHIC2, NUP98-NSD1, y TCF3-PBX1.<br>Estas fusiones eran consistentes con los resultados de técnicas convencionales. En 57 muestras donde no detectó fusiones, FISH detecta dos: una reordenación en IGH para esa fusión), y otro en RUNX1-MECOM, fusión no incluida tampoco en el panel. | De 44 pacientes analizados en diagnóstico inicial, 0/44 positivos por Sanger y 3/44 positivos por NGS, los tres incluidos en ensayos clínicos de diferentes fármacos (uno mutación V289A (VAF 3.4 %), otro D276G (VAF 4 %) y F359V (VAF 3.5 %) y un tercer paciente con E255K (VAF 3.3 %).<br>Los tres alcanzaron CHR y respuesta molecular (hasta 29 meses seguimiento). | RANKING clasifica de forma correcta todos los pacientes con LMA y LLA, y mejora la clasificación de tres más.<br>Solo se pierde una variante, y no se identifica sobreexpresión de BCL3 por una t(14; 18)(q32; q21) en solo 2 % de las células. También identifica 6 genes de fusión adicionales y sobreexpresión de CCND1 por t(11; 14)(q13; q32) en dos muestras. | Los dos paneles detectan 19 casos con traslocaciones recurrentes, identificadas por RT-PCR, así como un caso de KMT2A-AFF1 como FN en RT-PCR. Entre los cuatro casos negativos por RT-PCR, la NGS identificó dos translocaciones raras. Las sondas FISH utilizadas no incluían éstas traslocaciones. | 53 genes de fusión identificados en 52 pacientes de 134. Además de fusiones de los criterios de la OMS, identifican 11 fusiones nuevas o raras (dos asociadas a LLA tipo Ph-like, dos genes de fusión nuevos, tres genes de fusión con nuevos partners y seis genes de fusiones raros). |

| Estudios sobre el uso de la NGS de ARN (paneles dirigidos o RNASeq) (continuación) |                                |                             |   |   |                                  |  |  |
|--|--------------------------------|-----------------------------|---|---|----------------------------------|--|--|
| Características  | Kim <i>et al.</i> , 2020       | Grióni <i>et al.</i> , 2019 | Akhter A <i>et al.</i> , 2016                   | Szankasi <i>et al.</i> , 2016   | Engvall <i>et al.</i> , 2020     | Soverini <i>et al.</i> , 2016  | Yeung <i>et al.</i> , 2021                                   |
| Enfermedad   | Leucemia aguda (LMA o LLA)     | LLA-B.                      | LLA y LMA                                       | Leucemias Ph+.  | LMA y LLA                        | LMC (45 ac) y LLA (15) Ph+.<br>Dos grupos:<br>1: fracaso segunda línea.<br>2: no fracasan. | LLA-B (solo dos de momento diagnóstico, de 14 no se conoce). |
| Tipo de NGS  | FusionPlex Pan-Heme (ArcherDX) | RNA CaptureSeq.             | nCounter® Leukemia Fusion Gene Expression Assay | NGS de ARN del gen de fusión BCR-ABL1.  | FusionPlex Heme panel (ArcherDX) | Ultrasecuenciación de BCR-ABL1   | Panel FusionPlex ALL (ArcherDX) para ARN                     |
| Plataforma   | NextSeq 550 (Illumina)         | MiSeq (Illumina)            | NanoString platform                             | Ion PGM (Thermo Fisher Scientific)  | MiSeq (Illumina)                 | NR   | MiSeq (Illumina)   |
| Detección de tipo de alteración  | Genes de fusión.               | Genes de fusión.            | Genes de fusión.                                | Mutaciones en BCR-ABL1 que pueden llevar a resistencia a tratamiento o TKI, cubriendo codones 46-542. | Genes de fusión.                 | SNV  | Genes de fusión<br>SNVs<br>Indels                            |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ARN (paneles dirigidos o RNaseq) (continuación) |   |  |                              |  |   |  |
|--|---|--|------------------------------|--|---|--|
| <b>Características del proceso</b>   | <b>Kim et al., 2020</b>                                 | <b>Grióni et al., 2019</b>   | <b>Akhter A et al., 2016</b> | <b>Szankasi et al., 2016</b>   | <b>Engvall et al., 2020</b>   | <b>Soverini et al., 2016</b>   |
|  | Tres millones de lecturas por muestra (2 x 151 cycles). | El protocolo de RNA CaptureSeq permite aislar regiones genómicas específicas con sondas complementarias. Los fragmentos capturados son secuenciados y evaluados por el pipeline bioinformático para identificar genes de fusión <i>pro putative breakpoints</i> en las secuencias genómicas de los genes diana | 800 ng de ARN total.         | Solo describen mutaciones con asociación conocida a resistencia a TKI. Se utilizan ocho microlitros de ARN (entre 30 y 300 ng/ $\mu$ L) para sintetizar ADNc. Este producto primario de PCR tiene un tamaño entre 1.611 y 1.742 pb, dependiendo del <i>breakpoint</i> de fusión. | Utilizaron 27 casos de tumores hematológicos y se analizaron 23 diferentes variantes de transcripción, que fueron validados en una cohorte de 12 casos. | NR. Secuenciación de ARN.  |
| <b>Técnicas de comparación</b>   | FISH y RT-PCR.  | Todas las fusiones confirmadas por RT-PCR, y las nuevas fusiones validadas por FISH.   | Cariotipo y FISH             | Secuenciación Sanger   | Cariotipo y FISH y RT-PCR.  | Secuenciación Sanger.  |
| <b>Tamaño muestral</b>   | 134 pacientes.  | 89 pacientes.  | 94 pacientes.                | 97 pacientes con datos de ambas técnicas.  | 12 pacientes en la cohorte de validación.   | 60 pacientes.  |
|  |   |  |                              |  |   | Resultados de la secuenciación analizados con software Archer Analysis.  |
|  |   |  |                              |  |   | CGAT Cariotipo, FISH, RT-PCR y Sanger. CGAT solo con muestras con 20 % o más de células tumorales para detección de CNA cnLOH. |
|  |   |  |                              |  |   | 28 pacientes.  |

.../...

.../...

| Estudios sobre el uso de la NGS de ARN (paneles dirigidos o RNASeq) (continuación)   |   |  |  |   |   |  |
|--|---|--|--|---|---|--|
| Características  | Kim <i>et al.</i> , 2020  | Grióni <i>et al.</i> , 2019  | Akhter A <i>et al.</i> , 2016  | Szankasi <i>et al.</i> , 2016   | Engvall <i>et al.</i> , 2020  | Soverini <i>et al.</i> , 2016  |
| <p><b>Resultados</b></p> <p>53 genes de fusión identificados en 52 pacientes de 134. Además de fusiones de los criterios de la OMS, identifican 11 fusiones nuevas o raras (dos asociadas a LLA tipo Ph-like, dos genes de fusión nuevos, tres genes de fusión con nuevos <i>partners</i> y seis genes de fusiones raros).</p> | <p>38 de 89 con eventos conocidos (reordenaciones de KMT2A), así como nuevas fusiones (reordenación de JAK2), 16 de las cuales tenían valor pronóstico. Teniendo en cuenta solo 16 pacientes recién diagnosticados, siete (43 %) con un resultado positivo para genes de fusión. Cuatro con genes de fusión recurrentes en LLA-B (t(6;5)/ EBF1-PDGFRB (n = 2), t(9;9)/PAX5-JAK2 (n = 1), y t(12;19)/ZNF384-TCF3 (n = 1) y tres presentaron genes de fusión para t(19;19)/TCF3-OAZ1 (n = 1), t(7;7)/IKZF1-DDC (n = 1), t(2;9)/ZEB2-JAK2 (n = 1), y t(9;17)/MPRIP-JAK2 (n = 1).</p> | <p>Sondas fusiones PML/RARA; RUNX1-RUNX1T1; BCR-ABL1 S y E del 100 %. Para fusión MLL/AF4, alto grado de correlación (S del 85 %; E del 100 %) y TCF3-PBX1 (S de 75 %; E del 100 %). Sondas para CBFβ-MYH11 S moderada (57 %) pero alta E (100 %). ETV6-RUNX1 discordancias.</p> | <p>12 de 75 casos positivos con Sanger (16 %), 15 mutaciones adicionales por NGS (NAF entre 4 y 21 %) nueve casos, una mutación adicional y en tres, dos adicionales. 14 de 15 detectadas por NGS clínicamente sig. Solo una no reportada en pacientes con resistencia a TKI. Uno de 22 casos negativos por SS, mutación por NGS que confiere resistencia TK1.</p> | <p>12 casos correctamente valorados de forma ciega. En casos sin fusión conocida según FISH, identifican una fusión TCF3-ZNF384 por NGS de ARN (aberración críptica de LLA), verificada por RT-PCR. Realizaron replicaciones en seis casos con genes de fusión, secuenciados tres veces a diferentes tiempos. Estos fueron detectados en todas las réplicas (baja variación, salvo ETV6-RUNX1).</p> | <p>En 26 pacientes de grupo 1 (43 %), las mutaciones que llevan a la recaída, detectadas ya a bajo nivel en muestra inicial (mediana 5 %; rango 1,1 %-18,4 %). No identificadas en Grupo 2.</p> | <p>Aunque dan S y E del 100 %, señalan discordancias en ocho de 28 muestras. 1. Fusiones detectadas por NGS y una de las otras técnicas (n = 1). 2. Fusiones detectadas por NGS, incluyendo <i>STIL-TAL1</i> y <i>P2RY8-CRLF2</i> (n = 1, cada uno). 3. Isoformas oncogénicas de <i>IKZF1</i>: de 28 muestras, nueve con isoformas oncogénicas por NGS, siete de estas también detectada por CGAT y dos no. Mientras, cuatro muestras con delección focal genómica en locus <i>IKZF1</i> por CGAT, pero la isoforma oncogénica de <i>IKZF1</i> no detectada por NGS.</p> |

| Estudios sobre validez externa y comparación de paneles de NGS en diagnóstico de leucemias agudas |  |  |  |   |   |
|---|--|--|--|---|---|
| Características   | Haslam K et al., 2016  | Sargas et al., 2020  | Corboy et al., 2021  | Vega-García et al., 2020  | Aguilera et al., 2020   |
| <b>Enfermedad</b>   | LMA  | LMA  | LMA  | LLA-B pediátrica  | Neoplasias mieloides  |
| <b>Objetivo</b>   | Evaluar la concordancia de resultados obtenidos por diferentes laboratorios con el mismo panel y plataforma. | Evaluar si todas las variantes son detectadas por diferentes laboratorios con protocolos estándar.                               | Compara rendimiento de diferentes paneles en diferentes centros con misma plataforma de secuenciación.                                   | Harmonizar la implementación de un panel de NGS para el estudio de la BCP-ALL, pediátrica en diferentes centros nacionales. Describir pros y contras de cada panel.       | Compara diferentes paneles y su capacidad para detectar las mismas alteraciones.  |
| <b>Paneles utilizados</b>   | Ion Amplicon AML Panel (Thermo Fisher Scientific) (pocos genes).   | – Oncomine LMA Research<br>– Custom panel (Ion Torrent)<br>– Myeloid Tumor Solution (Illumina)<br>– Custom PanMyeloid (Illumina) | Cuatro utilizan paneles customizados y cuatro restantes paneles comerciales (dos TSMP, uno MYS y el último el FusionPlex Myeloid panel). | Un panel customizado frente a tres comerciales:<br>– Oncomine Childhood Cancer Research Assay<br>– FusionPlex ALL<br>– Human Comprehensive Cancer Panel GeneRead Panel v2 | – TSMP<br>– SureSeq Core MPN Panel y SureSeq AML Panel (SureSeq)<br>– MYS<br>– Panel customizado PMP  |
| <b>Nº laboratorios</b>  | 3 (Reino Unido e Irlanda)  | 7  | 8 (Australasia)  | 4 centros (España)  | 3 (15 muestras enviadas a SOPHIA Genetics; 16 a Oxford Gene technology (OGT) y todas en Universidad de Navarra y Hospital Universitario de Salamanca) |
| <b>Plataforma</b>   | Ion (PGM); Thermo Fisher Scientific)   | Illumina e Ion Torrent (según el panel).   | Illumina (todos).  | Illumina o Ion Torrent (según el panel)   | Todos los paneles con MiSeq   |
| <b>Detección del tipo de alteración</b>   | SNVs e indels  | SNVs e indels  | SNVs e indels  | Panel customizado: SNVs e CNVs. Resto de paneles: SNVs  | PMP: SNVs, indels y también CNVs en cromosomas 5, 7, 8 y 20. El resto: SNVs e indels.   |

.../...

.../...

| Estudios sobre validez externa y comparación de paneles de NGS en diagnóstico de leucemias agudas |  |   |  |  |   |
|---|--|---|--|--|---|
| Características del proceso   | Haslam K et al., 2016  | Sargas et al., 2020   | Corboy et al., 2021  | Vega-García et al., 2020   | Aguilera et al., 2020   |
|   | Se utilizó una plataforma, paneles y <i>pipelines</i> bioinformáticos comunes. En este caso, las mutaciones de los genes NPM1 y FLT3-ITD se valoran mediante PCR y electroforesis capilar. | Validación cruzada en dos rondas. Validación clínica sin comprobar los resultados con técnicas convencionales.  | Variabilidad significativa en genes incluidos en los paneles (media 39, rango de 9 a 70). Mínimo común de nueve genes (FLT3, NPM1, RUNX1, TP53, CEPBA y ASXL1; también DNMT3A, IDH1 e IDH2). De los ocho, cuatro con <i>pipeline</i> customizado y cuatro restantes <i>pipelines</i> comerciales. La identificación y cálculo del <i>allelic ratio</i> FLT3-ITD, realizaban la mayoría electroforesis capilar. | ADN y ARN de cuatro pacientes. No consensuaron de forma previa los <i>pipelines</i> bioinformáticos y la forma de realizar el informe de resultados. | Se extrae ADN, se secuencia con PMP. Se envía el ADN a otras empresas para comparar resultados con otros paneles. |
| Técnicas de comparación   | No hay.  | No hay en la validación clínica (o no se describen).  | No hay.  | No se describen.   | No se describen.  |
| Tamaño muestral   | Seis muestras a cada centro. Una de las muestras evaluada de forma duplicado por cada centro (rendimiento inter-intra laboratorio).  | Validación cruzada:<br>1ª ronda: cuatro muestras (24 variantes)<br>2ª ronda: seis muestras (30 variantes)<br>Validación clínica: 751 pacientes con AML. | 10 muestras.   | Cuatro pacientes (mismas muestras enviadas a todos los centros).   | 32 pacientes.   |

.../...

.../...

| Estudios sobre validez externa y comparación de paneles de NGS en diagnóstico de leucemias agudas |  |   |   |  |  |
|---|--|---|---|--|--|
| Características   | Haslam K <i>et al.</i> , 2016  | Sargas <i>et al.</i> , 2020   | Corboy <i>et al.</i> , 2021   | Vega-García <i>et al.</i> , 2020   | Aguilera <i>et al.</i> , 2020  |
| <b>Resultados</b>   | 16 mutaciones somáticas en las seis muestras.<br>15 identificadas en los tres centros.<br>Frecuencias alélicas: entre 5,6 y 53,3 % (mediana 44,4 %).<br>Alto nivel de concordancia de frecuencia entre centros para mutaciones detectadas. | <b>Validación cruzada:</b><br>- 1ª ronda: concordancia 60,9 %; error 39,02 %.<br>- 2ª ronda: concordancia 85,57 %; tasa error 14,43 %.<br><b>Validación clínica:</b><br>descripción mutaciones encontradas. | Combinación de resultados de electroforesis y NGS; concordancia del 94 % para variantes génicas incluidas en estratificación riesgo de ELN.<br>Concordancia entre laboratorios que secuencian el gen, la mayoría de variantes (70 %) concordantes al 100 %. | Panel customizado el más específico en detectar mutaciones en LLA pediátrica, pero no cubre genes de fusión.<br><i>FusionPlex</i> ALL específico para detección de genes de fusión en LLA.<br>Panel OCCRA para identificar mutaciones y fusiones en cáncer pediátrico.<br><i>Human Comprehensive Cancer GeneRead Panel v2</i> para diferentes tipos de cáncer.<br>Aunque dos de los cuatro paneles detectan genes de fusión (21 comunes), no incluyen genes de fusión altamente relevantes en el diagnóstico de LLA-B. | Un panel basado en amplicones (TSMF); el resto, captura por hibridación. Preparación librerías: un día para TSMF y SureSeq; PMP y MYS dos días.<br>Tiempo secuenciación diferente por panel por nº ciclos: 50h para PMP y <24h para SureSeq.<br>Incluyen mismos 19 genes relevantes, pero difieren en regiones diana.<br>11 variantes clínicas discordantes entre paneles. |

## Anexo V. Evaluación de la calidad de los estudios siguiendo los criterios de la EGAPP

|  | Combinación NGS de ADN y ARN |                   |                      |                       |                     |
|--|------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
|  | Mareshal S et al., 2021      | Mack et al., 2019 | Hiemenz et al., 2018 | Izevbaye et al., 2016 | Hansen et al., 2016 |
| <b>VALIDEZ ANALÍTICA</b>   |                              |                   |                      |                       |                     |
| Descripción adecuada de la prueba a evaluar                              | No                           | Sí                | Sí                   | Sí                    | No                  |
| Descripción de la base de la "respuesta adecuada"                        |                              | Sí                | Sí                   | Sí                    |                     |
| Evitando sesgos  |                              | Sí                | Sí                   | Sí                    |                     |
| Análisis de los datos  |                              | NA                | Sí                   | Sí                    |                     |
| <b>VALIDEZ CLÍNICA</b>   |                              |                   |                      |                       |                     |
| Descripción clara de desorden/fenotipo y resultados                      | Sí                           | Sí                | No                   | No                    | Sí                  |
| Descripción adecuada del diseño del estudio y test/metodología           | Sí                           | Sí                |                      |                       | Sí                  |
| Comparación cegada independiente con un estándar de referencia apropiado | NA                           | Sí                |                      |                       | NA                  |
| Análisis de los datos  | NA                           | Sí                |                      |                       | NA                  |
| <b>UTILIDAD CLÍNICA</b>  |                              |                   |                      |                       |                     |
| Descripción clara de los resultados de interés                           | No                           | No                | No                   | No                    | No                  |
| Presentación clara del diseño del estudio                                |                              |                   |                      |                       |                     |
| ¿Recogida de datos prospectiva o retrospectiva?                          |                              |                   |                      |                       |                     |
| Intervención   |                              |                   |                      |                       |                     |
| Análisis de los datos  |                              |                   |                      |                       |                     |

| NGS de ADN   |                             |                                 |                            |                         |                                     |                                |
|--|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| He R <i>et al.</i> , 2020  | Alonso <i>et al.</i> , 2019 | Alimohamed <i>et al.</i> , 2018 | Aoe M <i>et al.</i> , 2018 | Ng <i>et al.</i> , 2018 | Benard-Slagter <i>et al.</i> , 2017 | Carbonell <i>et al.</i> , 2021 |
| <b>VALIDEZ ANALÍTICA</b>   |                             |                                 |                            |                         |                                     |                                |
| Descripción adecuada de la prueba a evaluar                              | Sí                          | Sí                              | No                         | Sí                      | Sí                                  | No                             |
| Descripción de la base de la "respuesta adecuada"                        | Sí                          | Sí                              |                            | Sí                      | Sí                                  |                                |
| Evitando sesgos  | Sí                          | Sí                              |                            | Sí                      | Sí                                  |                                |
| Análisis de los datos  | NA                          | NA                              |                            | NA                      | NA                                  |                                |
| <b>VALIDEZ CLÍNICA</b>   |                             |                                 |                            |                         |                                     |                                |
| Descripción clara de desorden/fenotipo y resultados                      | Sí                          | Sí                              | Sí                         | No                      | Sí                                  | Sí                             |
| Descripción adecuada del diseño del estudio y test/metodología           | Sí                          | sí                              | NA                         |                         | Sí                                  | Sí                             |
| Comparación cegada independiente con un estándar de referencia apropiado | NA                          | NA                              | NA                         |                         | Sí                                  | NA                             |
| Análisis de los datos  | NA                          | NA                              | NA                         |                         | NA                                  | NA                             |
| <b>UTILIDAD CLÍNICA</b>  |                             |                                 |                            |                         |                                     |                                |
| Descripción clara de los resultados de interés                           | NA                          | No                              | No                         | No                      | No                                  | No                             |
| Presentación clara del diseño del estudio                                | Cambio de pronóstico        |                                 |                            |                         |                                     |                                |
| ¿Recogida de datos prospectiva o retrospectiva?                          |                             |                                 |                            |                         |                                     |                                |
| Intervención   |                             |                                 |                            |                         |                                     |                                |
| Análisis de los datos  |                             |                                 |                            |                         |                                     |                                |

| NGS de ADN (continuación)  |                 |                        |                        |                     |                      |                              |
|--|-----------------|------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|------------------------------|
|  | Au et al., 2016 | Chicano M et al., 2021 | Carbonell et al., 2019 | Shen W et al., 2017 | Vosberg et al., 2016 | Montañó A et al., 2020       |
| <b>VALIDEZ ANALÍTICA</b>   |                 |                        |                        |                     |                      |                              |
| Descripción adecuada de la prueba a evaluar                              | Sí              | No                     | No                     | Sí                  | No                   | Sí                           |
| Descripción de la base de la "respuesta adecuada"                        | Sí              |                        |                        | Sí                  |                      | Sí                           |
| Evitando sesgos  | NA              |                        |                        | NA                  |                      | NA                           |
| Análisis de los datos  | NA              |                        |                        | NA                  |                      | NA                           |
| <b>VALIDEZ CLÍNICA</b>   |                 |                        |                        |                     |                      |                              |
| Descripción clara de desorden/fenotipo y resultados                      | Sí              | Sí                     | Sí                     | No                  | Sí                   | Sí                           |
| Descripción adecuada del diseño del estudio y test/metodología           | Sí              | Sí                     | Sí                     |                     | Sí                   | Sí (muestras retrospectivas) |
| Comparación cegada independiente con un estándar de referencia apropiado | NA              | NA                     | NA                     |                     | NA                   | NA                           |
| Análisis de los datos  | NA              | NA                     | NA                     |                     | NA                   | NA                           |
| <b>UTILIDAD CLÍNICA</b>  |                 |                        |                        |                     |                      |                              |
| Descripción clara de los resultados de interés                           | No              | NA                     | NA                     | No                  | No                   | NA                           |
| Presentación clara del diseño del estudio                                |                 | Cambio de pronóstico   | Cambio de pronóstico   |                     |                      | Cambio de pronóstico         |
| ¿Recogida de datos prospectiva o retrospectiva?                          |                 |                        |                        |                     |                      |                              |
| Intervención   |                 |                        |                        |                     |                      |                              |
| Análisis de los datos  |                 |                        |                        |                     |                      |                              |

|  | NGS de ARN                     |                               |                               |                          |                          |
|--|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|  | Podgornik <i>et al.</i> , 2021 | Soverini <i>et al.</i> , 2021 | de Lange <i>et al.</i> , 2020 | Kim <i>et al.</i> , 2019 | Kim <i>et al.</i> , 2020 |
| <b>VALIDEZ ANALÍTICA</b>   | No                             | No                            | Sí                            | Sí                       | No*                      |
| Descripción adecuada de la prueba a evaluar                              |                                |                               | Sí                            | Sí                       |                          |
| Descripción de la base de la "respuesta adecuada"                        |                                |                               | Sí                            | Sí                       |                          |
| Evitando sesgos  |                                |                               | NA                            | NA                       |                          |
| Análisis de los datos  |                                |                               | NA                            | NA                       |                          |
| <b>VALIDEZ CLÍNICA</b>   | Sí                             | Sí                            | Sí                            | No                       | Sí                       |
| Descripción clara de desorden/fenotipo y resultados                      | Sí                             | Sí                            | Sí                            |                          | Sí                       |
| Descripción adecuada del diseño del estudio y test/metodología           | Sí                             | Sí                            | Sí                            |                          | Sí                       |
| Comparación cegada independiente con un estándar de referencia apropiado | NA                             | NA                            | NA                            |                          | NA                       |
| Análisis de los datos  | NA                             | NA                            | NA                            |                          | NA                       |
| <b>UTILIDAD CLÍNICA</b>  | No                             | No                            | NA                            | No                       | No                       |
| Descripción clara de los resultados de interés                           |                                |                               | Clasificar tipo de leucemia   |                          |                          |
| Presentación clara del diseño del estudio                                |                                |                               |                               |                          |                          |
| ¿Recogida de datos prospectiva o retrospectiva?                          |                                |                               |                               |                          |                          |
| Intervención   |                                |                               |                               |                          |                          |
| Análisis de los datos  |                                |                               |                               |                          |                          |

\* Publicado anteriormente.

| NGS de ARN (continuación)  |                             |                               |                              |                               |                              |
|--|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|  | Grioni <i>et al.</i> , 2019 | Szankasi <i>et al.</i> , 2016 | Engvall <i>et al.</i> , 2020 | Soverini <i>et al.</i> , 2016 | Yeung <i>et al.</i> , 2021   |
| <b>VALIDEZ ANALÍTICA</b>   | No*                         | No*                           | Sí                           | No*                           | No                           |
| Descripción adecuada de la prueba a evaluar                              |                             |                               | Sí                           |                               |                              |
| Descripción de la base de la "respuesta adecuada"                        |                             |                               | Sí                           |                               |                              |
| Evitando sesgos  |                             |                               | NA                           |                               |                              |
| Análisis de los datos  |                             |                               | NA                           |                               |                              |
| <b>VALIDEZ CLÍNICA</b>   | Sí                          | Sí                            | Sí                           | Sí                            | Sí                           |
| Descripción clara de desorden/fenotipo y resultados                      | Sí                          | Sí                            | Sí                           | Sí                            | Sí                           |
| Descripción adecuada del diseño del estudio y test/metodología           | Sí                          | Sí (retrospectivo)            | Sí (muestras retrospectivas) | Sí (muestras retrospectivas)  | Sí (muestras retrospectivas) |
| Comparación cegada independiente con un estándar de referencia apropiado | NA                          | NA                            | Sí                           | Sí                            | Sí                           |
| Análisis de los datos  | NA                          | NA                            | NA                           | NA                            | NA                           |
| <b>UTILIDAD CLÍNICA</b>  | No                          | No                            | No                           | No                            | No                           |
| Descripción clara de los resultados de interés                           |                             |                               |                              |                               |                              |
| Presentación clara del diseño del estudio                                |                             |                               |                              |                               |                              |
| ¿Recogida de datos prospectiva o retrospectiva?                          |                             |                               |                              |                               |                              |
| Intervención   |                             |                               |                              |                               |                              |
| Análisis de los datos  |                             |                               |                              |                               |                              |

\* Publicado anteriormente.

## Anexo VI. Tabla resumen de los paneles comerciales utilizados en los estudios incluidos

| Paneles comerciales                   | Tipo de panel  | RUO/CE-IVD | Pacientes   | Plataforma utilizada  | Referencias   |
|---------------------------------------|--|------------|---|---|---|
| Panel (ArcherDx)                      | Detección de fusiones, mutaciones puntuales y niveles de expresión de 81 genes asociados a ALL, incluyendo fusiones recurrentes de tipo Ph-Like ALL.<br>Detección de fusiones sin conocer incluso el <i>partner</i> o los puntos de ruptura. | RUO        | LLA-B<br>LLA-B Ph-like, sin fusiones mutuamente excluyentes y sin CRLFy por FISH.<br>Aplicado en niños y adultos. | MiSeq (Illumina)<br>Ion PGM system (Thermo Fisher Scientific) | Podgornik <i>et al.</i> , 2021<br>Yeung <i>C et al.</i> , 2021<br>Vega-García <i>et al.</i> , 2020  |
| FusionPlex® Pan-Heme panel (ArcherDx) | Detección de genes de fusión<br>Cubre 199 genes diana relacionadas con neoplasias mieloides o linfoides.   | RUO        | Leucemia aguda (tanto LLA como LMA).  | NexSeq 550 (Illumina)<br>MiniSeq (Illumina)                   | Kim <i>et al.</i> , 2019<br>Kim <i>et al.</i> , 2020<br>Engvall <i>et al.</i> , 2020  |
| FusionPlex® Myeloid panel (ArcherDx)  | Detección de SNVs e <i>indels</i> en DNA<br>No se ha encontrado más información.   | RUO        | LMA   | Illumina  | Corboy <i>et al.</i> , 2021   |
| TruSight Myeloid panel (Illumina)     | 54 genes incluidos (exones codificantes completos de 15 genes y <i>traspot</i> exónicos de 39 genes).  | RUO        | LMA   | MiSeq (Illumina)<br>NexSeq 550 (Illumina)                     | Corboy <i>et al.</i> , 2021<br>Mack <i>et al.</i> , 2019<br>Ng <i>et al.</i> , 2018<br>Au <i>et al.</i> , 2016<br>De Lange <i>et al.</i> , 2020 |
| TruSight RNA fusion panel (Illumina)  | Detección de genes de fusión en múltiples tipos de cáncer.<br>Cubre 507 genes asociados a fusiones.<br>Poder de detectar nuevas fusiones.<br>Utilización de muestras de sangre, médula ósea y FFPE.  | RUO        | Leucemia aguda en general.  | MiSeq (Illumina)  | Kim <i>et al.</i> , 2019  |

.../...

| Panes comerciales  | Tipo de panel   | RUO/CE-IVD | Pacientes   | Plataforma utilizada                     | Referencias                      |
|--|---|------------|---|--|----------------------------------|
| TruSight RNA Pan-Cancer panel (Illumina)   | Variantes de expresión génica y detección de fusiones. 1385 genes. Secuenciación del transcriptoma. Detección variantes (SNV/indel); genes de fusión, sobreexpresión  | RUO        | Neoplasias hematológicas.   | MiSeq (Illumina) NextSeq 550 (Illumina)  | De Lange <i>et al.</i> , 2020    |
| QIASeq™ Myeloid Neoplasms panel (Qiagen)   | Panel utilizado para el análisis de 141 genes comúnmente mutados en neoplasias mieloides.   | RUO        | LMA   | MiSeq (Illumina)                         | Mack <i>et al.</i> , 2019        |
| Oncokids® Cancel Panel (Children's Hospital Los Angeles)                           | NGS de ADN y ARN en un único panel. Incluye regiones codificantes de 44 loci de predisposición al cáncer, genes de supresión tumoral y oncogenes: <i>hotspots</i> de mutaciones en 82 genes y amplificaciones en 24 genes.              | RUO        | Diferentes tipos de muestras utilizadas y amplio tipo de tumores testados: LLA, tumores/sarcomas de tejidos blandos, neoplasias mieloides, tumores cerebrales y embrionarios. | Ion S5 y S5XL (Thermo Fisher Scientific) | Hiemenz <i>et al.</i> , 2018     |
| Oncomine Myeloid Research Assay (OMR) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) | Contiene sets de genes basados en ARN y ADN, que interrogan 23 genes <i>hotspot</i> , 17 genes completos, 29 genes implicados en fusiones, cinco genes de expresión y cinco genes de expresión control.                                 | RUO        | Neoplasias mieloides agudas y crónicas.   | Ion S5 (Thermo Fisher Scientific)        | Izevbaye <i>et al.</i> , 2016    |
| Oncomine Childhood Cancer Research Assay (Thermo Fisher Scientific)                | Incluye regiones <i>hotspot</i> de 82 genes, la secuencia codificante completa de 44 dianas, y variación de CNV en 24 genes. También detecta reordenaciones de 88 <i>drivers</i> y cuantifica la expresión de 9 dianas al analizar RNA. | RUO        | Niños y adultos jóvenes.  | Ion S5 (Thermo Fisher Scientific)        | Vega-García <i>et al.</i> , 2020 |
| OncoHeme next generation sequencing panel (Mayo Clinic Laboratories)               | 35 genes mutados en neoplasias mieloides (Se centran en FLT3-ITD).  | RUO        | LMA.  | MiSeq (Illumina) HiSeq (Illumina)        | He R <i>et al.</i> , 2020        |

.../...

.../...

.../...

| Paneles comerciales   | Tipo de panel  | RUO/CE-IVD | Pacientes             | Plataforma utilizada                                  | Referencias  |
|---|--|------------|-----------------------|---|--|
| Ion Ampliseq AML Community panel (Thermo Fisher Scientific) | Panel de 19 genes  | RUO        | LMA                   | Ion Torrent Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific) | Alonso <i>et al.</i> , 2019<br>Papuc <i>et al.</i> , 2021  |
| LMA-GeneSGKit (Sistemas Genómicos)                          | 62 genes implicados en neoplasias mieloides (AML, SDM y neoplasias mieloproliferativas crónicas). Incluye la detección de <i>indels</i> y SNV. | CE-IVD     | Neoplasias mieloides. | MiSeq (Illumina)                                      | Carbonell <i>et al.</i> , 2021<br>Carbonell <i>et al.</i> , 2019<br>Chicano <i>et al.</i> , 2021 |
| MyeloidNeoplasm-GeneSGKit (Sistemas Genómicos)              | Designados para analizar 37 amplicones, puede detectar 13 translocaciones, siete deleciones y tres aneusomías o cambios estructurales.         | CE-IVD     | Neoplasias mieloides. | MiSeq (Illumina)                                      | Chicano M <i>et al.</i> , 2021<br>Carbonell <i>et al.</i> , 2019                                 |
| SOPHIA Myeloid Solution (MYS) (SOPHIA Genetics)             | 30 genes (10 con secuencia codificante completa). Detección de SNVs, <i>Indels</i> , CNVs y <i>FLT3</i> duplicaciones internas en tándem.      | CE-IVD     | LMA en los estudios   | Illumina  | Carbonell <i>et al.</i> , 2021<br>Corboy <i>et al.</i> , 2021                                    |
| Human Comprehensive Cancer Panel GeneRead Panel v2 (Qiagen) | 160 genes frecuentemente mutados en cáncer.  | RUO        | LLA infantil.         | NextSeq 550 (Illumina)                                | Vega-García <i>et al.</i> , 2020   |



