

DIAGNÓSTICO INTEGRADO DE LEUCEMIAS AGUDAS

Impacto Terapéutico y Prognóstico

Pedro Horna, M.D.
Hematopatólogo

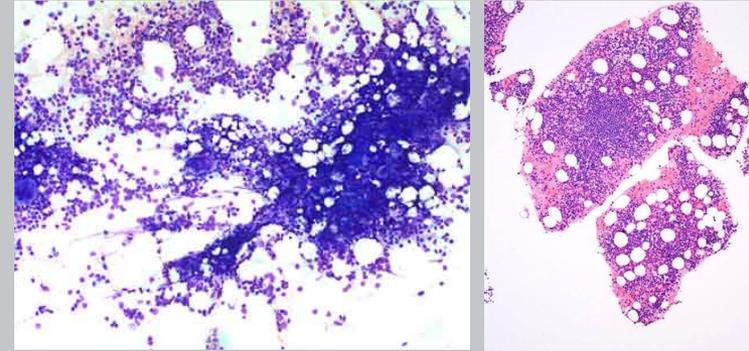
H, Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute
TAMPA, FLORIDA



Diagnóstico Integrado de Leucemias Agudas

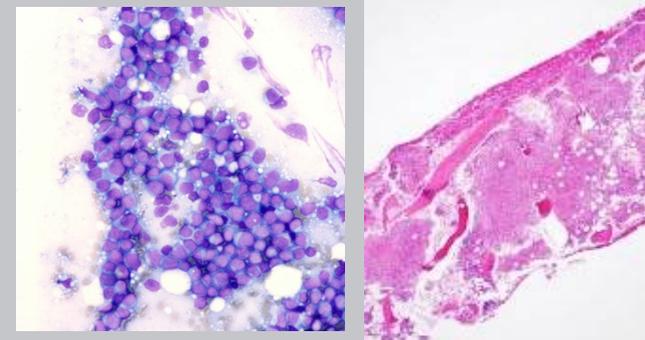
Aspirado de médula osea

- **Frotis (Wright-Giemsa)**
- **Sección de coágulo (hematoxilina-eosina)**
- Análisis cromosómico convencional
- Citometría de flujo
- FISH
- Estudio de mutaciones genéticas



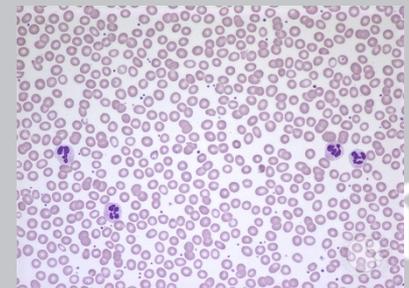
Biopsia de médula ósea

- **Impresión en slide (Wright-Giemsa)**
- **Sección de biopsia decalcificada (hematoxilina-eosina)**
- Immunohistoquímica



Muestra de sangre periférica

- **Frotis (Wright-Giemsa)**
- Muestra alternativa para estudios auxiliares.



Fluxograma de Diagnóstico de Leucemias Agudas

DÍA 1

- Evaluación de frotis de aspirado, frotis de sangre e impresión de biopsia (Wright-Giemsa).
- Evaluación de citometría de flujo STAT.
- Hematopatólogo responsable de revisar historia clínica y ordenar estudios auxiliares apropiados.

DÍA 2

- Evaluación de secciones de biopsia y coágulo de aspirado (H&E).

DÍA 3-7

- **REPORTE DE PATOLOGÍA INTEGRADO: Aspirado, biopsia, sangre, estudios auxiliares.**

Evaluación inicial para iniciar tratamiento en pacientes con leucemias agudas

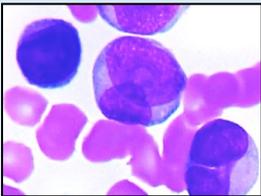
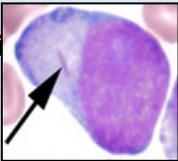
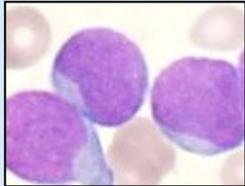
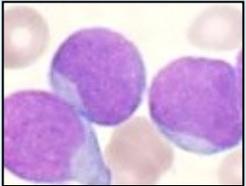
Evaluación microscopica del frotis de aspirado de médula o frotis de sangre + Citometría de Flujo (STAT)

Leucemia aguda promielocítica

Leucemia mieloide aguda (no promyelocítica)

Leucemia T linfoblástica aguda

Leucemia B linfoblástica aguda

Leucemia Aguda promielocítica	Leucemia mieloide aguda (no promielocítica)	Leucemia B linfoide	Leucemia T linfoide
<p>Morfología: Núcleo bilobado, gránulos citoplasmáticos primarios, múltiples bastos de Auer.</p>  <p>Citoquímica: Mieloperoxidasa (+)</p> <p>Citometría de Flujo: CD34(-) HLADR(-) CD117(+) MPO(+) CD13(+) CD33(+) CD11b(-) CD11c(-)</p> <p>FISH / Citogenética: t(15;17)(q24;q22) or variantes</p>	<p>Morfología: Variable, blastos grandes indiferenciados o con diferenciación granulocítica, monocítica u otro. A veces displasia</p> <p>Bastones de Auer, pero diagnosticos.</p>  <p>Citoquímica: Mieloperoxidasa (+/-), diagnóstico si es positiva.</p> <p>Citometría de Flujo: Variable expresión de antígenos mieloides, megacariocíticos o eritroides: CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD41, CD64, CD61</p> <p>FISH / Citogenética: Variable</p>	<p>Morfología: Variable, blastos generalmente pequeños, sin evidencia de diferenciación.</p>  <p>Citoquímica: Mieloperoxidasa (-),</p> <p>Citometría de Flujo: CD19(+)</p> <p>La mayoría CD10(+), inmunoglobulina (-)</p> <p>Expresión variable de antígenos de inmadurez TdT, CD34</p> <p>FISH / Citogenética: Variable</p>	<p>Morfología: Variable, blastos generalmente pequeños, sin evidencia de diferenciación.</p>  <p>Citoquímica: Mieloperoxidasa (-),</p> <p>Citometría de Flujo: CD3 citoplasmático (+) CD7(+)</p> <p>Expresión variable de antígenos de inmadurez TdT, CD34, CD1a, CD99</p> <p>FISH / Citogenética: Variable</p>

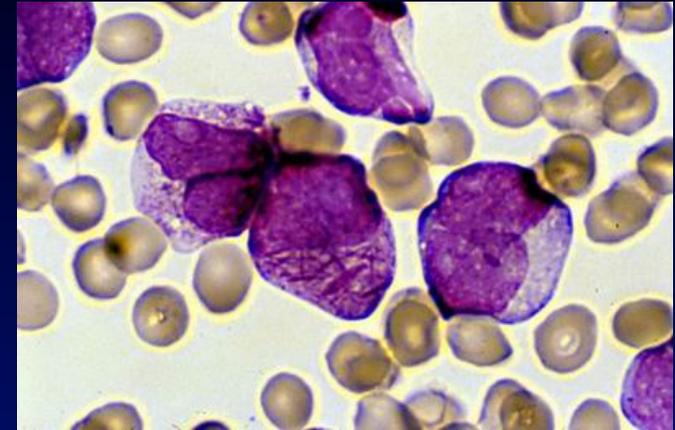
Otras patologías y condiciones con células blasticas o de apariencia inmadura en sangre y médula ósea

- Linfomas y leucemias maduros de alto grado:
 - Linfoma de Burkitt
 - Linfoma blástico de células del manto
 - Leucemia agresiva de células NK
 - Linfoma B difuso de células grandes
 - Otros.
- Mieloblastos menos de 20%: considerar síndrome mielodisplástico de alto grado.
- Condiciones reactivas o regenerativas con expansiones benignas de células B inmaduras o mieloblastos: post-transplante de médula, factores de crecimiento, post quimioterapia, pacientes pediátricos, infecciones severas.
- Neoplasias no hematopoiéticas con metástasis a la médula ósea:
 - Carcinoma o sarcoma pobremente diferenciado
 - Tumor neuroendocrino
 - Tumor de células germinales.

Leucemia aguda Promielocítica

t(15;17)(q24;q22); *PML-RARA*

- Prognóstico favorable.
- Mortalidad temprana antes de iniciar tratamiento por desarrollo de coagulación intravascular diseminada.
- Tratar inmediatamente con ATRA ante la sospecha morfológica de leucemia aguda promielocítica, y antes de confirmación por citogenética.

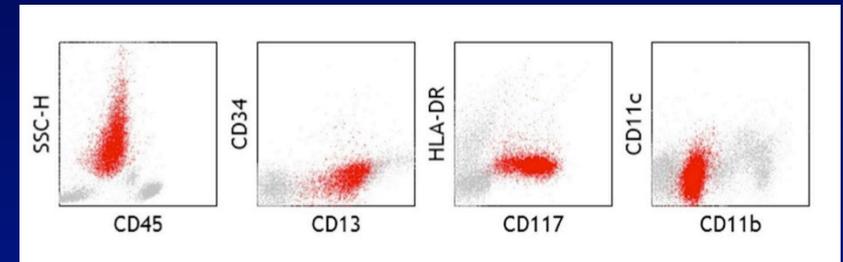


- **Citometría de flujo:**

- MPO(++), CD117(+), HLA-DR(-), CD34(-), side scatter (+).
- CD11b(-), CD11c(-).

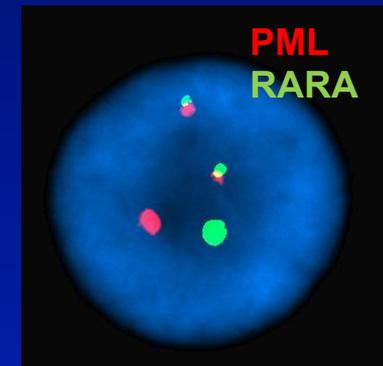
- **Estudios confirmatorios:**

- **FISH de fusión para PML-RARA.**
- FISH de separación para *v-RARA*
- RT-PCR para PML-RARA



- **Translocaciones variantes:**

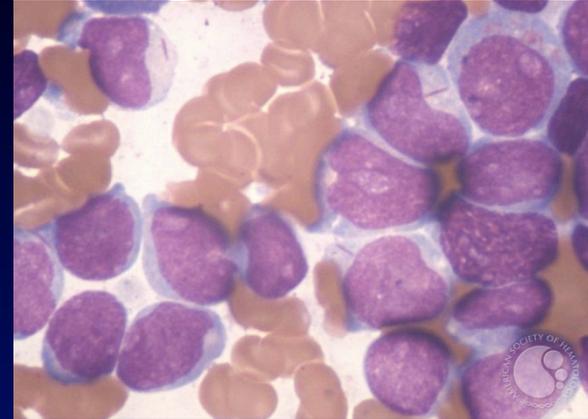
- t(11;17)(q23;q12);ZBTB16-RARA
- t(5;17)(q35;q12);NPM1-RARA
- t(17;17)(q35;q11);STAT5B-RARA
- Translocaciones complejas entre PML, RARA y un cromosoma adicional.
- Inserciones submicroscópicas de RARA en PML



Leucemias mieloides agudas con translocaciones de subunidades de “core binding factor”

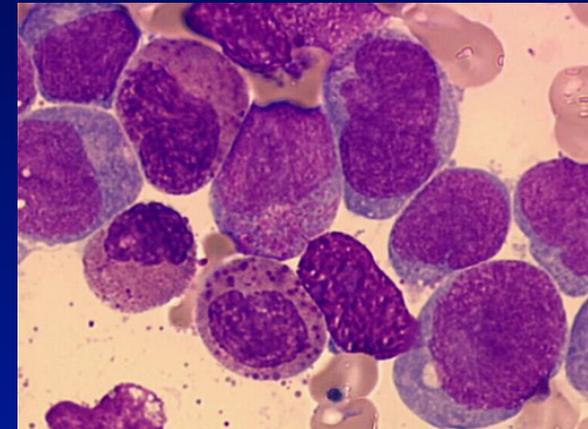
t(8;21)(q22;q22); RUNX1(CBF α)-RUNX1T1

- Leucemia con maduración granulocítica.
- Inclusiones citoplasmáticas rosa-salmón.
- Bastones de Auer solitarios, largos y delgados.



inv16 o t(16;16)(p13.1;q22); CBF β -MYH11

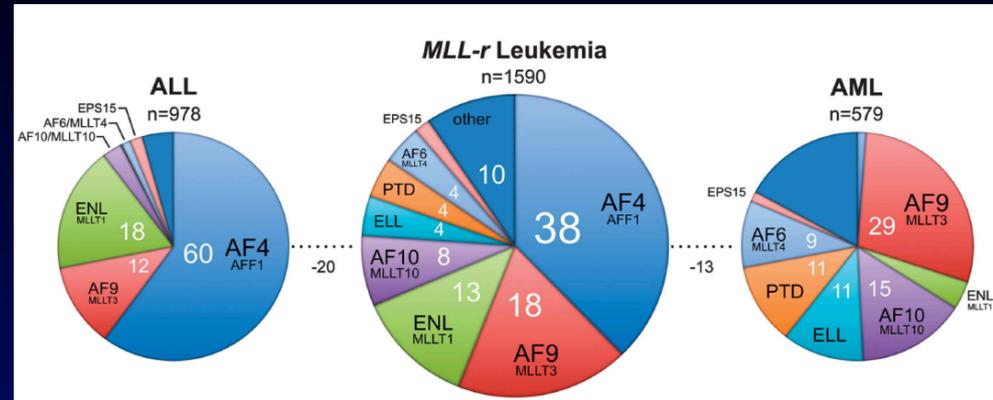
- Leucemia con maduración mielomonocítica.
- Eosinófilos inmaduros atípicos con gránulos metacromáticos



- Relativamente buen pronóstico
- Mutaciones en KIT confieren mal pronóstico
- inv16 puede ser difícil de detectar por cariotipo convencional

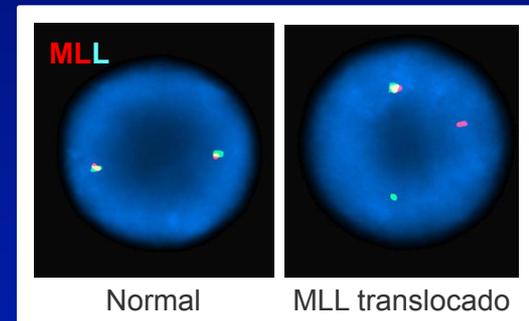
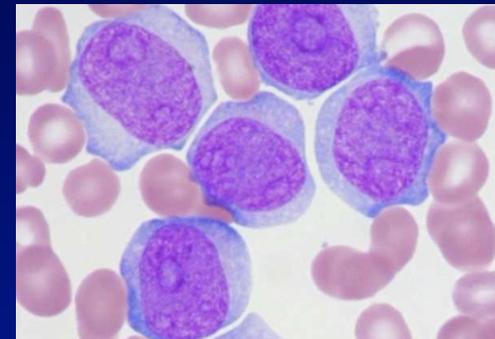
Leucemias con translocaciones de MLL / KMT2A (11q23)

- Se han descrito mas de 120 diferentes translocaciones involucrando MLL y varios otros genes.
- Las translocaciones mas frecuentes son:
 - t(4;11) AF4-MLL**, generalmente con fenotipo de leucemia aguda B linfoblástica.
 - t(9;11) AF9-MLL**, generalmente con fenotipo de leucemia mieloide aguda con diferenciación monocítica.



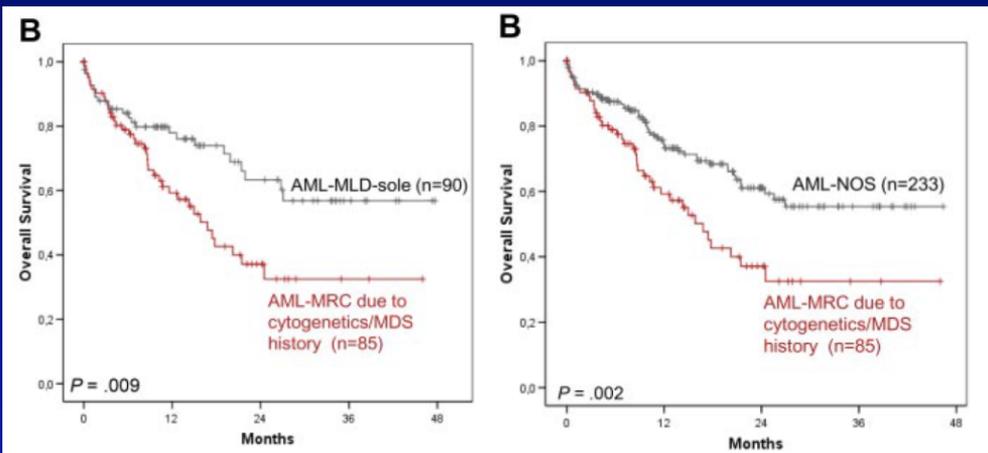
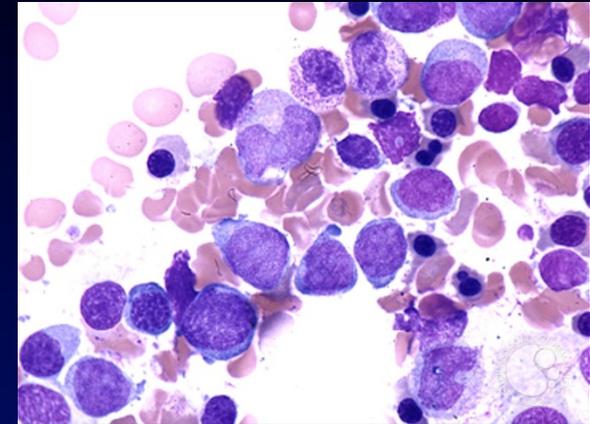
Meyer C, et al. Leukemia 2013;27:2165

- t(4;11) y t(9;11) detectables por cariotipo convencional.
- 30% de otras translocaciones de 11q23 son submicroscópicas y requieren FISH de separación de MLL para ser detectadas.
- Leucemias con translocacion de MLL son de pronóstico desfavorable.
- t(9;11) es considerada separadamente como leucemia de riesgo intermedio.



Leucemias mieloides agudas con cambios relacionados a mielodisplasia

- Prognóstico desfavorable
- Clasificación de la OMS (2008) considera **tres posibilidades para diagnóstico**
 - ✓ Pacientes con historia de síndrome mielodisplástico o mieloproliferativo que evolucionan con 20% o más blastos.
 - ✓ Leucemias agudas nuevas con displasia morfológica en >50% de elementos en al menos 2 lineages. (???)
 - ✓ Leucemias agudas nuevas con alteraciones cromosómicas asociadas a síndrome mielodisplástico.
- En pacientes con leucemias nuevas y cariotipo normal, la supervivencia no es afectada en la presencia o ausencia de mielodisplasia morfológica.



Miesner M, et al. Blood 2010;116:2742.

Table 8. Cytogenetic abnormalities sufficient for diagnosis of AML with myelodysplasia-related changes when 20% or more PB or BM blasts are present

Complex karyotype*

Unbalanced abnormalities

–7 or del(7q)
 –5 or
 i(17q) or t(17p)
 –13 or del(13q)
 del(11q)
 del(12p) or t(12p)
 del(9q)
 idic(X)(q13)

Balanced abnormalities

t(11;16)(q23;p13.3)†
 t(3;21)(q26.2;q22.1)†
 t(1;3)(p36.3;q21.1)
 t(2;11)(p21;q23)†
 t(5;12)(q33;p12)
 t(5;7)(q33;q11.2)
 t(5;17)(q33;p13)
 t(5;10)(q33;q21)
 t(3;5)(q25;q34)

*Three or more unrelated abnormalities, none of which are included in the "AML with recurrent genetic abnormalities" subgroup; such cases should be categorized in the appropriate cytogenetic group.

†These abnormalities most commonly occur in therapy-related disease, and therapy-related AML should be excluded before these are used as evidence for diagnosis of AML with myelodysplasia-related changes.

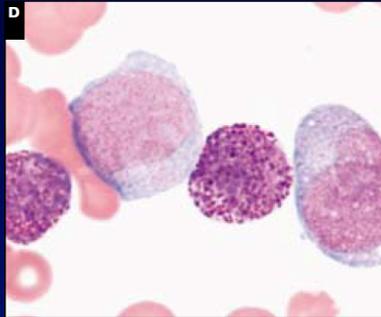
Vardiman J, et al. Blood 2009;114:937

Leucemias mieloides agudas con cambios asociados a mielodisplasia

Entidades independientes

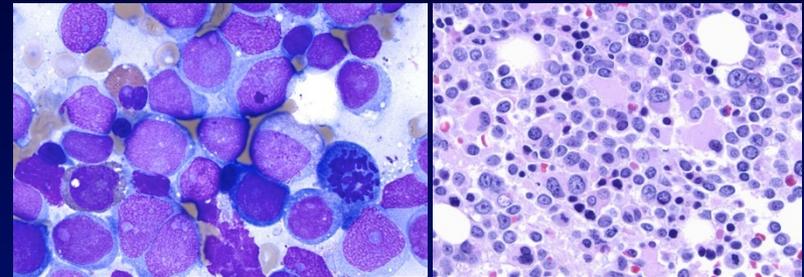
t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

- Basofilia



inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

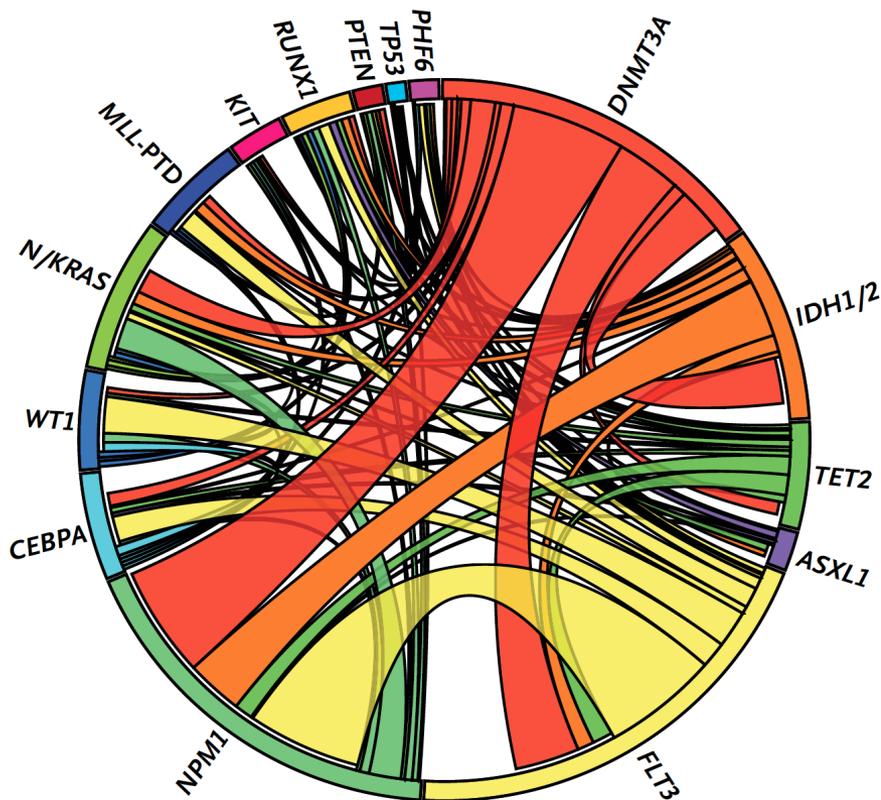
- Trombocitosis, megacariocitos monolobados.



- Mielodisplasia multilineage.
- Alteraciones detectables por cariotipo convencional.
- Prognostico desfavorable

Mutaciones en Leucemias Mieloides Agudas

- ~50% de casos de leucemia aguda mieloide no tienen alteraciones cromosómicas recurrentes de significado pronóstico
- Estudios de secuenciamiento genético de nueva generación han detectado mutaciones en un número limitado de genes (20-30), en >95% de leucemias mieloides agudas.



Patel JP, et al. NEJM 2012;366:1079

Señales de transducción

- FLT3
- N/K-RAS
- KIT

Señales de diferenciación

- NPM1
- CEBPA
- MLL
- RUNX1

Regulación epigenética

- DNMT3A
- IDH1/2
- ASXL1
- TET2

Genes supresores de tumores

- TP53
- WT1

EVALUACIÓN PROGNÓSTICA DE LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

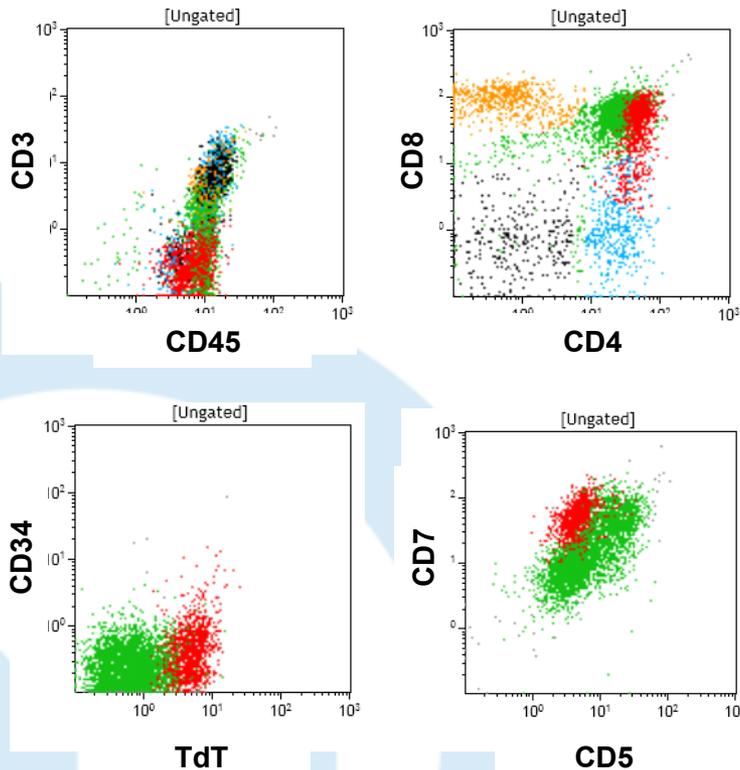
RIESGO	CARIOTIPO ANORMAL	CARIOTIPO NORMAL	RESPUESTA A 7+3
FAVORABLE	<ul style="list-style-type: none"> t(15;17) inv(16) o t(16;16) sin mutacion en KIT t(8;21) sin mutation en KIT 	<ul style="list-style-type: none"> mutaciones de CEBPA biallelicas Mutacion en NPM1 en la ausencia de mutaciones en FLT3-ITD 	<ul style="list-style-type: none"> Remision completa: 80-90% Recidiva: 35-40%
INTERMEDIO I	<ul style="list-style-type: none"> inv(16) or t(16;16) con mutacion en KIT t(8;21) con mutation en KIT 	<ul style="list-style-type: none"> Otras mutaciones o mutaciones no detectables 	<ul style="list-style-type: none"> Remision completa: 50-80% Recidiva: 50-60%
INTERMEDIO II	<ul style="list-style-type: none"> t(9;11) Otras anormalidades cromosomicas 	<ul style="list-style-type: none"> Mutacion en FLT3-ITD 	<ul style="list-style-type: none"> Remision completa: 40-60% Recidiva: 70-80%
DESFAVORABLE	<ul style="list-style-type: none"> Otras translocaciones de 11q23 Alteraciones cromosomicas asociadas a mielodisplasia: <ul style="list-style-type: none"> -5q, -7q, cariotipo complejo, cariotipo monosomal inv(3) o t(3;3) t(6;9) 	<ul style="list-style-type: none"> Mutaciones en p53 Otras mutaciones??? RUNX1, TET2, ASXL1, MLL-PTD, PHF6, DNMT3A. Quizas en combinacion con mutaciones es FLT3-ITD y/o en la ausencia de mutaciones en CEBPA. 	<ul style="list-style-type: none"> Remision completa: <50% Recidiva: >90%

- Acute Myeloid Leukemia. **NCCN Guidelines** 2015. www.nccn.org
- Estey, EH. **Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk stratification and management**. Am J Hematol 2014;89:1064
- Dohner H, et al. **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet**. Blood 2010;115:453.
- Patel JP, et al. **Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia**. NEJM 2012;366:1079.
- Grossman V, et al. **A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations**. Blood 2012;120:2963.

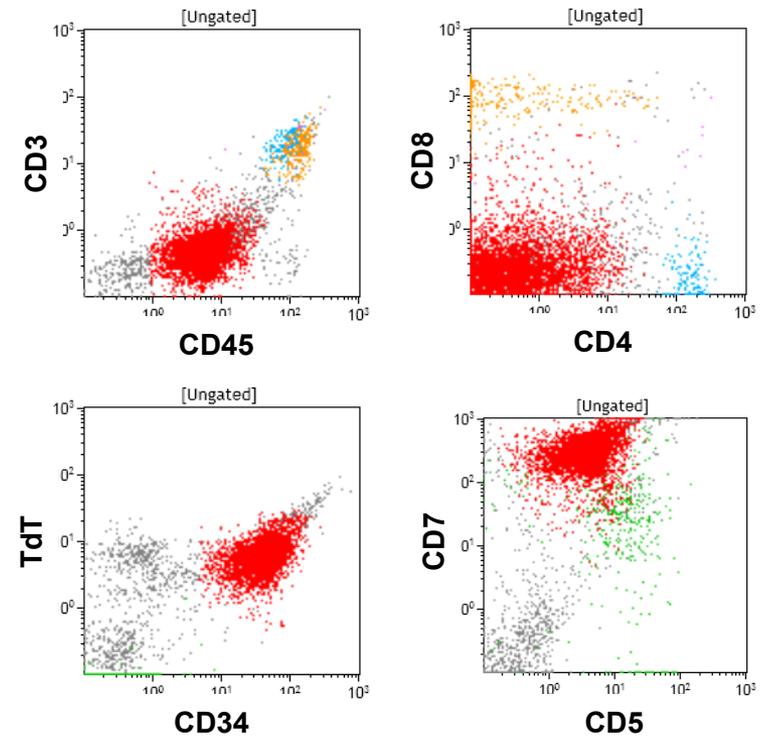
Diagnóstico de Leucemia Aguda T Linfooblástica

- Diagnóstico de leucemia aguda T linfooblástica en sangre o médula ósea consiste en la demostración de células T inmaduras.
- La leucemia aguda T linfooblástica comunmente se presenta como masa mediastinal (linfoma T linfooblástico). En esta escenario, la citometría de flujo es muy útil para distinguir células T inmaduras benignas de timo vs. linfoblastos T malignos.

Timocitos benignos



Linfoma/leucemia T linfooblástica



Factores Prognósticos en Leucemia Aguda T Infioblástica

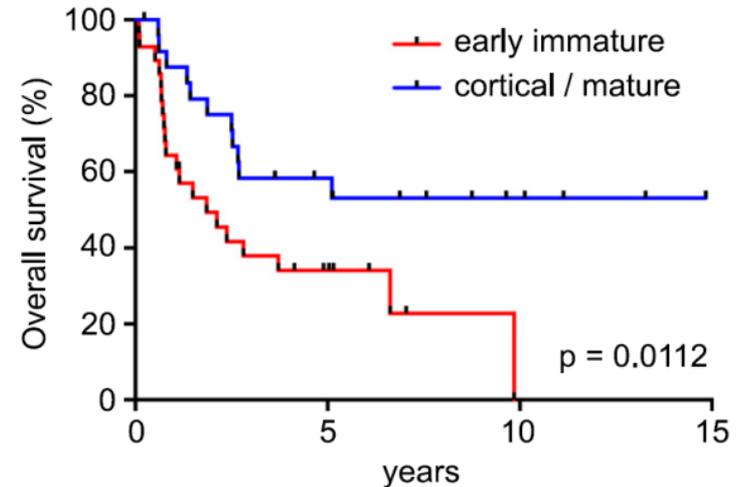
• Citometría de Flujo

Coustan-Smith E, et al. Lancet Oncol 2009;10:147

- **Fenotipo de timocitos corticales (90-95%)**
Buen pronóstico
CD1a(+), CD5(+), CD4(+) o CD8(+) o CD4(+)/CD8(+)
- **Fenotipo de Precursor T temprano (5-10%)**
Mal pronóstico
CD1a(-) CD8(-) CD5 (bajo/-) y...presencia de uno o mas marcadores de inmadurez or mieloides: CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b

• Mutaciones Prognósticas

- **Favorables**
 - Mutaciones en NOTCH1 / FBXW7 (60%)
 - Deleciones homocigotas de 9p21-22 CDKN2A/2B
- **Desfavorables**
 - Ausencia de deleción bi-alelica de TCRG
 - Mutaciones en DNMT3A, IDH1/2 and RUNX1
 - Deleción 17p P53
 - LOH 6q16
 - mutaciones o deleciones en N-RAS / K-RAS / PTEN



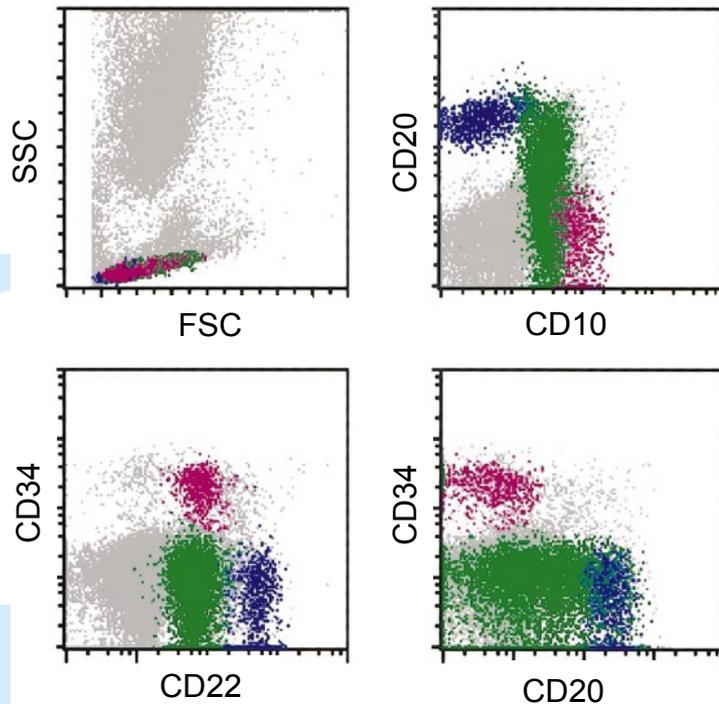
Van Vlierberghe P, et al. Blood 2013;122:74

Van Vlierberghe P, et al. Blood 2013;122:74
Trinquand A, et al. JCO 2013;31:4333
Bonn BR, et al. Blood 2013;121:3153
Grossmann V, et al. Haematologica 2011;96:1874

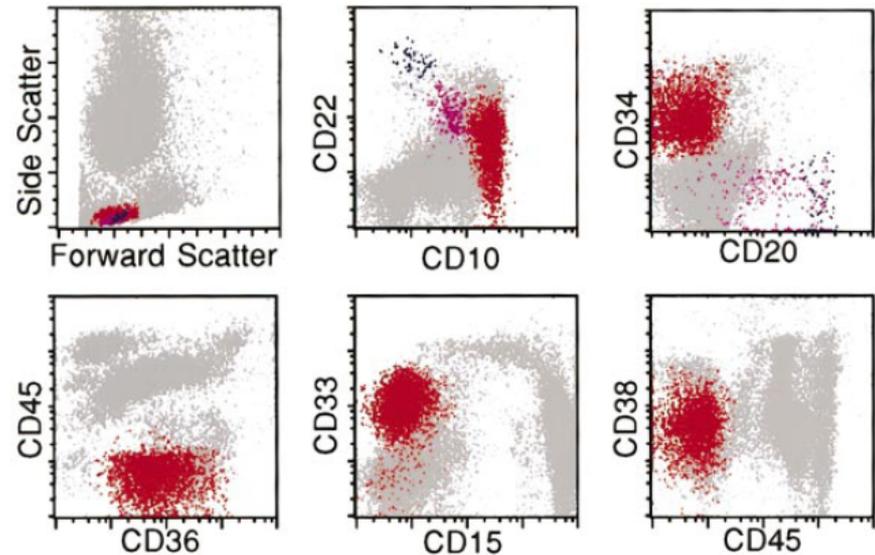
Diagnóstico de Leucemia Aguda B Infolblástica

- La maduración de células B ocurre normalmente en la médula ósea.
- En situaciones reactivas y regenerativas puede haber un incremento marcado de células B inmaduras benignas (hematogonas).
- Citometría de flujo es esencial para distinguir hematogonas benignas vs. linfoblastos B malignos.

Hyperplasia benigna de linfocitos B inmaduros



Linfoma/leucemia B infoblástica



Evaluación Prognóstica en Leucemia aguda B linfoblástica

Estudios de FISH

Mal Prognóstico

t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1

t(v;11q23); MLL-v

iAMP21 (misma prueba que para ETV6-RUNX1)

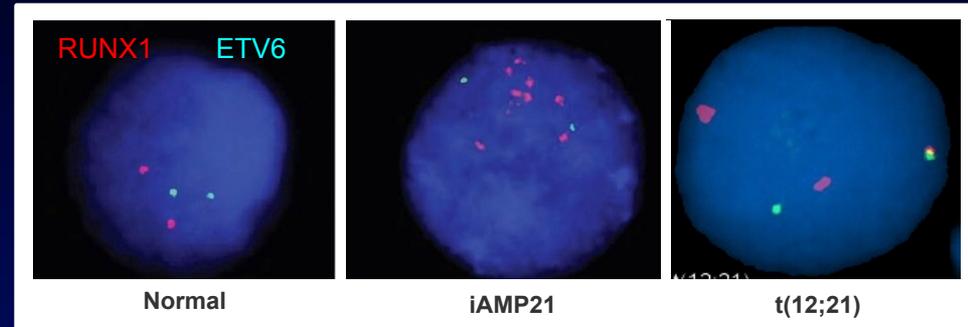
Hypodiploidia (<44 cromosomas) (CEP 4,10,17)

Buen pronóstico

t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1

t(1;19); TCF3-PBX1

Hyperdiploidia (51-65 cromosomas) (CEP 4, 10, 17)



Otros factores pronósticos en leucemia aguda B linfoblástica

~30% de leucemias agudas B linfoblásticas no tienen una alteración cromosómica pronóstica

•Perfil de expresión genética similar a casos con t(9;11). “BCR-ABL1-like”.

Den Boer, NL, et al. *Lancet Oncol* 2009;10:125

- Pronóstico adverso.
- Test no estandarizado.

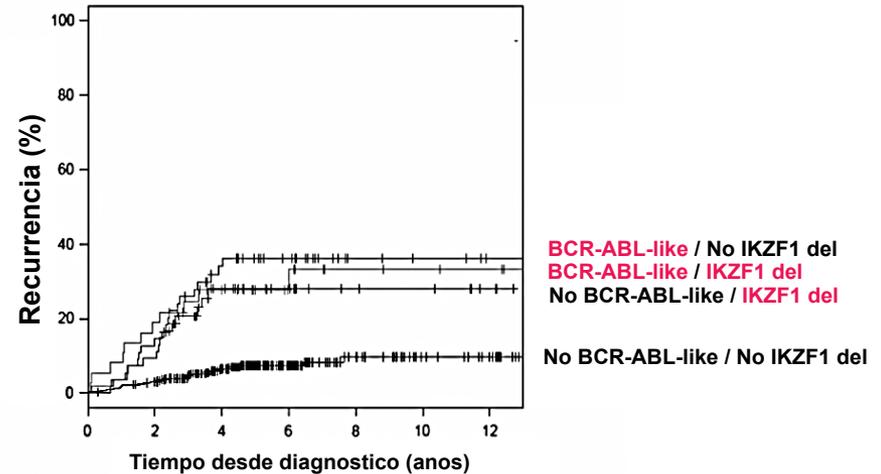
• del17p12.2 IKZF1 (“ikaros”)

Mullighan C, et al. *NEJM* 2009;360:470.

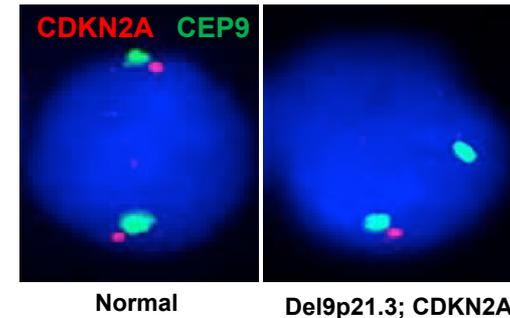
- Pronóstico adverso
- Detección por SNP array (costoso).
- Detección por FISH todavía no está disponible comercialmente.

•Del9p21.3 CDKN2A

- Pronóstico adverso (controversial).
- FISH disponible.



Van der Veer, A, et al. *Blood* 2013;122:2622



**Citología: frotis de sangre y aspirado
+
Citometría de Flujo (STAT)**

Leucemia aguda promielocítica

FISH: t(15;17)

PCR: PML-RARA
FISH: v-RARA
Cariotipo

**Leucemia mieloide aguda
(no promyelocítica)**

Cariotipo
FISH: 11q23, inv16
NGS: KIT, NPM1, FLT3-ITD, CEBPA

FISH: t(8;21), inv3/t(3;3),
t(6;9), t(1;22)
-5q, -7q, -20q, -17p

NGS: RUNX1, TET2, ASXL1,
DNMT3A, P53, MLL-PTD,
PHF6...

Leucemia T linfoblástica aguda

**Citometría de flujo
(cortical vs. precursor T temprano)**

NGS: NOTCH, FBXW7
DNMT3, IDH1/2,
RUNX1
K/N-RAS, PTEN

SNP array: del17p,
del9p21-22, LOH6q16,
DBA TCRG

Leucemia B linfoblástica aguda

**FISH: t(9;22), v-11q23,
t(12;21), t(1;19), CEP2,10,17**

FISH: del CDKN2A (?)
del IKZF1 (...)

SNP array

Perfil de expresión genética
(?).

