



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Predisposición Germinal en Pacientes Adultos  
Diagnosticados de Síndrome Mielodisplásico  
a una Edad Temprana sin Disfunción Orgánica  
Previa

**D.<sup>a</sup> Tzu Hua Chen Liang**

2021



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



**Predisposición Germinal en Pacientes Adultos  
Diagnosticados de Síndrome Mielodisplásico a una  
Edad Temprana sin Disfunción Orgánica Previa**

Memoria presentada por

**Tzu Hua Chen Liang**

Para optar al grado de

**Doctora en Medicina**

Tesis realizada bajo la dirección del **Dr. Andrés Jerez Cayuela**, el **Dr. Raúl Teruel Montoya** y la tutoría del **Dr. Andrés Jerez Cayuela**



# Agradecimientos



## Agradecimientos

Al profesor Vicente Vicente, por darme la oportunidad de ser parte del servicio y poder trabajar tanto en la clínica como en la investigación.

A mi tutor y director, Andrés Jerez por guiarme estos años, en el área de la investigación traslacional, por las palabras de aliento, la buena disponibilidad y el conocimiento que me ha dado desinteresadamente.

A mi director, Raúl Teruel por enseñarme nociones básicas de genómica y guiarme por el área de la investigación básica.

A todos los adjuntos del servicio de Hematología y Oncología (Francisco Ortuño, Felipe, Inmaculada, Mari Luz, María José, Vanessa, Francisca, Elena, Cristina, Marisa, Sonsoles, Pastora, María Dolores, Francisco Ayala, y muchos más), les debo un eterno agradecimiento por proporcionarme las herramientas básicas, pero fundamentales para cimentar mi formación en la clínica y en la investigación.

A Josefa Gálvez, Lola, Fernando y al equipo de ensayos clínicos por sus palabras amables de apoyo y ánimo.

A Ana Hurtado que me ha guiado en los primeros pasos por el laboratorio de la investigación básica.

A todos los compañeros del Centro Regional de Hemodonación, tanto en el área asistencial como en el área de la investigación; IPs, investigadores (predoctorales y posdoctorales) y técnicos, que, además, de ayudarme a resolver muchas de mis dudas e inquietudes, tanto en el laboratorio como a nivel académico, han hecho posible que todo el proceso de mi formación práctica, sea más amena.

A Salva, que, a pesar del corto tiempo compartido, ha podido reavivar nuevamente en mí, el ansia de saber y darle el sentido a las palabras, trabajo en equipo.

A Meu y Juan, por arroparme en su hogar y hacerme sentir como parte de su familia.

Y, por último, a mi familia, por su apoyo incondicional.

Gracias a todos.



**A MIS PADRES**



# Índice



# Índice

Abreviaturas .....	V
Lista de tablas y figuras .....	IX
Resumen .....	XVII
Introducción.....	1
1.1. SÍNDROME MIELODISPLÁSICO Y LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA .....	3
1.1.1. DEFINICIÓN .....	3
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA.....	3
1.1.3. PATOGENIA.....	4
1.1.4. CLÍNICA Y PRONÓSTICO .....	14
1.1.5. TRATAMIENTO .....	20
1.2. VARIANTES GERMINALES PREDISONENTES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICO.....	24
1.2.1. NEOPLASIAS MIELOIDES CON PREDISPOSICIÓN GERMINAL SIN DISFUNCIÓN ORGÁNICA NI ENFERMEDAD PREVIA.....	26
1.2.2. NEOPLASIAS MIELOIDES CON PREDISPOSICIÓN GERMINAL Y TRASTORNO PLAQUETAR PREVIO. ....	27
1.2.3. NEOPLASIAS MIELOIDES CON PREDISPOSICIÓN GERMINAL Y OTRAS ALTERACIONES ORGÁNICAS.....	28
1.2.3. IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL HALLAZGO DE UNA VARIANTE GERMINAL PREDISONENTE DE SMD .....	34
1.3. DETECCIÓN DE VARIANTES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA .....	38
1.4. INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES EN CÁNCER .....	45
1.4.1. SISTEMA DE REPARACIÓN DE ADN <i>MISMATCH</i> .....	45
1.4.2. ETIOLOGÍA DE LOS CÁNCERES MSI-H.....	47
1.4.3. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES Y EL DÉFICIT DEL SISTEMA <i>MISMATCH</i> .....	49
Hipótesis y objetivos.....	53
2.1. HIPÓTESIS.....	55
2.2. OBJETIVOS.....	56
Capítulo I: “Caracterización genómica mediante secuenciación de alto rendimiento de una cohorte nacional de pacientes adultos diagnosticados de SMD/LMMC a edad temprana sin disfunción orgánica previa” .....	59
3.1. INTRODUCCIÓN .....	61
3.2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS .....	62
3.3. RESULTADOS .....	70
3.3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DE LABORATORIO .....	70
3.3.2. VARIANTES GERMINALES .....	74
3.3.3. INTEGRACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS Y MOLECULARES .....	84
3.3.4. ASOCIACIONES ESPECÍFICAS GENOTIPO-FENOTIPO .....	98

<i>VARIANTES GERMINALES EN SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS CON SIDEROBLASTOS EN ANILLO</i>	98
<i>VARIANTES GERMINALES EN ERCC6L2</i>	101
<b>3.4. DISCUSIÓN</b>	108
<b>3.5. CONCLUSIONES</b>	116
<b>Capítulo II: “Variantes germinales en genes pertenecientes a la vía de reparación mismatch”</b>	119
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	121
<b>4.2. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS</b>	123
<b>4.3. RESULTADOS</b>	125
<b>4.3.1. VARIANTES GERMINALES EN LOS GENES DE LA VÍA DE REPARACIÓN DEL ADN DEL MISMATCH</b>	125
<b>4.3.2. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES EN LA COHORTE TOTAL</b>	127
<b>4.3.3. INTEGRACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y GENÓMICOS</b>	134
<b>4.4. DISCUSIÓN</b>	137
<b>4.5. CONCLUSIONES</b>	141
<b>Conclusiones generales</b>	143
<b>Referencias</b>	147
<b>Apéndice I: Producción científica en relación al trabajo de tesis</b>	177
<b>Apéndice II: Financiación del trabajo de tesis</b>	183
<b>Anexo I: Tablas suplementarias</b>	187
<b>Anexo II: Información suplementaria</b>	193

# Abreviaturas



<b>ACMG</b>	<i>The American College of Medical Genetics and Genomics</i>
<b>ADB</b>	Anemia de Diamond Blackfan
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEEs</b>	Agentes estimulantes de la eritropoyesis
<b>Alo-TPH</b>	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
<b>AMP</b>	<i>The Association of Molecular Pathology</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASC</b>	Anemia sideroblástica congénita
<b>CPSS</b>	<i>Chronic myelomonocytic leukemia Prognostic Scoring System</i>
<b>CNV</b>	<i>Copy number variations</i>
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>del(7q)</b>	Delección del brazo largo del cromosoma 7
<b>del(5q)</b>	Delección del brazo largo del cromosoma 5
<b>EBT</b>	Enfermedades de la biología de los telómeros
<b>FAB</b>	Franco-americano-británico
<b>G-CSF</b>	Factores estimulantes de colonias de granulocitos
<b>GESMD</b>	Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos
<b>Indels</b>	Inserciones y deleciones de bases de ADN
<b>IPSS-R</b>	<i>International Prognostic Score System Revised</i>
<b>LMA</b>	Leucemia mieloblástica aguda
<b>LMMC</b>	Leucemia mielomonocítica crónica
<b>LMMC-MD</b>	Variante mielodisplásica de la LMMC
<b>LMMC-MP</b>	Variante mieloproliferativa de la LMMC
<b>LMMJ</b>	Leucemia mielomonocítica juvenil
<b>LMC</b>	Leucemia mieloide crónica
<b>LLA</b>	Leucemia linfoblástica aguda
<b>LP</b>	Variante probablemente patogénica
<b>MMR</b>	Vía del <i>mismatch</i> de la reparación del ADN
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>NCCN</b>	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>NMPc</b>	Neoplasia mieloproliferativa crónica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>P</b>	Variante patogénica

<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión a LMA
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SMD-DU</b>	SMD con displasia unilínea
<b>SMD-DM</b>	SMD con displasia multilínea
<b>SMD-SA</b>	SMD con sideroblastos en anillo
<b>SMD-EB</b>	SMD con exceso de blastos
<b>SMD/NMP</b>	Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas
<b>SNV</b>	<i>Single nucleotide variant</i>
<b>SP</b>	Sangre periférica
<b>SSD</b>	Síndrome de Shwachman-Diamond
<b>VUS</b>	Variante de significado incierto
<b>WES</b>	<i>Whole exome sequencing</i>

# **Lista de tablas y figuras**



## Lista de tablas

Tabla 1. Grupos pronósticos dentro de la categoría citogenética según IPSS-R. Adaptada de Greenberg et. al., Blood 2012. <sup>16</sup> .....	5
Tabla 2. Grupos pronósticos dentro de la categoría citogenética según CPSS. Adaptado de Such et.al., Blood 2013. <sup>69</sup> .....	13
Tabla 3. Genes recurrentemente mutados de manera adquirida en la LMMC. Adaptada de Palomo et.al., American Journal of Hematology. <sup>73</sup> .....	13
Tabla 4. Criterios diagnósticos de los SMD, según los hallazgos morfológicos en SP y MO y las alteraciones citogenéticas por cariotipo convencional. Adaptada de Arber et al., Blood, 2016. <sup>3</sup> .....	15
Tabla 5. Asignación de puntos según las variables pronósticas incluidas en el IPSS. Adaptada de Greenberg, et.al., Blood 1997. <sup>79</sup> .....	16
Tabla 6. Grupos de riesgo pronóstico y su supervivencia media según el IPSS en función de los puntos obtenidos. Adaptada de Greenberg, et.al., Blood 1997. <sup>79</sup> .....	16
Tabla 7. Asignación de puntos según las variables pronósticas incluidas en el IPSS-R. Adaptado de Greenberg et.al.,Blood 2012. <sup>80</sup> .....	17
Tabla 8. Grupos de riesgo pronóstico, la supervivencia mediana sin tratamiento y el tiempo hasta que el 25% de los pacientes de ese grupo desarrollan LMA, según el IPSS-R, en función de los puntos obtenidos. Adaptado de Greenberg et.al.,Blood 2012. <sup>80</sup> .....	17
Tabla 9. Criterios diagnósticos de la LMMC, según los hallazgos morfológicos en sangre periférica y médula ósea y las alteraciones citogenéticas por cariotipo convencional. Adaptada de Arber et al., Blood, 2016. <sup>3</sup> .....	18
Tabla 10. Asignación de puntos en función de las variables incluidas en la escala CPSS. Adaptado de Such et.al., Blood 2013. <sup>69</sup> .....	19
Tabla 11. Fenotipo clínico de alteraciones germinales destacadas.....	26
Tabla 12. Genes principales con predisposición a desarrollar neoplasia mieloide y/o linfoide. Adaptada de Abhishek et.al., Mayo Clinic Proceeding 2020. <sup>186</sup> .....	33
Tabla 13. Centros participantes del GESMD.....	63
Tabla 14. Variables demográficas, clínicas y de laboratorio. ....	64
Tabla 15. Características principales al diagnóstico de la cohorte total (N=194) y agrupadas en función del diagnóstico de SMD o LMMC. ....	70
Tabla 16. Antecedentes personales y familiares de la cohorte total (N=194) y agrupadas en función del diagnóstico de SMD o LMMC. ....	71
Tabla 17. Datos de los tratamientos recibidos en la cohorte total (N=194). ....	72
Tabla 18. Tratamiento con factores de crecimiento en la cohorte total (N=194). ....	72
Tabla 19. Datos del alo-TPH de la cohorte total (N=194). ....	73
Tabla 20. Datos de progresión a LMA y situación en último seguimiento de la cohorte total (N=194) .....	74
Tabla 21. Características generales y evolutivas de los pacientes portadores de variante germinal LP/P en los genes considerados, según la evidencia actual, como propios de adultos en edad temprana sin alteración preexistente. ....	77
Tabla 22. Características generales y evolutivas de los pacientes portadores de variante germinal VUS en los genes considerados, según la evidencia actual, como propios de adultos en edad temprana sin alteración preexistente. ....	82

Tabla 23. Comparación de las características al diagnóstico de los pacientes con y sin variantes germinales categorizadas como LP/P.....	85
Tabla 24. Comparación de los pacientes con y sin variantes germinales categorizadas como LP y/o P en relación a la evolución de la enfermedad.....	86
Tabla 25. Comparación de las características al diagnóstico de los pacientes con y sin variantes germinales de la vía de reparación del ADN (DDR <sup>GERM</sup> ) categorizadas como LP y/o P. ....	88
Tabla 26. Comparación de los pacientes con y sin variantes germinales de la vía del DDR categorizadas como LP y/o P en relación de la evolución.....	89
Tabla 27. Análisis Cox multivariante de los factores de riesgo de progresión a LMA en la cohorte global, incluyendo la variable DDR <sup>GERM</sup> LP/P y otras que en el univariante obtuvieron una p<0,150.....	90
Tabla 28. Análisis Cox multivariante de los factores de riesgo de SG en la cohorte global, incluyendo la variable DDR <sup>GERM</sup> LP/P y otras que en el univariante obtuvieron una p<0,150. ....	90
Tabla 29. Regresión multivariante de Cox incluyendo la presencia de variante DDR <sup>GERM</sup> LP/P y el IPSS-R dicotomizado para el análisis de SLP y SG.....	92
Tabla 30. Comparación de las variables al diagnóstico entre los pacientes portadores de variante DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup> y resto de los pacientes (A vs. B) y entre los pacientes portadores de variante DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup> y los pacientes sólo con TP53 <sup>SOM</sup> (A vs. C).....	93
Tabla 31. Comparación de los eventos en la evolución entre los pacientes portadores de variante DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup> y el resto de los pacientes (A vs. B) y entre los pacientes portadores de variante DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup> y los pacientes sólo con TP53 <sup>SOM</sup> (A vs. C).....	94
Tabla 32. Análisis Cox multivariante en la cohorte global para la SLP, con la inclusión de la variable DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup> .....	94
Tabla 33. Análisis de Cox multivariante en la cohorte global para la SG, con la inclusión de la variable DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup> .....	95
Tabla 34. Regresión multivariante de Cox incluyendo la presencia de variante DDR <sup>GERM</sup> LP/P+TP53 <sup>SOM</sup> y IPSS-R para análisis de SLP y SG.....	96
Tabla 35. Características de los 22 pacientes portadores de una variante adquirida en <i>SF3B1</i> .....	99
Tabla 36. Características de los 25 pacientes con ≥1% de sideroblastos en anillo en médula ósea (mediana de 17%, RIQ 5-28%) y sin variantes adquiridas en <i>SF3B1</i> .....	100
Tabla 37. Casos dentro de la cohorte total que presentaban variante germinal LP/P/VUS en genes causantes de ASC.....	101
Tabla 38. Casos dentro de la cohorte total que presentaban variante germinal VUS/P en el gen <i>ERCC6L2</i> .....	102
Tabla 39. Comparación de las variables al diagnóstico entre los pacientes portadores de variante <i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup> VUS/P y el resto de los pacientes. ....	103
Tabla 40. Comparación de los pacientes con y sin variantes germinales <i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup> VUS/P en relación de la evolución. ....	104
Tabla 41. Análisis Cox multivariante en la cohorte global para el SLP, con la inclusión de la variable <i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup> VUS/P.....	106
Tabla 42. Análisis de Cox multivariante en la cohorte global para la SG, con la inclusión de la variable <i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup> VUS/P.....	107
Tabla 43. Comparación mediante el análisis multivariante de regresión de Cox de las variables, presencia de variante <i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup> VUS/P y IPSS-R dicotomizado en relación al SLP y SG. ....	107

Tabla 44. Características de los marcadores del <i>MSI analysis system, version 1.2</i> . (PROMEGA®, Madison, WI, EEUU) .....	123
Tabla 45. Características de las variantes germinales de la vía del MMR halladas en los exomas. 126	
Tabla 46. Comparación de las características al diagnóstico de los pacientes con y sin variantes germinales MMR <sup>GERM</sup> .....	135
Tabla 47. Comparación de los pacientes con y sin variantes MMR <sup>GERM</sup> en relación a la evolución de la enfermedad.....	136

## Lista de figuras

Figura 1. Incidencia de las alteraciones citogenéticas más comunes en los síndromes mielodisplásicos. Adaptado de Raza y Galili, 2012. <sup>15</sup> .....	5
Figura 2. Principales mutaciones somáticas en SMD. Adaptado de Ogawa et.al., Blood 2019 y de Saygin y Godley, Cancers, 2021. <sup>38,39</sup> .....	9
Figura 3. Tipos de secuenciación de nueva generación (NGS).....	39
Figura 4. Flujo de trabajo en WES: pasos en el análisis de los datos obtenidos de la secuenciación del exoma completo.....	40
Figura 5. Sistema de reparación del <i>mismatch</i> del ADN. Adaptada de Hsieh, P. y Zhang, Z., Proc Natl Acad Sci USA, 2017. <sup>241</sup> .....	46
Figura 6. Perfil de variantes germinales LP y P detectadas mediante WES (n=54) .....	75
Figura 7. Frecuencia de pacientes con variantes germinales categorizadas como LP y/o P, según la clasificación ACMG/AMP, agrupadas según vía o función (n=54). .....	76
Figura 8. Distribución de variantes somáticas en pacientes portadores de las variantes germinales categorizadas como LP y/o P. ....	78
Figura 9. Coocurrencia, por grupos funcionales de genes, de variantes germinales y somáticas. A la izquierda, se incluyen variantes germinales VUS/LP/P. A la derecha, el análisis queda las variantes LP/P.....	79
Figura 10. Genes afectados por dos o más variantes categorizadas como VUS en la total de la cohorte total.....	80
Figura 11. Frecuencia de pacientes con variantes germinales categorizadas como VUS, agrupadas según vía o función. ....	81
Figura 12. Distribución de las variantes somáticas en pacientes portadores de variantes germinales categorizadas como VUS.....	83
Figura 13. Coocurrencia, por grupos funcionales de genes, de variantes germinales y somáticas. A la izquierda, se destacan variantes germinales VUS/LP/P. A la derecha, se destacan sólo las variantes germinales categorizadas como VUS.....	84
Figura 14. Kaplan-Meier de los pacientes con variantes germinales categorizadas como LP/P (n=54) vs. el resto de los pacientes (n=140). a) SG; b) SG censurando el seguimiento en la fecha de la infusión de progenitores en aquellos pacientes sometidos a alo-TPH. ....	87
Figura 15. Kaplan-Meier de la SLP (a) y SG (b) censurado a fecha del alo-TPH de los pacientes con y sin variantes DDR <sup>GERM</sup> LP/P. ....	91

Figura 16. Kaplan Meier de la SLP (a) y SG (b) censurado a fecha del alo-TPH de los pacientes con variantes $DDR^{GERM} LP/P+TP53^{SOM}$ , con variantes $TP53^{SOM}$ sin $DDR^{GERM} LP/P$ y resto de los pacientes. ....	97
Figura 17. Presencia de variante $TP53$ multi-hit vs. uni-hit en pacientes con o sin variante $DDR^{GERM} LP/P$ . ....	97
Figura 18. Resumen esquemático de las variantes germinales en $ERCC6L2$ VUS/P del estudio en relación con el sitio funcional de la proteína .....	101
Figura 19. Representación del porcentaje de los pacientes con monosomía y/o deleción del brazo largo del cromosoma 7 entre los portadores de variante germinal $ERCC6L2$ VUS/P y el resto de la cohorte. ....	105
Figura 20. Kaplan-Meier de la SLP (a) y SG (b) censurado a fecha del alo-TPH de los pacientes con variantes $ERCC6L2$ VUS/P y resto de los pacientes. ....	105
Figura 21. Resumen esquemático de las variantes MMR del estudio en relación con el sitio funcional de la proteína.....	125
Figura 22. Electroferogramas aberrantes en el estudio de inestabilidad de microsatélites para el caso de VJ142.....	128
Figura 23. A) Electroferogramas del microsatélite NR-21 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en la paciente VJ48. ....	129
Figura 24. Electroferogramas del microsatélite NR-21 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en la paciente VJ1. ....	130
Figura 25. Electroferogramas del microsatélite BAT-25 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en la paciente VJ44. ....	131
Figura 26. Electroferogramas del microsatélite BAT-25 y NR-21 alterados tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en los pacientes VJ194 y VJ197, respectivamente. ....	132
Figura 27. Electroferogramas del microsatélite BAT-25 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en los pacientes VJ216, VJ106 y VJ13. Microsatélite NR-21 alterado tanto en el tejido germinal como tumoral del paciente VJ137.....	134





# Resumen



Durante la última década se han llevado a cabo estudios genómicos a gran escala que han descrito el panorama de las variantes genómicas de buena parte de los tipos de cáncer más relevantes, incluyendo la presencia de variantes germinales potencialmente predisponentes. Por ello, la 4<sup>ta</sup> revisión de la clasificación de la OMS de los tumores de los tejidos linfoides y hematopoyéticos de 2016 incluyó una nueva categoría: neoplasias mieloides con predisposición germinal. Esta nueva categoría considera tres grupos principales: i) las neoplasias mieloides con predisposición germinal sin enfermedad o alteración orgánica previa, ii) con trastorno plaquetar previo, iii) asociadas con síndromes de fallo medular congénito y/o las enfermedades de la biología de los telómeros.

En este trabajo, nos centramos en el primero de los grupos, en el que, a la fecha de la publicación de la clasificación de la OMS, sólo estaba incluido un gen predisponente a síndrome mielodisplásico (SMD), *DDX41*. Se incluyeron 194 casos de SMD, entre 2014 y junio de 2021, procedentes de 28 centros, hospitales e institutos de investigación integrantes del Grupo Español de SMD, en los que se realizó secuenciación exómica pareada de tejido tumoral-germinal. Se seleccionaron aquellas variantes que pertenecieran a una lista de candidatos a genes predisponentes, en función de que hubieran sido descritos como predisponentes a neoplasia hematológica o tumor sólido, que pertenecieran a la vía de reparación del ADN, que hubieran sido descritos como mutados de manera recurrentemente en neoplasia mieloide. La lista resultante de variantes seleccionadas fue categorizada de acuerdo a los criterios de la Escuela Americana de Genética Clínica / Asociación de patólogos moleculares.

Cincuenta y cuatro pacientes de los 194 totales (27,8%) portaban, al menos, una variante germinal interpretada como patogénica y/o probablemente patogénica. Los grupos funcionales afectados pertenecen, fundamentalmente, a la vía de reparación del ADN destacando, además, su asociación con variantes adquiridas en *TP53* y su capacidad de predecir de manera independiente un pronóstico desfavorable. Además, describimos que un porcentaje significativo de los SMD con sideroblastos en anillo, sin variante adquirida en *SF3B1*, diagnosticados en edad adulta presentan variantes germinales en genes responsables de las anemias sideroblásticas congénitas, sugiriendo la penetrancia incompleta del daño causado por estas alteraciones. Hemos encontrado un número de casos relevante con baja inestabilidad de los microsatélites en tejido germinal. Estos casos presentaban variantes germinales en genes de la vía del *mismatch*,

pero también en otros genes de otras vías de la reparación del ADN. En resumen, si en edad pediátrica predominan las alteraciones germinales en genes de insuficiencia medular congénita y en edad avanzada las que afectan a *DDX41* y las de naturaleza somática, en nuestra cohorte de pacientes adultos diagnosticados de SMD a una edad temprana, sin disfunción orgánica previa, los grupos funcionales afectados pertenecen, fundamentalmente, a la vía de reparación del ADN, asociadas a un peor curso evolutivo.





# Introducción



## **1.1. Síndrome mielodisplásico y leucemia mielomonocítica crónica**

### **1.1.1. Definición**

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo de enfermedades hematológicas caracterizadas por una alteración clonal que afecta a la célula hematopoyética progenitora provocando citopenias y displasia celular uni-trilineal.<sup>1</sup>

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) es definida también como una hemopatía maligna clonal pero, a diferencia de los SMD, se caracteriza por la presencia de una monocitosis persistente mayor de  $1 \times 10^9/L$  y la presencia de un porcentaje de monocitos en sangre periférica superior o igual al 10%.<sup>2</sup> Esta entidad es considerada como una superposición de dos grupos de neoplasias hematológicas con características tanto mielodisplásicas como mieloproliferativas. Por ello, está incluida en el grupo de neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP) de la clasificación de la Organización Mundial de Salud (OMS).<sup>3</sup>

Ambas entidades comparten un mayor riesgo de desarrollar leucemia mieloblástica aguda (LMA), si bien un grupo relevante de los pacientes presentarán un curso clínico caracterizado por una insuficiencia medular progresiva con manifestaciones clínicas derivadas de las citopenias.<sup>4,5</sup>

### **1.1.2. Epidemiología y etiología**

Los SMD se diagnostican, habitualmente, de forma esporádica en adultos con una edad superior a 65 años. La incidencia aumenta con la edad, desde 10 por 100000 individuos al año en el rango de edad de 65 a 69 años, a 36,4 en los mayores de 85 años, según un registro de Estados Unidos.<sup>6,7</sup> Los SMD en niños son muy poco frecuentes, representando el 9% de todas las hemopatías pediátricas malignas.<sup>8</sup>

La LMMC es menos frecuente que los SMD, con una incidencia anual de 4 casos por millón en los países occidentales, con una mediana de edad al diagnóstico en torno a los 75 años y con un predominio del sexo masculino.<sup>9</sup> Existe en edad pediátrica

una neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa con monocitosis, la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), con características patogénicas específicas.<sup>10</sup>

De acuerdo con la etiología, tanto los SMD como la LMMC pueden ser divididos en:

- *de novo*: representan el 90% de los pacientes y no es posible identificar una exposición previa causante.
- secundarios o relacionados con la terapia: suponen el 10% de todos los casos. Se desencadenan tras tratamiento con quimioterapia o radioterapia y su incidencia se encuentra en aumento de manera paralela a la mayor supervivencia de los pacientes con cáncer tras tratamiento.<sup>11,12</sup>

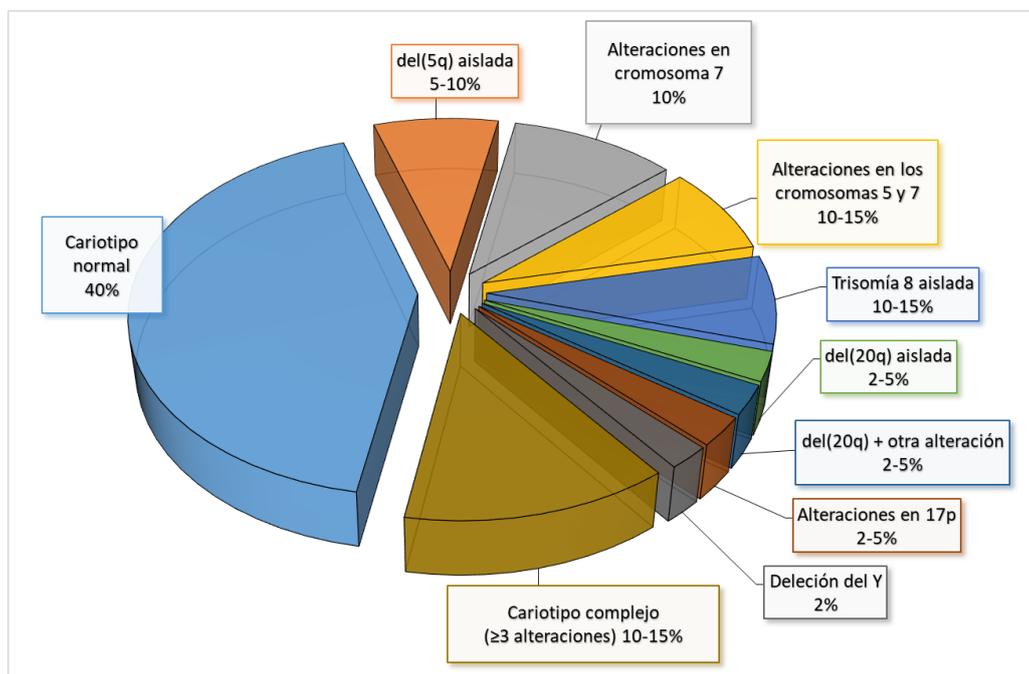
### **1.1.3. Patogenia**

Aunque la base patogénica no es del todo conocida, tanto en la LMMC como los SMD, la descripción de la presencia de alteraciones cromosómicas recurrentes, mutaciones genéticas y disregulación epigenética, explican gran parte de la presentación, del curso evolutivo y del potencial riesgo aumentado de desarrollar LMA.<sup>13</sup>

#### *Síndromes mielodisplásicos*

*Alteraciones citogenéticas más comunes en SMD.* Se pueden encontrar alteraciones citogenéticas en, aproximadamente, el 40-50% de los pacientes con SMD *de novo* y hasta en el 80% de los pacientes con SMD relacionado con quimio y/o radioterapia previa. A diferencia de lo que ocurre en la LMA, donde las alteraciones cromosómicas suelen ser equilibradas, los SMD se caracterizan por alteraciones que implican la pérdida o ganancia de material genético. Así, las alteraciones más frecuentes son la del(5q) en un 15% de los casos, -7/del(7q) en el 10%, +8 en un 8% y la del(20q) en un 5% de los casos.<sup>14</sup> Otras lesiones cromosómicas menos frecuentes pero recurrentes en los SMD quedan reflejadas en la figura 1.

**Figura 1.** Incidencia de las alteraciones citogenéticas más comunes en los síndromes mielodisplásicos. Adaptado de Raza y Galili, 2012.<sup>15</sup>



Estas anomalías cromosómicas pueden detectarse aisladas o bien junto a otras. Cuando coexisten tres o más alteraciones citogenéticas, nos encontramos con lo que se define como cariotipo complejo.<sup>15</sup> El número de alteraciones citogenéticas y sus características constituyen un factor pronóstico clave en los SMD. El índice pronóstico internacional en su versión revisada (IPSS-R, por sus siglas en inglés), estratifica la categoría pronóstica basada en los hallazgos citogenéticos en cinco grupos: muy bueno, bueno, intermedio, pobre y muy pobre (Tabla 1).<sup>16,17</sup>

**Tabla 1.** Grupos pronósticos dentro de la categoría citogenética según IPSS-R. Adaptada de Greenberg et. al., Blood 2012.<sup>16</sup>

CATEGORÍAS	ALTERACIONES CITOGENÉTICAS
Muy buena	-Y, del(11q)
Buena	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), dos alteraciones que incluye del(5q)
Intermedia	del(7q), +8, +19, i(17q), cualquier otra única o dos clones independientes
Pobre	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), doble que incluye 7/del(7q), complejo ( 3 alteraciones)
Muy pobre	Complejo (> 3 alteraciones)

El mecanismo preciso por el cual las distintas alteraciones citogenéticas contribuyen a la patogenia de los SMD no está completamente aclarado. Sin embargo, fenómenos como la haploinsuficiencia de uno o varios genes supresores de tumor se han descrito como responsable de la supervivencia del clon alterado dentro de una hematopoyesis normal, mientras que la misma alteración en otros genes con distintas funciones, dentro del mismo cromosoma deleciónado, pueden ser responsables del fenotipo clínico.<sup>18,19</sup> Resumimos, brevemente, los principales hallazgos patogénicos en relación a las dos alteraciones descritas con mayor frecuencia.

La deleción del brazo largo del cromosoma 5 es la alteración cromosómica más frecuente en los SMD, observándose en un 15% de los casos.<sup>20</sup> Tras el descubrimiento del cromosoma Filadelfia en la leucemia mieloide crónica (LMC), Van den Berghe describió la segunda relación estrecha entre fenotipo clínico y alteración genómica en neoplasia mieloide al publicar, en 1974, su trabajo sobre el Síndrome 5q-.<sup>21</sup> Este síndrome se define por la presencia de anemia macrocítica, cifra de plaquetas normal o elevada, presencia de megacariocitos monolobulados, menos de un 5% de blastos en médula ósea (MO) y la deleción aislada del 5q. La revisión de la clasificación de los SMD por la OMS en 2016 introdujo la posibilidad de que coexista otra alteración citogenética siempre y cuando esa lesión adicional no afecte al cromosoma 7.<sup>3</sup>

La región comúnmente deleciónada (5q32-5q33.1), determina la haploinsuficiencia de *RPS14*, que es la responsable de una menor expresión de una proteína estructural ribosomal, lo que ocasiona un bloqueo de la eritropoyesis. Además, se producen errores en el ensamblaje del complejo ribosomal, lo que termina provocando la liberación de proteínas ribosomales que se unen, inhibiendo, a un regulador negativo de p53. La activación de la transcripción de genes vía p53 acaba determinando un aumento de la apoptosis eritroide.<sup>22</sup>

El fenotipo clínico del Síndrome 5q- incluye dos características relacionadas con la serie plaquetar, los megacariocitos monolobulados y la presencia, en ocasiones, de trombocitosis. La haploinsuficiencia de los microARN miR-145 y miR-146a ha sido descrita relacionada con estas alteraciones.<sup>23</sup>

Recientemente, se ha descrito que otro gen situado en la región comúnmente delecionada, *CSNK1A1*, se encuentra inactivado completamente en algunos casos de Síndrome 5q-, al presentar una mutación adquirida en el alelo sano restante. Ello provoca la pérdida de la regulación negativa, a través de la vía de señalización Wnt/b-catenina, de la actividad de p53.<sup>24</sup>

La mutación adquirida en *TP53* es el evento encontrado con mayor frecuencia en asociación con la del(5q), en aproximadamente un 30% de los casos.<sup>25</sup> Esta asociación determina un riesgo aumentado de transformación leucémica, una menor respuesta a lenalidomida y una disminución de la supervivencia global (SG).<sup>26</sup> La mayoría de los reguladores negativos de p53 (p.ej., *PPP2CA*, *RPS14*, *CSNK1A1* and *G3BP1*) se localizan en el brazo largo del cromosoma 5 y puede que esta función inhibitoria se pierda al adquirir una del(5q) y se promueva la evolución a leucemia en estos casos con mutación del *TP53*.<sup>27</sup>

Utilizando un *array* de polimorfismo de nucleótido único (*SNP-A*, por sus siglas en inglés), se demostró que aquellos pacientes que presentaban deleciones que incluyeran a la región centromérica (desde el centrómero a la banda 5q14.2) y/o el extremo de la región telomérica (de la banda 5q34 al telómero) del cromosoma 5, tenían más probabilidad de presentar lesiones cromosómicas adicionales y un mayor riesgo de transformación leucémica.<sup>20</sup>

La deleción/monosomía del cromosoma 7 se encuentra presente en un 10% de los casos al diagnóstico de SMD y hasta en un 50% en los casos relacionados con tratamiento quimioterápico y/o radioterápico previo.<sup>28</sup> Además, se observa que la monosomía del 7 y la del(7q) confieren mal pronóstico en todos los casos.<sup>17</sup> Han sido identificadas varias regiones comúnmente delecionadas: 7q22, 7q34, y 7q35-q36, mediante cariotipado basado en *array* de SNP. Ubicado en la región 7q22, el gen *CUX1* actúa como supresor de tumores en las células mieloides, por lo que la presencia de una haploinsuficiencia en el cromosoma 7 de esta región, puede promover la proliferación clonal hematopoyética.<sup>29,30</sup> *LUC7L2* es otro gen que se encuentra también en la región comúnmente delecionada en la banda 7q34 y su deficiencia puede dar lugar a una alteración del *splicing* de los genes implicados en la diferenciación celular.<sup>31</sup> El gen *EZH2*, localizado en la banda 7q36, codifica una histona H3 metiltransferasa y es

miembro del complejo represivo polycomb 2 (PRC2, por sus siglas en inglés), que participa en la trimetilación de H3K27. En los SMD se observa, generalmente, una mutación inactivante de *EZH2*.<sup>32</sup>

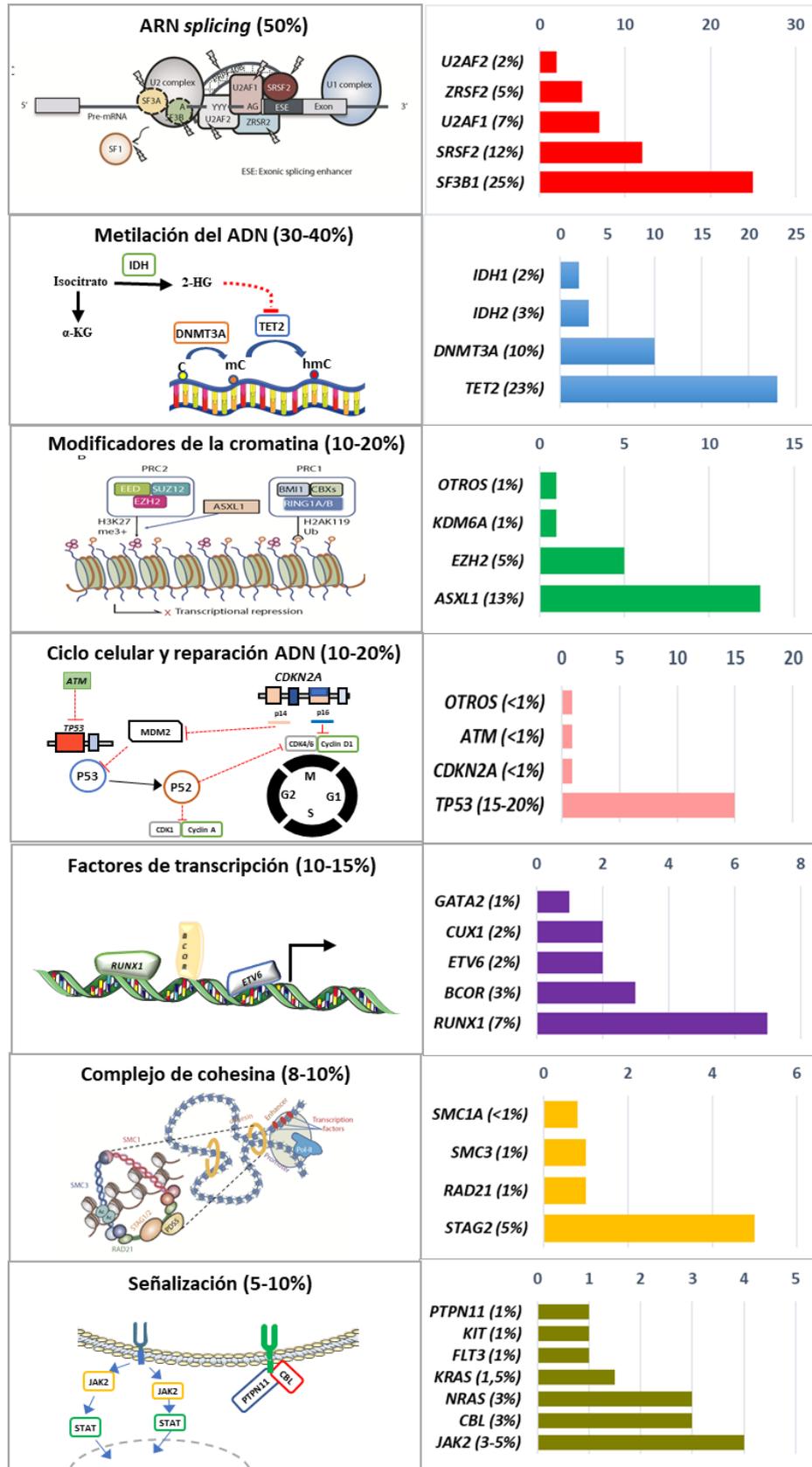
Otro gen localizado en la banda 7q21.2, y que se ha descrito recientemente implicado en la patogénesis de los SMD, es *SAMD9L*. Dicho gen está considerado como un gen supresor en la hematopoyesis, por lo que también se ha descrito en la génesis de los SMD en los casos de haploinsuficiencia de la región común.<sup>33</sup>

La trisomía aislada del cromosoma 8 ha sido clasificada dentro del grupo de riesgo intermedio y se presenta en un 5-7% de los casos, habiendo sido asociada a eventos que determinan una transformación secundaria del clon existente.<sup>34,35</sup> El mecanismo exacto por el que la trisomía del cromosoma 8 contribuye a la tumorigénesis mieloide sigue sin aclararse del todo, pero se ha comunicado que las células portadoras de esta alteración son más resistentes a la apoptosis.<sup>36</sup> Otras alteraciones comunes, como lesiones en el brazo largo del cromosoma 3, la presencia de un isocromosoma 17q, la trisomía del 21 o la del(20q) son menos frecuentes en los SMD.<sup>37</sup>

*Genes afectados, de manera recurrente, por variantes adquiridas en los SMD.* Actualmente, con la nueva tecnología de secuenciación masiva, han sido identificadas un promedio de nueve mutaciones somáticas iniciadoras (“*drivers*”) (Tabla 2) y secundarias por paciente, implicadas en la patogénesis de los SMD. El número de mutaciones varía según el subtipo, seis por exoma en bajo riesgo, nueve en SMD con exceso de blastos, doce en casos de LMMC y ocho en las neoplasias SMD/NMP clasificables.<sup>38</sup>

Las mutaciones somáticas implicadas en la patogénesis de los SMD se pueden clasificar en varios grupos funcionales, que mostramos en la figura 2.

**Figura 2.** Principales mutaciones somáticas en SMD. Adaptado de Ogawa et.al., Blood 2019 y de Saygin y Godley, Cancers, 2021.<sup>38,39</sup>



La metilación aberrante del ADN se asocia a un silenciamiento de genes, incluyendo a los supresores de tumores, los cuales cumplen un papel central en la patogenia del SMD. Mutaciones en modificadores epigenéticos como en los genes que codifican la ADN metiltransferasa 3A (*DNMT3A*) y la dioxigenasa TET metilcitosina 2 (*TET2*) han sido identificadas en el 8% y el 19% de los pacientes con SMD, respectivamente.<sup>40,41</sup>

El gen *DNMT3A* codifica una enzima implicada en la metilación de la citosina en los residuos CpG, y la mutación más común es aquella que interrumpe la traducción de la proteína en el codón R822 del dominio metiltransferasa. Las variantes adquiridas en *DNMT3A* se han asociado con un pronóstico desfavorable y un aumento de riesgo de la progresión a LMA.<sup>40</sup>

*TET2* cataliza la conversión de la 5-metil-citosina (5-mC) a hidroximetil-citosina (5-hmC) y promueve la demetilación del ADN.<sup>41</sup> La pérdida de función de *TET2* disminuye su capacidad catalítica, lo que determina una alteración del patrón de metilación del ADN y disminuye el nivel de 5-hmC en los SMD.<sup>42</sup>

*IDH1* e *IDH2* están mutados en alrededor del 5-10% de los casos de SMD y LMA.<sup>43,44</sup> Estos genes codifican la isocitrato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de isocitrato a  $\alpha$ -ketoglutarato ( $\alpha$ -KG), un mediador crucial en la vía aguas abajo de la metilación del ADN.<sup>45</sup> La mutación de *IDH* causa la pérdida de la actividad catalítica normal y produce la acumulación del oncometabolito, R-2-hidroxiglutarato (2-HG), que es capaz de actuar como antagonista del  $\alpha$ -KG, lo cual contribuye al desarrollo del fenotipo en los SMD.

La modificación de las histonas juega un papel fundamental en la remodelación de la cromatina y la expresión génica. *EZH2* codifica la subunidad catalítica del complejo PRC2, que contribuye a la compactación de la cromatina y cataliza la metilación de la histona H3K27. Se ha encontrado un 6% de mutaciones somáticas de *EZH2* en los SMD y es un factor independiente de mal pronóstico.<sup>46,47</sup> Además de *EZH2*, las mutaciones en *EED*, *JARID2*, y *SUZ1*, genes que codifican las otras subunidades del complejo PRC2, también pueden encontrarse en los SMD.<sup>48</sup> Las mutaciones con pérdida de la función de los componentes de este complejo están

implicadas en la patogénesis de las neoplasias mieloides, a través de la regulación a la baja de los genes claves de la hematopoyesis.<sup>49</sup>

*ASXL1* se encuentra mutado en el 11-14% de los casos de SMD y también es capaz de reclutar al complejo PRC2 para que ejerza su represión transcripcional mediante el aumento de la metilación de H3K27. La mayoría de las mutaciones en *ASXL1* ocurren en forma heterocigota en el exón 12, provocando mutaciones con cambio del marco de lectura o mutaciones sin sentido, con ganancia de función, que también predice un pronóstico desfavorable.<sup>50,51</sup>

Se han identificado mutaciones somáticas en genes de la maquinaria del *splicing* en el 50 al 89% de los casos de SMD, según las distintas series, habiéndose relacionado con el desarrollo de esta entidad.<sup>52,53</sup> Los genes comúnmente mutados del *splicing* son *SF3B1* (20–25%), *SRSF2* (10%), *U2AF1* (8%), y *ZRSR2*, que participan en la formación de la unidad U2 del complejo snRNP.<sup>54</sup> Excepto los casos que afectan al gen *ZRSR2*, el resto de las mutaciones adquiridas en los factores del *splicing* son heterocigotas y mutuamente excluyentes, sugiriendo que la alteración en la función de más de uno de estos genes es incompatible con la viabilidad celular.<sup>55</sup> Todas las mutaciones del *splicing* causan cambios amplios en el ARN, induciendo de 39 a 59 alternativas, provocando inclusiones de los intrones, y/o incluyendo o excluyendo exones.<sup>56</sup> Aunque resta todavía por aclarar muchas de las consecuencias patogénicas de las mutaciones en los genes del *splicing*, existen algunas que se encuentran mejor definidas. Por ejemplo, en el caso de la mutación en *SF3B1*, se promueve un sitio alternativo 3' de empalme en el gen *ABCB7* y otros genes implicados en el transporte mitocondrial del hierro, produciendo un truncamiento prematuro y reduciendo la expresión génica, lo cual causa la formación de sideroblastos en anillo.<sup>57</sup>

Otros posibles genes diana que pueden sufrir las alteraciones en su *splicing* incluyen a *MAP3K7*, *NF1*, y *PDS5A* cuando el factor del *splicing* mutado es *SF3B1* y *EZH2*, *CASP8*, *CDK10* cuando la mutación se adquiere en el gen *SRSF2*.<sup>57,58</sup>

La cohesina es un complejo proteico multimérico que comprende las proteínas RAD21, SMC1A, SMC3, y STAG (STAG1-3).<sup>59</sup> Formando una estructura parecida a un anillo, estas moléculas son capaces de unirse a la cromatina, junto a las llamadas

proteínas asociadas a la cohesina (NIPBL, ESCO y CTCF), participando en la regulación de la expresión génica. En un 10-15% de los casos de SMD y otras mielopatías malignas, se puede detectar la presencia de mutaciones en los genes de la cohesina y en las moléculas asociadas.<sup>60</sup> Las mutaciones en los genes de la cohesina son mutuamente excluyentes. Estudios recientes demostraron que las células deficientes en cohesina presentan estructuras de cromatina alteradas en las zonas de unión a los factores de transcripción, tales como *RUNX1*, *GATA2*, y *ER*, sugiriendo una posible interacción funcional de estos factores de transcripción con la cohesina.<sup>61</sup>

La mutación del gen supresor de tumores *TP53* se detecta en el 8 al 13% de los casos de SMD *de novo* y hasta en un 30% de los casos relacionados con terapia previa. La presencia de la mutación en *TP53* está fuertemente correlacionada con una supervivencia inferior, un mayor riesgo de transformación leucémica y una recaída temprana tras tratamiento, indicando una resistencia a los agentes quimioterápicos.<sup>62,63,64,65</sup>

Además, las mutaciones en *TP53* son significativamente más frecuentes en los casos de del(5q) que presentan resistencia a lenalidomida.<sup>66,67</sup> La del(5q) desempeña un papel importante en el aumento de la apoptosis mediada por p53 y también en la activación anormal de la vía de señalización Wnt/b-catenina y la inflamación.<sup>68</sup>

#### *Leucemia mielomonocítica crónica*

Generalmente, la citogenética es anormal en el 20 al 30% de los casos de LMMC, siendo las alteraciones más frecuentes la trisomía del 8, -7/del(7q) y la del(20q).<sup>69</sup> Los resultados del estudio citogenético se clasifican en tres grupos pronósticos según el índice pronóstico de LMMC (CPSS, por sus siglas en inglés), índice pronóstico específico para la LMMC establecido por el grupo español de síndromes mielodisplásicos (GESMD) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Grupos pronósticos dentro de la categoría citogenética según CPSS. Adaptado de Such et.al., Blood 2013.<sup>69</sup>

CATEGORÍA DE RIESGO	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA
Bajo	normal, -Y
Intermedio	otras alteraciones
Alto	+8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo

Se estima que cada caso de LMMC presenta, de media, 500 mutaciones adquiridas (sustituciones y pequeñas inserciones/deleciones) por genoma completo secuenciado, incluyendo unas 15 en secuencias codificantes (exomas), con dos de estas variantes localizadas en los 20 genes descritos como afectados de manera recurrente en esta entidad. Las mutaciones más frecuentemente encontradas, representando entre un 40-60% de las variantes, se localizan en los genes *ASXL1*, *TET2* y *SRSF2*.<sup>70,71</sup> Aunque ninguna de ellas es patognomónica, la asociación en un mismo paciente de mutaciones somáticas en *TET2/SRSF2* es muy sugerente del diagnóstico de LMMC.<sup>72</sup>

Además, es frecuente encontrar fenómenos de pérdida de heterocigosidad sin cambio en el número de copias (cnLOH, por sus siglas en inglés), especialmente en los genes supresores como *TET2* o *CBL*. La cnLOH está más frecuentemente asociada a la forma mieloproliferativa de la LMMC, donde se ha visto que otorga peor pronóstico.<sup>73</sup> Los principales genes con mutaciones somáticas en la LMMC se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Genes recurrentemente mutados de manera adquirida en la LMMC. Adaptada de Palomo et.al., American Journal of Hematology.<sup>73</sup>

VÍA/FUNCIÓN	GENES
Metilación del ADN	<i>DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2</i>
Modificadores de la cromatina y factores de transcripción	<i>EZH2, ASXL1, RUNX1</i>
ARN <i>splicing</i>	<i>SRSF2, U2AF1, SF3B1, ZRSR2</i>
Complejo de la cohesina	<i>STAG2, RAD21, SMC3, SMC1A (PDS5B, CTCF, NIPBL, ESCO2)</i>
Receptor de citoquinas/Vía de señalización RAS	<i>CBL, KRAS, NRAS, RIT, JAK2</i>

En comparación con las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NPMc) y los SMD, en la LMMC se observa un mayor porcentaje dentro del compartimento más inmaduro (CD34+/CD38-) de células portadoras de la alteración clonal.<sup>74</sup> Además, se ha detectado que el predominio del fenotipo mieloproliferativo se relaciona con la presencia de mutación en genes pertenecientes a la vía RAS y la presencia de mutaciones en *TET2* que ocasionan un desajuste en el equilibrio de las citocinas y el nicho celular favoreciendo un entorno pro-inflamatorio.<sup>75,76</sup>

#### **1.1.4. Clínica y pronóstico**

*Diagnóstico y pronóstico de los SMD.* En la última versión de criterios diagnósticos de los SMD en la clasificación de la OMS 2016, se ha incluido la mutación en *SF3B1* como diagnóstica de SMD con sideroblastos en anillo, si estos representan entre el 5 y 15% de los eritroblastos. El resto de categorías mantuvieron los criterios diagnósticos fundamentales de las revisiones previas (Tabla 4).<sup>77</sup>

**Tabla 4.** Criterios diagnósticos de los SMD, según los hallazgos morfológicos en SP y MO y las alteraciones citogenéticas por cariotipo convencional. Adaptada de Arber et al., Blood, 2016.<sup>3</sup>

NOMBRE	Nº LÍNEAS DE DISPLASIA	CITOPENIAS*	% SA/ RECUENTO ERITROIDE MEDULAR	BLASTOS EN SP Y MO	CITOGÉNÉTICA POR CARIOTIPO CONVENCIONAL
<b>SMD-DU</b>	1	1 o 2	<15%/<5% $\ddagger$	MO<5%, SP<1%, no bastones de Auer	Cualquiera, excepto que cumpla criterio de SMD con del(5q) aislada
<b>SMD-DM</b>	2 o 3	1-3	<15%/<5% $\ddagger$	MO<5%, SP<1%, no bastones de Auer	Cualquiera, excepto que cumpla criterio de SMD con del(5q) aislada
<b>SMD-SA</b>					
<b>SMD-SA-DU</b>	1	1 o 2	$\geq$ 15%/ $\geq$ 5% $\ddagger$	MO<5%, SP<1%, no bastones de Auer	Cualquiera, excepto que cumpla criterio de SMD con del(5q) aislada
<b>SMD-SA-DM</b>	2 o 3	1-3	$\geq$ 15%/ $\geq$ 5% $\ddagger$	MO<5%, SP<1%, no bastones de Auer	Cualquiera, excepto que cumpla criterio de SMD con del(5q) aislada
<b>SMD con del(5q) aislada</b>	1-3	1-2	Cualquier valor	MO<5%, SP<1%, no bastones de Auer	Del(5q) aislada o con 1 adicional, excepto -7 o del(7q)
<b>SMD-EB</b>					
<b>SMD-EB-1</b>	0-1	1-3	Cualquier valor	MO 5-9% o SP 2-4%, no bastones de Auer	Cualquiera
<b>SMD-EB-2</b>	0-1	1-3	Cualquier valor	MO 10-19% o SP 5-19%, no bastones de Auer	Cualquiera
<b>SMD-I</b>					
<b>Con 1% de blastos en SP</b>	1-3	1-3	Cualquier valor	MO <5% o SP =1% $\ddagger$ , no bastones de Auer	Cualquiera
<b>Con displasia unilínea y pancitopenia</b>	1	3	Cualquier valor	MO <5% o SP <1%, no bastones de Auer	Cualquiera
<b>Basada en citogenética alterada</b>	0	1-3	<15%	MO <5% o SP <1%, no bastones de Auer	Alteraciones definitivas de SMD
<b>Citopenia refractaria de la infancia</b>	1-3	1-3	Ninguno	MO <5% o SP <2%	Cualquiera

\*Citopenia se define como: Hemoglobina <10g/dl, contejo de plaquetas <100 x10<sup>9</sup>/L, contejo absoluto de neutrófilos <1,8 x10<sup>9</sup>/L. Monocitos en SP <1 x10<sup>9</sup>/L.  $\ddagger$ Si la mutación de *SF3B1* está presente.  $\ddagger$ El contejo de 1% de blastos deberá ser realizada en 2 ocasiones separadas.

**Abreviaturas:** SMD-DU, SMD con displasia unilínea; SMD-DM, SMD con displasia multilínea; SMD-SA, SMD con sideroblastos en anillo; SMD-EB-1, SMD con exceso de blastos tipo 1; SMD-EB-2, SMD con exceso de blastos tipo 2; SMD-I, SMD inclasificable.

Las manifestaciones clínicas de los SMD son variables y proporcionales, en la mayoría de los casos, a la profundidad de las citopenias, especialmente al grado de anemia, la citopenia más frecuente. Debido a lo anterior, los síntomas o signos más frecuentes son la astenia que puede ser agravada por las comorbilidades cardiopulmonares existentes. Además, debido a la trombopenia o la neutropenia, se pueden producir sangrados o infecciones recurrentes, respectivamente.<sup>52</sup>

En ocasiones, los pacientes pueden presentar manifestaciones extrahematológicas, como cuadros autoinmunes hasta un 28% de los casos, siendo la asociación más frecuente, la descrita con el hipotiroidismo autoinmune. Las otras entidades más frecuentes son la trombocitopenia inmune, la artritis reumatoide y la psoriasis.<sup>78</sup>

Existen, actualmente, varios sistemas de clasificación pronóstica, pero los dos más utilizados tanto en investigación como en el manejo clínico habitual, son el índice pronóstico internacional (IPSS, por su siglas en inglés)<sup>79</sup> y su revisión revisada, el IPSS-R<sup>80</sup> (Tabla 5-8).

**Tabla 5.** Asignación de puntos según las variables pronósticas incluidas en el IPSS. Adaptada de Greenberg, et.al., Blood 1997.<sup>79</sup>

VARIABLES	PUNTOS				
	0	0,5	1	1,5	2
<b>Blastos en MO (%)</b>	<5%	5-10%	---	11-20%	21-30%
<b>Citogenética convencional</b>	Normal, del(5q), del(20q)	Otras alteraciones	3 o más alteraciones, alteraciones del cromosoma 7	---	---
<b>Número de Citopenias</b>	Ninguna o 1	2 o 3	---	---	---

**Tabla 6.** Grupos de riesgo pronóstico y su supervivencia media según el IPSS en función de los puntos obtenidos. Adaptada de Greenberg, et.al., Blood 1997.<sup>79</sup>

PUNTOS TOTALES	GRUPO DE RIESGO	SUPERVIVENCIA MEDIA (AÑOS)
<b>0</b>	Bajo	9,4
<b>0,5 – 1</b>	Intermedio-1	3,3
<b>1,5 – 2</b>	Intermedio-2	1,1
<b>≥2,5</b>	Alto	0,2

**Tabla 7.** Asignación de puntos según las variables pronósticas incluidas en el IPSS-R. Adaptado de Greenberg et.al.,Blood 2012.<sup>80</sup>

VARIABLES	PUNTOS						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
<b>Blastos en MO (%)</b>	≤2%		>2%-<5%		5-10%	>10%	
<b>Citogenética convencional</b>	Muy buena		Buena		Intermedia	Pobre	Muy pobre
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	≥10		8 – 10	<8			
<b>Plaquetas (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	≥100	50 - <100	<50				
<b>Neutrófilos (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	≥0,8	<0,8					

\***Citogenética convencional: Muy buena:** del(11q), -Y; **Buena:** 46XX, 46XY, del(5q), del(20q), del(12p), doble alteración incluyendo del(5q); **Pobre:** -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), doble alteración incluyendo -7/del(7q), cariotipo complejo (3 anomalías no relacionadas); **Muy pobre:** cariotipo complejo (>3 anomalías no relacionadas); **Intermedia:** +8, del(7q), i(17q), +19, resto de cariotipos no definidos como buenos o malos.

**Tabla 8.** Grupos de riesgo pronóstico, la supervivencia mediana sin tratamiento y el tiempo hasta que el 25% de los pacientes de ese grupo desarrollan LMA, según el IPSS-R, en función de los puntos obtenidos. Adaptado de Greenberg et.al.,Blood 2012.<sup>80</sup>

GRUPO DE RIESGO	PUNTOS TOTALES	Mediana de supervivencia sin tratamiento (años)	Tiempo hasta que 25% pacientes desarrollan LMA sin tratamiento (años)
<b>Muy bajo</b>	0 – 1,5	8,8	No se ha alcanzado
<b>Bajo</b>	2 – 3	5,5	10,8
<b>Intermedio</b>	3,5 – 4,5	3,0	3,2
<b>Alto</b>	5 – 6	1,5	1,4
<b>Muy alto</b>	>6	0,8	0,7

En la práctica clínica, estas escalas pronósticas definen la estrategia terapéutica dividiendo los pacientes en dos grupos pronósticos principales: bajo riesgo (IPSS bajo e intermedio-1 e IPSS-R menor o igual a 3,5 puntos) y de alto riesgo (IPSS Intermedio-2 y alto e IPSS-R Intermedio >3,5).

*Diagnóstico de LMMC.* En la nueva revisión de la clasificación de la OMS, los criterios diagnósticos de la LMMC presentan pocas diferencias con respecto a la versión previa (Tabla 9).<sup>3</sup>

**Tabla 9.** Criterios diagnósticos de la LMMC, según los hallazgos morfológicos en sangre periférica y médula ósea y las alteraciones citogenéticas por cariotipo convencional. Adaptada de Arber et al., Blood, 2016.<sup>3</sup>

CRITERIOS LMMC de OMS 2016
Persistencia de monocitosis en sangre periférica $\geq 1 \times 10^9/L$ . con conteo de monocitos $\geq 10\%$ del recuento de la serie blanca.
Sin criterio diagnóstico OMS para leucemia mieloide crónica <i>BCR-ABL1</i> positiva, mielofibrosis primaria, policitemia vera, trombocitemia esencial.
No evidencia de reordenamiento <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> o <i>FGFR1</i> o <i>PCMI-JAK2</i> (especialmente excluidos en caso de eosinofilia)
<20% de blastos en sangre periférica o médula ósea.
Displasia en 1 o más líneas mieloides. Si no presenta displasia mieloide o es mínima, se puede diagnosticar de LMMC si cumple los otros criterios, “o”
Presencia de una alteración clonal adquirida o genética molecular en células hematopoyéticas.
“O”
Monocitosis persistente, al menos, de 3 meses y
Exclusión de todas otras causas de monocitosis
Persistencia de monocitosis en sangre periférica $\geq 1 \times 10^9/L$ con conteo de monocitos $\geq 10\%$ del recuento de la serie blanca.

Las características clínicas son variables. Es más frecuente presentar anemia normocítica o macrocítica y trombocitopenia que neutropenia. La trombocitopenia puede ser de origen periférico por fenómenos de autoinmunidad asociados. Fuera del sistema hematopoyético, la mieloproliferación puede manifestarse en forma de esplenomegalia, aunque ocasionalmente puede aparecer lesiones cutáneas infiltrativas. Otras localizaciones en las que pueden aparecer zonas de mieloproliferación son el hígado, ganglios, o en exudados pleuro-pericárdicos.

Las alteraciones autoinmunes o inflamatorias pueden presentarse al diagnóstico o, en menor frecuencia, a lo largo del seguimiento. El espectro clínico del cuadro autoinmune puede incluir trombocitopenia o artritis seronegativa que, a diferencia de las asociadas a SMD, presentan una mayor frecuencia de vasculitis sistémica asociada.<sup>81</sup>

Estas alteraciones se tratan generalmente con corticoesteroides, aunque el uso de agentes hipometilantes ha mostrado cierto grado de eficacia en pacientes seleccionados.<sup>82</sup> Además, la mutación adquirida en *TET2* juega un papel importante en la regulación inmune, tanto en la innata como en la adaptativa, a través de la regulación de la función de los linfocitos T.<sup>83,84</sup>

La clasificación clásica del grupo franco-americano-británico (FAB) definía dos variantes de LMMC en función del recuento de leucocitos totales. Aquellos pacientes con leucocitos  $<13 \times 10^9/L$  se incluían en la variante mielodisplásica (LMMC-MD) y aquellos con  $\geq 13 \times 10^9/L$  en la variante mieloproliferativa (LMMC-MP). Estas categorías siguen se siguen estudiando por su potencial utilidad clínica, como marcador indirecto de un mayor beneficio de 5-azacitidina.<sup>85</sup>

La SG en series retrospectivas ha sido descrita de 24 a 36 meses, habiendo mejorado tras la introducción de los agentes hipometilantes y las mejoras en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH).<sup>86</sup> Durante el curso evolutivo de la enfermedad, existe un 25% de probabilidad de progresar a LMA, que suele ser refractaria al tratamiento estándar.

La escala CPSS, la más utilizada a nivel internacional, destaca por su buena capacidad pronóstica con el uso de un número limitado de variables que, además, son accesibles en la práctica clínica habitual (Tabla 10).<sup>69</sup>

**Tabla 10.** Asignación de puntos en función de las variables incluidas en la escala CPSS. Adaptado de Such et.al., Blood 2013.<sup>69</sup>

VARIABLE	PUNTOS		
	0	1	2
<b>Subtipo OMS</b>	LMMC-1	LMMC-2	---
<b>Subtipo FAB</b>	LMMC-MD	LMMC-MP	---
<b>Riesgo Citogenética*</b>	Bajo	Intermedio	Alto
<b>Dependencia transfusional±</b>	No	Si	---

±Dependencia transfusional se define como requerimiento de, al menos, 1 concentrado de hematíes cada 8 semanas en un periodo de 4 meses. \* Ver tabla 2.

**Subtipos OMS:** LMMC-1, blastos en SP $<5\%$  y MO $<10\%$ , incluidos los promonocitos; LMMC-2, blastos en SP 5-19% y MO 10-19%, incluidos los promonocitos, o cuando los bastones de Auer están presentes independientemente del conteo de blastos. **Subtipos FAB:** LMMC-MD, leucocitos  $<13 \times 10^9/L$ ; LMMC-MP, Leucocitos  $\geq 13 \times 10^9/L$ .

Según la suma de puntos obtenida, los pacientes se incluyen en uno de los 4 grupos pronósticos: bajo riesgo (0 puntos), intermedio-1 (1 punto), intermedio-2 (2-3 puntos) y alto (4-5 puntos); con una media de SG de 61, 31, 15 y 9 meses, respectivamente. Al igual que ocurre con los SMD, se suele dicotomizar los grupos del CPSS en riesgo bajo (bajo e intermedio-1) y alto (intermedio-2 y alto).

La escala CPSS no incluye los datos de mutaciones somáticas. El grupo francés de SMD/LMMC desarrolló un estudio pronóstico en el cual se incorporaba la presencia de mutaciones adquiridas en 19 oncogenes. La presencia de mutaciones de *ASXLI* mantuvo independencia pronóstica al ser comparada con otros factores, como el alto recuento de leucocitos en sangre periférica (SP), la presencia de anemia, trombocitopenia o una edad avanzada.<sup>70</sup> Actualmente, se ha actualizado la escala CPSS con datos moleculares, la CPSS-mol, y los autores identificaron la existencia de un peor pronóstico en los casos con mutación en los genes *ASXLI*, *RUNXI*, *NRAS* y *SETBP1*. A diferencia de la escala francesa, la escala CPSS-mol requiere del uso de secuenciación de nueva generación para el análisis completo, coste-efectivo y en un plazo de tiempo adecuado, de los genes incluidos.<sup>87</sup> Existen otras propuestas de escalas pronósticas que integran datos moleculares pero sin consenso, actualmente, acerca cual es la de elección.

### **1.1.5. Tratamiento**

*Síndromes mielodisplásicos.* El esquema terapéutico inicial se adapta según el grupo pronóstico (IPSS y/o IPSS-R), en función de si el paciente queda encuadrado en bajo o alto riesgo, y dependiendo de las comorbilidades del mismo. Sólo se contempla la posibilidad de un tratamiento curativo con el alo-TPH. Recomendado en menores de 65 años, aunque recientemente grupos como Koreth y colaboradores, proponen un alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida hasta los 70 años.<sup>88</sup>

#### **Bajo riesgo**

Inicialmente, en los pacientes asintomáticos se realiza un seguimiento sin requerimiento de un tratamiento modificador. Si aparece clínica relacionada con las citopenias se plantea tratamiento específico. Para la anemia se utiliza lenalidomida en caso de la presencia de una del(5q) aislada o agentes estimulantes de la eritropoyesis

(AEEs) en el resto de los casos. En el caso de refractariedad o pérdida de respuesta o clínica asociada a neutropenia o trombopenia, las posibilidades terapéuticas son muy escasas, con la participación en ensayos clínicos como la opción más interesante. Aunque todavía no está financiado su uso en España, una opción para estas anemias sintomáticas sería el Luspatercept, una proteína recombinante que se une a ligandos de la familia del factor transformante beta, incrementando la maduración eritroide en sus elementos más tardíos. Este agente ha demostrado una especial eficacia en el caso de la presencia de sideroblastos en anillo.<sup>89,90</sup> Además, algunas voces abogan por estrategias terapéuticas propias de los SMD de alto riesgo en casos de pacientes portadores de mutaciones adquiridas que otorguen una mayor agresividad, independiente del grupo de riesgo, como en el caso de *TP53*.<sup>91</sup>

Se estima que la respuesta eritroide a los AEEs (darbepoetina y eritropoyetina-alfa) es de entre el 40 al 60%.<sup>92</sup> Un estudio retrospectivo observó que la adición de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) al tratamiento con eritropoyetina, especialmente en los casos de SMD-SA, incrementaba la tasa de respuesta, con la posibilidad de aumentar la supervivencia.<sup>93,94</sup> Las variables de respuesta a AEEs validadas son los niveles endógenos de eritropoyetina <500U/L y el requerimiento de menos de 4 unidades de concentrados de hematíes en las últimas 8 semanas.<sup>95</sup>

#### Tratamiento de la anemia en Síndrome 5q-

Aunque el tratamiento inicial, en los casos sintomáticos, puede incluir el uso de AEEs, en los casos con niveles de eritropoyetina endógena elevada y/o un alto requerimiento transfusional, el tratamiento de elección es la lenalidomida, alcanzando un 56% de independencia transfusional y un 25-50% de respuestas citogenéticas.<sup>96,97</sup>

Hasta un 20% de los casos de SMD con del(5q) presentan una mutación adquirida en *TP53*, con una peor respuesta a lenalidomida, especialmente aquellos con una carga alélica >20% en la variante.<sup>98,99</sup> En los casos que pierden la respuesta a la lenalidomida, se debe evaluar la posibilidad de realizar alo-TPH, si el paciente cumple los requisitos.

Aunque no está incluido como categoría diagnóstica por la OMS, el SMD hipocelular (rasgos displásicos y/o alteraciones citogenéticas propias del SMD junto a una celularidad disminuida en biopsia ósea) podría beneficiarse del tratamiento inmunosupresor que está indicados en los casos de aplasia medular.<sup>100</sup>

La utilización de agonistas del receptor de la trombopoyetina (romiplostin y eltrombopag) ha demostrado mejoría del recuento de plaquetas y, en ocasiones, también una respuesta de las otras líneas hematopoyéticas. Aunque no hay un aumento significativo en la frecuencia de LMA en los estudios realizados, la aparición de nuevos clones con alteraciones citogenéticas y las progresiones observadas en casos con exceso de blastos, recomiendan cautela en el uso de estos fármacos en la actualidad.<sup>101,102,103</sup>

#### Alto riesgo

Los agentes hipometilantes (5-azacitidina y decitabina) son el único tratamiento aprobado hasta el momento para los pacientes de alto riesgo que no son candidatos para alo-TPH. En el estudio pivotal, el uso de azacitidina consiguió una mejora de la supervivencia de 9 meses, con un tiempo hasta la respuesta que podía alcanzar los seis ciclos, y una aceptable toxicidad.<sup>104</sup> Ya en este estudio inicial se comprobó que no todos los pacientes respondían. Se estima que la respuesta al tratamiento hipometilante es en torno al 40-50% de los pacientes. Los factores pronósticos que marcan una peor supervivencia son la presencia de blastos en SP, un ECOG elevado, una alta carga transfusional y la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo.<sup>105</sup>

En el caso de que el paciente sea candidato a trasplante por ausencia de comorbilidades limitantes, el tratamiento de elección es el alo-TPH. No hay consenso acerca de cuál es el tratamiento idóneo para reducir la carga tumoral previo al alo-TPH. En un estudio retrospectivo de Damaj y colaboradores, no encontraron diferencias significativas entre los pacientes que recibieron sólo azacitidina o sólo quimioterapia previo al alo-TPH, en cuanto a SG o supervivencia libre de evento.<sup>106</sup>

Actualmente, se investiga sobre el uso de nuevos agentes, la mayoría en combinación con hipometilantes, o el uso de nuevos hipometilantes. Dentro de este último grupo la guanecitadina, un dinucleótido de decitabina resistente a la acción de

citidina deaminasa, está siendo estudiada como fórmula oral para pacientes de edad avanzada.

Las combinaciones de azacitidina con lenalidomida o vorinostat no demostraron beneficio con respecto a la azacitidina en monoterapia.<sup>107</sup> La combinación de un inhibidor de bcl2, venetoclax, con azacitidina o bajas dosis de citarabina ha demostrado una tasa aceptable de respuestas en LMA y SMD de alto riesgo.<sup>108,109</sup> Otras moléculas que demostraron actividad en LMA y que están siendo exploradas en SMD son los inhibidores de IDH (enasidenib, ivosidenib), el inhibidor de la enzima activadora de *NEDD8* (pevonedistat) o CPX-351 (una formulación liposomal de citarabina y daunorubicina).<sup>110,111,112</sup>

En cuanto a la mutación de *TP53*, los agentes hipometilantes y, en especial, la decitabina han demostrado su eficacia, pero sin que esta sea duradera. Actualmente, existe un ensayo clínico en fase II explorando una molécula moduladora de la actividad transcripcional de *TP53*, llamada APR-246, que puede ser eficaz en los casos con variante adquirida en este gen.

*Leucemia mielomonocítica crónica.* Para el tratamiento de la LMMC, al igual que en los SMD, se categoriza en dos grupos según el riesgo pronóstico CPSS, bajo y alto.

#### Bajo riesgo

El tratamiento en este grupo es similar al de los SMD, con soporte transfusional y administración de factores de crecimiento en los pacientes sintomáticos, a excepción del grupo de pacientes con LMMC-MP, que requiere también citoreducción. La hidroxiurea es el citoreductor de elección, al haber demostrado una mayor eficacia en las comparaciones frente a otros agentes, como por ejemplo el etopósido.<sup>113</sup> Además, se recomienda el inicio de hipometilantes en los casos de LMMC-MP, si el recuento de blastos en SP es alto.<sup>114</sup>

#### Alto riesgo

En el estudio pivotal AZA-001 se incluyeron un número limitado de pacientes LMMC en los que la azacitidina también se mostró eficaz.<sup>115</sup> En estudios posteriores, se han validado esos hallazgos, tanto con azacitidina como decitabina.<sup>116,117</sup> Se identificaron varios factores predictivos, en pacientes con LMMC, de una supervivencia

más prolongada: una edad menor a 70 años, un riesgo citogenético bajo según las categorías del CPSS, la ausencia de blastos en SP y un nivel de hemoglobina alto. Además, el mismo grupo observó que en aquellos casos que alcanzaron remisión completa, esta era más duradera en los pacientes tratados con decitabina que con azacitidina.<sup>114</sup> Al igual que los casos de SMD, aquellos pacientes sin comorbilidades limitantes y una edad apropiada (algunos grupos ya lo recomiendan a pacientes con 70 años de edad) el tratamiento de elección sería el alo-TPH, sin que en este subgrupo este definida la estrategia de disminución de carga tumoral previa al alo-TPH con hipometilante o quimioterapia intensiva.<sup>118,119</sup>

## **1.2. Variantes germinales predisponentes de síndrome mielodisplásico**

Habitualmente, los SMD *de novo* se presentan en edades avanzadas, con una edad mediana al diagnóstico entre los 72 y 75 años, en el contexto de la adquisición de mutaciones somáticas durante el envejecimiento.<sup>120</sup> Los SMD que aparecen en niños o adultos jóvenes se asocian en prácticamente en todos los casos a una predisposición germinal.<sup>121</sup>

La primera descripción de la segregación dentro de una familia de una neoplasia hematológica data de 1861. Biermer, un discípulo de Virchow, describe el caso de una mujer sana con tres hijos, cada uno de los cuales presentaba esplenomegalia y había fallecido antes de los 3 años de edad. Esta mujer tuvo otros 4 niños en su segundo matrimonio, 3 de los cuales también desarrollaron esplenomegalia, incluyendo un caso que falleció por leucemia aguda documentada en la autopsia.<sup>122</sup> Durante la segunda mitad del siglo XX, el trabajo de los Drs. Lynch, Li, Fraumeni, King y sus grupos contribuyó a establecer las bases moleculares de los síndromes de cáncer hereditario, fundamentalmente en su versión sólida. Y, aunque la primera comunicación de Li y Fraumeni ya incluía dos casos de leucemia aguda, tuvimos que esperar hasta 1999 para que se identificara el primer síndrome hereditario de cáncer hematológico “puro”, relacionando el trastorno plaquetario previo y el posterior desarrollo de neoplasias mieloides o linfoides con la presencia de variantes germinales en *RUNX1*, un factor de

la transcripción clave en la hematopoyesis. A partir de entonces, el proyecto genoma humano y el desarrollo de la secuenciación masiva han sido las bases sobre las que los hallazgos se han acumulado en un corto periodo de tiempo.

Durante la última década se han llevado a cabo estudios genómicos a gran escala que han descrito el panorama de las variantes genómicas de buena parte de los tipos de cáncer más relevantes. El objetivo inicial y fundamental era aportarnos información pronóstica, diagnóstica y patogénica a partir de las alteraciones adquiridas detectadas. Sin embargo, la evaluación conjunta de tejido germinal en esos casos ha transformado la visión que teníamos sobre cómo las variantes heredadas influyen en el desarrollo del cáncer. Dentro de las neoplasias mieloides, en 2015 se estimó que del 5% al 10% de los pacientes con LMA portaban variantes germinales predisponentes a neoplasia mieloide.<sup>123</sup> En contextos concretos, como los adolescentes con SMD y monosomía del cromosoma 7, ese porcentaje podía llegar hasta el 70%.<sup>124</sup> Por ello, no era del todo inesperado que la 4<sup>ta</sup> revisión de la clasificación de la OMS de los tumores de los tejidos linfoides y hematopoyéticos de 2016 incluyera una nueva categoría: neoplasias mieloides con predisposición germinal (Tabla 11).<sup>125</sup>

**Tabla 11.** Fenotipo clínico de alteraciones germinales destacadas.

CATEGORÍA OMS 2016	GEN O VÍA	NEOPLASIA HEMATOLÓGICA	OTRAS CARACTERÍSTICAS	SÍNDROME
NMPG sin alteración orgánica o enfermedad previa	<i>DDX41</i>	SMD/LMA menos común linfoma	NO	SMD/LMA familiar
	<i>CEBPA</i>	LMA (SMD-EB??)	NO	SMD/LMA familiar
NMPG con trastorno plaquetar previo	<i>RUNX1</i>	LLA, menos frecuente SMD/LMA	Trombocitopenia y alteración función plaquetar	FPDMM
	<i>ETV6</i>	SMD/LMA		FPDMM
	<i>ANKRD26</i>	SMD/LMA		THC-2
NMPG con otras alteraciones orgánicas	<i>SAMD9</i>	SMD/LMA	Calcinosis normofosfatémica tumoral, hipoplasia adrenal congénita, enteropatía, alteraciones genitales	Sd. MIRAGE
	<i>SAMD9L</i>	SMD/LMA	Ataxia	Sd. Ataxia Pancitopenia
	<i>GATA2</i>	SMD/LMA	Linfedema, proteinosis pulmonar alveolar, hipoacusia congénita, inmunodeficiencia, infección micobacteriana	Sd. Emberger Sd. MonoMac
	<i>TP53</i>	LLA, hipodiploide, SMD/LMA relacionada con terapia	Osteosarcoma, cáncer de mama, de SNC, sarcoma de tejido blando, carcinoma adrenocortical	Li-Fraumeni
	<i>PTPN11, NFI, CBL</i>	LMMJ, menos frecuente LLA/LMA	Neurofibromas, rabdomiosarcoma embrionario, anomalías cardíacas, cutáneas, talla baja y facies dismórfica	Rasopatías
	<i>FANCs, RPSs, TERS</i>	SMD/LMA	Fenotipo amplio y variable	Sd. Fallo medular congénito

**Nota:** Los SAMs no están incluidos en la clasificación de la OMS 2016. **Abreviaturas:** FPDMM, por sus siglas en inglés, *familiar platelet disorder associated myeloid malignancy*; **THC-2**, por sus siglas en inglés, *autosomal dominant nonsyndromic thrombocytopenia-2*.

### 1.2.1. Neoplasias mieloides con predisposición germinal sin disfunción orgánica ni enfermedad previa.

Las LMA con mutaciones bialélicas en *CEBPA* constituyen un subtipo de buen pronóstico. En una de cada diez, la mutación de uno de los alelos es de naturaleza germinal, habitualmente truncante, en el extremo amino terminal.<sup>126</sup> La progresión a LMA se produce al adquirir otra mutación en el otro alelo. Lo que hace únicas a las *CEBPA* bialélicas es su clínica: sensibles a quimioterapia, cuando recaen lo hacen con otras mutaciones adquiridas e incluso el segundo “hit” adquirido en *CEBPA* es nuevo. No son recaídas, sino nuevas leucemias.<sup>127</sup>

*DDX41* es una ARN helicasa asociada al procesamiento de este ácido nucleico así como a la inmunidad antivírica, reconociendo el ARN vírico y desencadenando una cascada de señalización que termina en la producción de interferones tipo 1.<sup>128</sup> La pasada década se han descrito variantes somáticas y germinales en neoplasias mieloides

y, menos frecuentemente, en linfoides, sobre todo linfomas foliculares y de Hodgkin.<sup>129,130</sup> Este hallazgo sorprendente obligó a revisar sus funciones y se ha identificado su participación en procesos de *splicing*, biogénesis ribosomal y progresión a través del ciclo celular.<sup>129,131</sup>

A diferencia de la mayoría de casos de SMD con predisposición, los pacientes con *DDX41* debutan en edad adulta. De hecho, la primera familia descrita incluía al paciente *index* diagnosticado con 70 años, y su hermano e hija entre los 40 y 50 años.<sup>129</sup> Sabemos también que existe un predominio de casos de género masculino de 3:1.<sup>132</sup> Diversos estudios sugieren que, además, las variantes predisponentes dependen de la etnicidad, con la variante A500fs destacando en población asiática frente a la D150fs en occidente.<sup>133</sup> Además de la variante germinal predisponente, en su mayoría truncantes con desplazamiento en el marco de lectura, es frecuente la adquisición de una variante con cambio de sentido y pérdida de función en el alelo sano; de las que la más común es R525H. En pacientes con enfermedad agresiva, SMD con exceso de blastos (SMD-EB) o LMA, se ha descrito la aparición de mutaciones en *TP53*. Se debe tener en cuenta que numerosos portadores son silentes, de hecho es frecuente que no haya historia familiar, por lo que la penetrancia de la entidad no se conoce completamente.<sup>130</sup>

### **1.2.2. Neoplasias mieloides con predisposición germinal y trastorno plaquetar previo.**

*RUNX1*. Conocemos bien el potencial leucemógeno de sus alteraciones adquiridas, en forma de variantes puntuales o de translocaciones, tanto en adultos como en niños con leucemias agudas linfoblásticas o mieloblásticas y en SMD.<sup>134</sup> También nos constaba que sus variantes germinales definen una enfermedad plaquetar familiar, autosómica dominante y de penetrancia variable, con predisposición a desarrollar neoplasia mieloide. Esas variantes germinales en *RUNX1* producen proteínas que actúan como dominante negativos y que desencadenan neoplasia mieloide en el 44% de los portadores, casi siempre, en la edad adulta. En *RUNX1*, y en otros casos en los que el daño se produce por el efecto de la dominancia negativa, la proteína mutante se parece bastante a la normal, así que son peores las mutaciones con cambio de sentido que las truncantes.<sup>135</sup> La progresión a SMD/LMA se asocia a la adquisición de mutaciones somáticas en el alelo sano, en *GATA2* y/o, de manera menos frecuente, en otros genes

recurrentemente mutados en neoplasias mieloides, como *CBL*, *DNMT3A*, *KRAS* y *FLT3*.<sup>136137</sup>

*ETV6* y *ANKRD26*. Las plaquetas de los portadores de una variante germinal patogénica en *ETV6* pierden la forma alargada al ser comparadas con las de un control sano, reflejo de una alteración que también afecta a su función y se traduce en sangrados. Se han descrito asociadas a trombocitopenia congénita y riesgo de desarrollar tanto neoplasias mieloides como linfoides. La médula ósea suele ser hipocelular con dismegacariopoyesis, variable en el número de megacariocitos y eosinofilia. Las descripciones iniciales fueron con predisposición a leucemia linfoblástica aguda (LLA), pero ya en 2015 se describieron 3 familias portadoras en las que se desarrollaban SMD y LMA.<sup>138</sup> Las variantes germinales en la región regulatoria 5' de *ANKRD26*, un gen que codifica una proteína promotora del desarrollo del megacariocito, se ha descrito como causante de trombocitopenia familiar, con un 5% de casos desarrollando neoplasia mieloide, un 2% SMD.<sup>139</sup>

### **1.2.3. Neoplasias mieloides con predisposición germinal y otras alteraciones orgánicas**

*GATA2*. De entre las predisposiciones a SMD que repasamos en esta introducción, la relacionada con *GATA2* es, probablemente, la que puede producir un fenotipo clínico más amplio. Desde cuadros con monocitopenia/linfopenia, infecciones oportunistas y proteinosis pulmonar alveolar (Sd. MonoMAC) a casos con hipoacusia y linfedema (Sd. Emberger).<sup>140</sup> Aunque el desarrollo de SMD/LMA puede acompañar a estos síndromes, es mucho más frecuente que provoque fallo medular aislado en la edad pediátrica. Hasta un 15% de los SMD en niños se explican por la presencia de una variante germinal en *GATA2*.<sup>124</sup> Las más habituales son variantes con cambio de sentido, que afectan al segundo dedo de zinc de la proteína o bien truncantes que directamente hacen perder a la proteína su función. Sin embargo, se han descrito otros mecanismos para la predisposición por *GATA2*, algunos tan crípticos para las estrategias de secuenciación, filtrado y análisis más usadas en la práctica, como la presencia de variantes en el intrón 4, de alteraciones sinónimas que modifican el *splicing* o inserciones que mantienen el marco de lectura pero que separan espacialmente los dedos

de zinc de la proteína. La progresión a SMD/LMA se asocia a la adquisición de monosomía del 7, trisomía del 8 y/o a la adquisición de mutaciones en *ASXL1*.<sup>124</sup>

*SAMD9* y *SAMD9L*. Las variantes germinales en los *SAMs*, dos genes localizados en la banda 21 del cromosoma 7, se describieron inicialmente asociados a síndromes pediátricos multisistémicos que incluían, fundamentalmente, alteraciones endocrinas y neurológicas, así como la posibilidad de desarrollar SMD/LMA con monosomía del cromosoma 7.<sup>141,142</sup> Sin embargo, recientemente se ha encontrado que variantes germinales en estos genes pueden explicar casos aislados o familiares de SMD en niños y adolescentes sobre todo, pero también en adultos.<sup>143,144,145</sup> Muchos de estos casos sólo presentan la alteración medular, que también suele asociar la monosomía del 7. Como ocurre con *DDX41*, estos genes también se habían considerado involucrados en la respuesta antivírica.<sup>146</sup> Estudios recientes le otorgan un papel en la proliferación de la hematopoyesis donde las variantes germinales asociadas a SMD, la mayoría de cambio de sentido, provocarían un incremento en esa función.<sup>147</sup> Quizás el aspecto más llamativo de los SMD predispuestos por los *SAMs* es el fenómeno de escape clonal somático, también llamado reversión somática. La presión selectiva de la hematopoyesis para evitar la expresión del alelo con la variante germinal patogénica en los *SAMs* determina el fenotipo clínico del portador en función del mecanismo corrector. En aquellos casos en los que se impone eliminar el alelo portador a través de la delección del cromosoma 7, se acaba provocando un fallo medular más agresivo, sin duda debido a la haploinsuficiencia, intolerable desde el punto de vista de una hematopoyesis normal, de un gran número de genes localizados en el cromosoma delecionado.<sup>148</sup> Sin embargo, otros pacientes consiguen corregir de manera exitosa el alelo patogénico en los *SAMs* mediante la adquisición de una mutación somática con función opuesta en el alelo sano o bien mediante la sustitución del alelo enfermo con una duplicación del alelo sano (disomía uniparental).<sup>149,150</sup> El riesgo de desarrollar SMD/LMA parece mucho mayor en niños y adolescentes, con escasos pacientes diagnosticados en la edad adulta. Cuando el paciente progresa a enfermedad avanzada suele ser por la adquisición de mutaciones somáticas adicionales en genes recurrentemente mutados en neoplasias mieloides tanto de la edad pediátrica como de la adulta, incluyendo *SETBP1*, *RUNX1* o *ETV6*.<sup>150</sup>

*TP53*. Las alteraciones germinales en *TP53*, dan lugar al conocido como Sd. de Li-Fraumeni, caracterizado por un alto riesgo de tumores sólidos y hematológicos en la juventud. En cuanto a los tumores sólidos, se estima que a los 30 años, un 50% de los portadores germinales lo presentarán y, en cuanto a las neoplasias hematológicas, en hasta un 5% de los pacientes se diagnostica una LLA típicamente hipodiploides y, menos frecuentemente, LMA y LMC.<sup>151</sup> Di Nardo y colaboradores, publicaron las 7 familias con Li-Fraumeni y cáncer hematológico de su centro y, aunque la mayoría aparecían tras tratamiento quimioterápico por otros tumores, tanto las edades de debut (entre 28 y 50 años) como la latencia desde el tratamiento (apenas dos años) resultaban inusuales.<sup>152</sup>

*Asociados a genes responsables de síndromes de insuficiencia medular congénita*. Hace más de un siglo que el pediatra suizo, Guido Fanconi, describió una familia en la que tres de sus hijos presentaban alteraciones físicas similares. Conocida en la actualidad como anemia de Fanconi, esta enfermedad se caracteriza por inestabilidad genómica, hipersensibilidad a los fármacos que producen entrecruzamiento en las cadenas de ADN, y predisposición a fallo medular, neoplasias hematológicas y/o tumores sólidos.<sup>153</sup> En relación a las alteraciones físicas congénitas asociadas a la anemia de Fanconi, estas son numerosas, pero un 30% de los pacientes no presentan ninguna al nacimiento.<sup>154</sup> Las alteraciones hematológicas son variables e incluyen citopenias, macrocitosis, hipocelularidad medular con displasia moderada y fallo medular con riesgo aumentado de progresar a SMD y LMA. De hecho, la incidencia acumulada de sufrir un SMD a la edad de 50 años es del 40% y de un 20% en el caso de LMA.<sup>153</sup> Además, la incidencia y edad de la neoplasia hematológica va a depender de cuál de los genes causantes de la anemia de Fanconi es el afectado, con aquellos casos con mutaciones en *BRCA2* debutando, por debajo de los 5 años.<sup>155</sup>

Se han descrito, hasta la fecha, 23 genes cuyas mutaciones germinales pueden dar lugar a este síndrome. Estos genes están implicados en la reparación de ADN y clásicamente, el diagnóstico de anemia de Fanconi se ha basado en un incremento de la fragilidad de los cromosomas tras ser expuestos a mitomicina C o dietoxibutano.<sup>156</sup>

En el caso de los pacientes con anemia de Fanconi, es particularmente importante destacar la necesidad de utilizar regímenes de acondicionamiento de

intensidad reducida previo al alo-TPH, debido a la alta toxicidad en estos pacientes de la radioterapia y de los agentes alquilantes.<sup>157</sup>

La anemia de Diamond Blackfan (ADB) fue descrita inicialmente en la década de 1930 como una anemia hipoplásica congénita.<sup>158</sup> Aproximadamente la mitad de los pacientes pueden presentarse sin alteraciones físicas. La mayoría de los pacientes se diagnostican durante la infancia al presentar anemia macrocítica, reticulocitopenia y niveles elevados de la adenosina deaminasa eritrocitaria. La médula ósea, de manera típica, presenta aplasia de la serie eritroide en un contexto normocelular. En un estudio del registro estadounidense de pacientes con ADB, un 2% había desarrollado LMA a los 45 años de edad.<sup>159</sup> La ADB está causada, con mayor frecuencia, por mutaciones autosómicas dominantes que dan lugar a la haploinsuficiencia de genes que codifican para proteínas del ribosoma, siendo el más comúnmente afectado, *RPS19*.<sup>160</sup> También se han descrito mutaciones en *GATA1*, que codifica un factor crítico en la eritropoyesis y en *TSR2*, ligando de *RPS26*, como causante de ADB.<sup>161</sup> Se ha especulado acerca de cómo mutaciones en genes que corresponden a un orgánulo tan ubicuo como el ribosoma resulta en un fenotipo específico en un tejido particular. Los mecanismos patogénicos que han sido implicados incluyen la apoptosis mediada por *TP53*, desencadenada por un aumento del estrés ribosomal, el incremento de la muerte celular derivado de un exceso de grupo hemo libres o un aumento exacerbado de la autofagia.<sup>162,163</sup> En los SMD esporádicos con delección del brazo largo del cromosoma 5, la haploinsuficiencia del *RPS14* se ha asociado con un fenotipo característico y a una mejor respuesta a lenalidomida.<sup>164</sup>

Llamada previamente Disqueratosis Congénita, las enfermedades de la biología de los telómeros (EBT) agrupan a una serie de condiciones provocadas por un defecto en los mecanismos de mantenimiento de los mismos. Estos defectos pueden dar lugar a un abanico amplio de manifestaciones clínicas, aunque no es infrecuente que los pacientes sean diagnosticados sin clínica evidente.<sup>165</sup> El riesgo de desarrollar SMD en los pacientes con EBT, alcanza un *plateau* del 3% a los 29 años de edad.<sup>166</sup> El cribado diagnóstico para las EBT ha requerido, tradicionalmente, de la medida de la longitud de los telómeros en los linfocitos. Entre las manifestaciones no hematológicas que se pueden asociar, destacan la fibrosis pulmonar o alteraciones hepáticas y vasculares. Como en el caso de la anemia de Fanconi, es necesario ajustar la intensidad del

tratamiento de acondicionamiento en el alo-TPH debido a una sensibilidad aumentada a la quimio y radioterapia.<sup>167</sup> Las EBT son causadas por mutaciones en, al menos, 13 genes con patrones de herencia variable.<sup>168</sup>

En 1964, los doctores Shwachman y Diamond comunicaron el diagnóstico de niños con clínica de fibrosis quística, insuficiencia pancreática y neutropenia, con test de sudor normal y sin manifestaciones pulmonares.<sup>169</sup> El síndrome de Shwachman-Diamond (SSD) se caracteriza por la disfunción pancreática exocrina, el fallo medular y otros hallazgos físicos. Sin embargo, estas características no están presente en todos los pacientes y puede que la primera manifestación clínica sea el SMD.<sup>170</sup> La manifestación hematológica más frecuente es la neutropenia que puede ser moderada o grave y persistente o transitoria. En una cohorte de 102 pacientes franceses con SSD, la incidencia acumulada de SMD y/o LMA fue del 36% a los 30 años de edad.<sup>171</sup> El SSD se hereda de forma autosómica recesiva, con mutaciones en el gen *SBS*, implicado en la unión de las subunidades grande y pequeña del ribosoma, funcionando como un cofactor de *EFL1*.<sup>172</sup> Recientemente, se han descrito mutaciones en los genes *DNAJC21*, *EFL1* y *SRP51* como causantes de SSD. De estos genes, hasta la fecha, solo se han descrito variantes germinales en casos de SMD y LMA de *DNAJC21*.<sup>173,174,175</sup>

La activación aberrante de la vía de señalización *RAS-MAPK* es un hallazgo frecuente en las neoplasias hematológicas, destacando su papel en la patogenia de la LMMJ.<sup>176</sup> La LMMJ, propia de niños y adolescentes, es una expansión maligna del compartimento granulocítico y monocítico en sangre, médula ósea, bazo y otros tejidos. Las mutaciones recurrentes en estos pacientes afectan *NFI*, *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS* o *CBL*, pertenecientes a la vía *RAS* y que se detectan en el 90% de los casos.<sup>177</sup> Aunque la mayoría de estas variantes se adquieren, se ha descrito un grupo de pacientes con LMMJ que portan variantes germinales en estos mismos genes, desarrollando la neoplasia mieloide como parte de uno de los síndromes constitucionales a los que, en conjunto, se les ha denominado Rasopatías. En concreto, los niños con neurofibromatosis tipo 1 tienen de 200 a 500 veces más probabilidades de desarrollar una LMMC.<sup>178</sup> En las células hematopoyéticas de estos pacientes se ha sustituido el alelo sano por una duplicación del portador de la variante en *NFI*, mediante el mecanismo de disomía uniparental.<sup>179</sup> El mismo proceso afecta a las variantes germinales en *CBL* que se encuentran en el 10-15% de los pacientes con LMMJ. Sin

embargo, en este caso y a diferencia de pacientes mutados para *NF1*, se han mostrado frecuentes resoluciones espontáneas de la LMMJ asociada a variantes germinales en *CBL*. A pesar de la corrección hematopoyética, estos pacientes siguen presentando un riesgo elevado de desarrollar complicaciones vasculares como hipertensión y atrofia óptica.<sup>180</sup> El síndrome de Noonan, la más frecuente de las Rasopatías, se asocia con frecuencia a variantes germinales en *PTPN11*. Y precisamente es este gen, pero de forma adquirida, el que presenta con mayor frecuencia mutaciones en la LMMJ, que otorgan un pronóstico desfavorable.<sup>181</sup> No es el caso del curso clínico definido por las variantes germinales, cuyos portadores presentan regresiones espontáneas del cuadro mieloproliferativo/mielodisplásico.<sup>182</sup> Estas diferencias clínicas podrían explicarse por la localización distinta de las variantes a lo largo del gen, que provocaría efectos distintos en la proteína. Destacar que los pacientes con Sd. de Noonan también presentan una mayor predisposición a desarrollar LLA.<sup>183</sup> Además de *PTPN11*, se han descrito otros genes afectados por variantes germinales en casos de Sd. de Noonan y LMMJ, incluyendo *RIT1*, *NRAS* o *SOS1*.<sup>184,185</sup> En la tabla 12 se muestran, en forma más extensa, los principales genes predisponentes de neoplasia hematológica de estirpe

**Tabla 12.** Genes principales con predisposición a desarrollar neoplasia mieloides y/o linfoides. Adaptada de Abhishek et.al., Mayo Clinic Proceeding 2020.<sup>186</sup>

GENES	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	FUNCIÓN	HEMOPATÍA ASOCIADA
<b>NEOPLASIAS DE ESTIRPE MIELOIDE</b>			
<i>CEBPA</i>	19q13.11	Factor de transcripción y potenciador	LMA
<i>DDX41</i>	5q35.3	Función de helicasa de ARN	SMD
<i>SRP72</i>	4q12	Función del retículo endoplásmico	NMPc
<i>MBD4</i>	3q21.3	Protección y vinculación de ADN metilado	
<i>SAMD9/9L</i>	7q21.2	Reparación del ADN	
<i>RECQL4</i>	8q24.3	ADN helicasa	
<i>PTPN11</i>	12q24.13	Regulación de la señalización de la vía de RAS/MAPK	LMMC, LMMJ, Síndrome de Noonan
<i>CBL</i>	11q23.3	Regulación de la vía RAS	LMMJ
<i>RUNX1</i>	21q22.12	Factor de transcripción	Trombocitopenia familiar
<i>ETV6</i>	12p13.2	Factor de transcripción	
<i>ANKRD26</i>	10p12.1	Interacción proteína-proteína	
<i>MECOM</i>	3q26.2	Regulador transcripcional	
<i>RBM8A</i>	1q21.1	Producción de proteína celular	
<i>MPL</i>	1p34.2	Proliferación celular	Trombocitopenia amegacariocítica congénita
<i>ELANE</i>	19p13.3	Producción de elastasa neutrofílica	Neutropenia congénita severa
<i>HAX1</i>	1q21.3	Regulación de apoptosis	
<i>WAS</i>	Xp11.23	Traducción de señales al citoesqueleto	
<i>CSF3R</i>	1p34.3	Función y maduración de granulocitos	

<i>GATA2</i>	3q21.3	Factor de transcripción de los dedos de Zinc	Síndrome de haploinsuficiencia relacionada con <i>GATA2</i>
<i>TERT</i>	5p15.33	Subunidad catalítica de la telomerasa	Síndromes de telómero corto
<i>TERC</i>	3q26.2	Componente ARN de la telomerasa	
<i>RTEL1</i>	20q13.33	ADN helicasa	
<i>POT1</i>	7q31.22	Mantenimiento del telómero	
<i>FANCA</i>	16q24.3	Reparación del ADN	Anemia de Fanconi
<i>FANCB</i>	Xp22.31		
<i>FANCC</i>	9q22.3		
<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12.3		
<i>FANCE</i>	6p21.3		
<i>FANCF</i>	11p15		
<i>FANCG</i>	9p13		
<i>FANCI</i>	15q25-26		
<i>FANCL</i>	17q22.3		
<i>FANCL</i>	2p16.1		
<i>FANCM</i>	14q21.3		
<i>FANCN</i>	16p12.1		
<i>SBDS</i>	7q11.21		
<i>DNAJC21</i>	5p13.2	Biogénesis de ARN	
<i>EFL1</i>	15q25.2	Biogénesis de subunidad ribosoma	
<i>RPS19</i>	19q13.2	Función y ensamblaje de ARN	Anemia de Diamond-Blackfan
<i>RPS24</i>	10q22.3		
<i>RPS17</i>	15q25.2		
<i>RPL5</i>	1p22.1		
<i>RPL11</i>	1p36.11		
<i>RPL35A</i>	3q29		
<i>GATA1</i>	Xp11.23	Factor de transcripción eritroide	NMP familiar
<i>TSR2</i>	Xp11.22	Factor de maduración ribosomal	
<i>ATG2B/GSKIP</i>	14q32.2	Diferenciación celular	
<b>NEOPLASIAS DE ESTIRPE LINFOIDE</b>			
<i>IKZF1</i>	7p12.2	Factor de transcripción	LLA
<i>PAX5</i>	9p13.2	Factor de transcripción	LNH
<i>SH2B3</i>	12q24.12	Señalización celular y transducción	LH/LNH
<i>TP53*</i>	17p13.1	Supresor tumoral	LLC
<i>ATM</i>	11q22.3	División celular y reparación del ADN	Ataxia telangiectasia
<i>BLM</i>	15q26.1	Helicasa del ADN	Síndrome de Bloom
<i>PTPN11</i>	12q24.13	Regulación de la vía de señalización de RAS/MAPK	Síndrome de Leopard/Noonan
<i>NFI</i>	17q11.2	Codificación de neurofibromina	Neurofibromatosis (tipo 1)
<i>NBS1</i>	8q21.3	Reparación de ADN	Síndrome de Nijmegen Breakage
<i>WAS</i>	Xp11.23	Mantenimiento del marco estructural celular	Síndrome de Wiskott-Aldrich
<i>BTK</i>	Xq22.1	Desarrollo y maduración de células B	Agammaglobulinemia de Bruton

**Abreviaturas:** TMT, trastorno mieloproliferativo transitorio.

\*Descrito también predisposición a desarrollar neoplasia hematológica mieloide.

### 1.2.3. Implicaciones clínicas del hallazgo de una variante germinal predisponente de SMD

La mayoría de las recomendaciones clínicas se basan en opiniones de paneles de expertos a partir de datos retrospectivos. De tal manera que, aunque recientemente han aparecido guías clínicas, es importante reconocer la necesidad de individualizar cada caso dependiendo del tipo específico de enfermedad, del tipo de variante y del gen

afectado, de los antecedentes personales y familiares, y de los estándares de tratamiento establecidos en función de la edad del paciente (pediátricos vs. adultos).<sup>187</sup>

Según Godley y Shimamura,<sup>188</sup> se debe realizar un seguimiento de aquellos pacientes o familiares en los que se ha encontrado una variante germinal deletérea o probablemente deletérea y de aquellos individuos que cumplan criterios clínicos de un síndrome de predisposición a cáncer, a pesar de que no haya sido posible una definición genética. Los individuos con variantes de significado incierto deberían ser animados a participar en estudios de investigación que exploren la asociación de estas variantes con neoplasias, permitiéndonos llegar a establecer relaciones robustas. Cuando sea posible la secuenciación genómica de miembros de una familia, las muestras deberían ser enviadas a un mismo laboratorio para mantener la consistencia metodológica y de análisis.

Existen limitaciones importantes en la clasificación de las variantes. Entre ellas, destaca la falta de concordancia entre distintos laboratorios a la hora de categorizar las variantes como benigna, probablemente benigna, de significado incierto, probablemente patogénica y patogénica. Como demostró Balmaña y colaboradores, una misma variante puede recibir una categorización distinta en función del laboratorio que la interprete. Esa falta de concordancia afectaba al 11% de las variantes estudiadas, con el lógico incremento de la incertidumbre para el médico, los familiares y el portador.<sup>189</sup> El uso de registros de variantes, como *ClinVar* y *ClinGen*, puede proporcionar una mayor consistencia en la interpretación de las variantes, al estandarizar y centralizar la evaluación de las mismas y su asociación fenotípica.<sup>190</sup>

Considerando las distintas fases en el cuidado del paciente:

*Implicaciones en el diagnóstico.* Los expertos recomiendan considerar la posibilidad de predisposición genética en el desarrollo de un SMD en aquellos pacientes que se diagnostiquen a una edad joven o adultos jóvenes que presenten una toxicidad hematológica exacerbada cuando sean tratados por otro cáncer. Otros hallazgos clínicos que nos pueden hacer sospechar incluyen alteraciones físicas, endocrinopatías, talla baja, retraso en el crecimiento, presencia de algún déficit inmune en pacientes que presenten, además, citopenia y/o macrocitosis de los hematíes. La presencia en los

familiares de primer o segundo grado de este tipo de alteraciones también apoya la presencia potencial de predisposición a SMD. Sin embargo, debemos destacar que la ausencia de características clínicas no hematológicas o antecedentes familiares no excluye la presencia de un SMD con predisposición. Esto es así, principalmente, por dos razones: el diagnóstico tardío puede explicarse por el fenómeno de penetrancia variable de estas alteraciones génicas y la ausencia de historia familiar se puede deber bien a la aparición de la variante *de novo* intraútero o como resultado de un mosaicismo parental.<sup>191</sup>

Existen ciertas alteraciones citogenéticas adquiridas que son comunes en determinados SMD con predisposición germinal. Por ejemplo, la monosomía del cromosoma 7 es frecuente en pacientes portadores de variantes germinales en *GATA2*, *SAMD9* o *SAMD9L*.<sup>192</sup>

La delección del brazo largo del cromosoma 20 o la presencia de un isocromosoma 7 son hallazgos comunes del SSD.<sup>193</sup> Las amplificaciones en el brazo largo de los cromosomas 20 y 3 son hallazgos comunes en los pacientes de anemia de Fanconi.<sup>194</sup>

Los pacientes y familiares en los que se sospeche la presencia de un SMD con predisposición germinal deberían recibir consejo genético acerca de la necesidad de solicitar secuenciación génica y acerca de las limitaciones y posibilidades de este tipo de análisis.

*Implicaciones en el seguimiento.* El diagnóstico de una predisposición genética a desarrollar una neoplasia otorga una oportunidad única de realizar un seguimiento prospectivo y de intervenir en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, en el caso de las neoplasias mieloides, la evidencia científica de la utilidad de una intervención precoz es insuficiente. La LMA, estadio final de muchos de los SMD de alto riesgo, presenta un pronóstico muy pobre, de tal manera que el diagnóstico de un SMD en estadio temprano podría proporcionar la oportunidad de realizar un trasplante alogénico antes de desarrollar una LMA, mejorando la evolución del paciente.<sup>188</sup>

El seguimiento debería ser específico para el tipo de síndrome de predisposición de acuerdo a los datos de los que disponemos actualmente. Se debería educar al portador acerca de los signos o síntomas a los que debería estar atento en caso de desarrollar citopenia, con el fin de identificarlos y buscar atención médica. Este tipo de signos o síntomas incluyen fiebre, cansancio persistente, pérdida de peso inexplicada, sangrados, hematomas, petequias, adenopatías y dolor óseo constante o progresivo.

Existe consenso en cuanto a que los portadores de variantes germinales predisponentes deben ser seguidos en consulta especializada. No hay acuerdo, sin embargo, en cuanto a la frecuencia de estas visitas, recomendándose cada 6 o 12 meses. Un estudio observacional prospectivo de pacientes portadores de mutaciones en *TP53*, liderado por investigadores canadienses, comparó el pronóstico de esta cohorte en función de si habían sido seguidos o no. En los casos en los que se había realizado un seguimiento médico, incluyendo un hemograma cada 4 meses, la mayoría de los cánceres que se produjeron fueron tumores sólidos, siendo significativa la mejora en la SG en pacientes diagnosticados de neoplasia maligna que habían sido seguidos. En el caso de los pacientes que desarrollaron LMA, el número fue demasiado pequeños para extraer conclusiones del beneficio de realizar seguimiento.<sup>195</sup>

Los expertos consideran que es importante disponer de un estudio medular en el momento de la identificación de la variante patogénica o probablemente patogénica, que permita la comparación y determinación de cambios significativos en caso de que aparezcan signos de enfermedad. Este estudio medular debe incluir un estudio citogenético. En el caso del análisis de la presencia de mutaciones somáticas en los pacientes portadores de variantes predisponentes a neoplasias mieloides, debe tenerse en cuenta que se han descrito casos en los que se detectan mutaciones adquiridas en *RUNX1* y *CSF3R* sin que se haya producido un diagnóstico de SMD o LMA.<sup>196,197</sup> Además, aunque en edades avanzadas, estudios recientes en población sana han demostrado la presencia de mutaciones adquiridas en una serie determinada de genes sin la presencia de neoplasia hematológica, en lo que ha venido a denominarse hematopoyesis clonal relacionada con la edad.<sup>120</sup>

No se debe olvidar que muchas de estas variantes predisponentes de SMD también pueden asociarse a otras complicaciones no hematológicas que deberían ser

vigiladas. Por ejemplo, el desarrollo de endocrinopatías o la aparición de otros tumores sólidos.

*Implicaciones en cuanto al tratamiento.* El único tratamiento curativo de los SMD es un alo-TPH. La detección de variantes germinales predisponentes y el seguimiento de pacientes portadores permitiría el diagnóstico antes de que se acumule un porcentaje importante de blastos, lo que podría evitar la administración de un ciclo de tratamiento intensivo para inducir la remisión, limitando el riesgo de infecciones, de toxicidad orgánica aguda, o el desarrollo de tumores secundarios, propios de algunos de estos síndromes de predisposición.

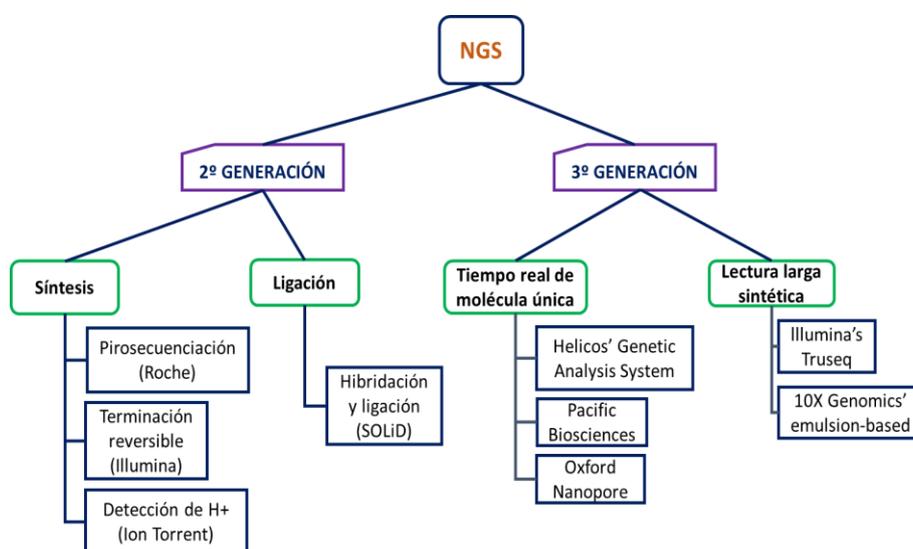
Los potenciales donantes familiares de pacientes con neoplasias mieloides portadores de variante germinal, deberían ser secuenciados para esa variante en concreto, independientemente de que presente manifestaciones clínicas, debido a que es conocido el amplio fenotipo que puede darse en los miembros de una misma familia afectada.<sup>188</sup> Además, se deben tener en cuenta las potenciales complicaciones, desarrollo de enfermedad en las células donadas o fallos de injerto, que podrían derivarse de la utilización de material donado portador.<sup>198</sup>

### **1.3. Detección de variantes mediante secuenciación masiva**

Desde la introducción de la secuenciación de primera generación, con la técnica de Sanger y la secuenciación por “*shotgun*” (secuenciación aleatoria masiva), dichas tecnologías fueron empleadas en el proyecto del genoma humano. Sin embargo, pronto se hizo evidente que el tiempo y personal necesario para proyectos relevantes, y el coste derivado, eran inasumibles, incluso, para los centros mejor financiados. Así, los fondos económicos fueron redirigidos a hallar fórmulas tecnológicas que permitieran la secuenciación de un mayor número de muestras, en un menor periodo de tiempo y con una menor carga de trabajo. Así, a lo largo de la primera década del siglo XXI, aparecieron distintas plataformas de secuenciación masiva, en paralelo, que fueron agrupadas bajo el término de secuenciación de nueva generación (NGS, en sus siglas en inglés) y posteriormente clasificadas en segunda y tercera generación. La primera técnica de NGS en aparecer fue la basada en pirosecuenciación en 2004, a la que

siguieron las plataformas Solexa, SOLiD y, por último, Ion Torrent. Basadas, respectivamente, en terminación reversible y marcado con fluorescencia, hibridación-ligación y en liberación de iones de hidrógeno.<sup>199</sup> En 2014, las plataformas de secuenciación masiva mejoradas eran capaces de secuenciar, al mismo tiempo, 16 genomas humanos completos, con una profundidad de 30x, en tan sólo 3 días y con un coste exponencialmente menor.<sup>200</sup> Además, en los últimos años han aparecido las plataformas de tercera generación, capaces de secuenciar el genoma mediante la generación de lecturas largas (Figura 3).

**Figura 3.** Tipos de secuenciación de nueva generación (NGS).

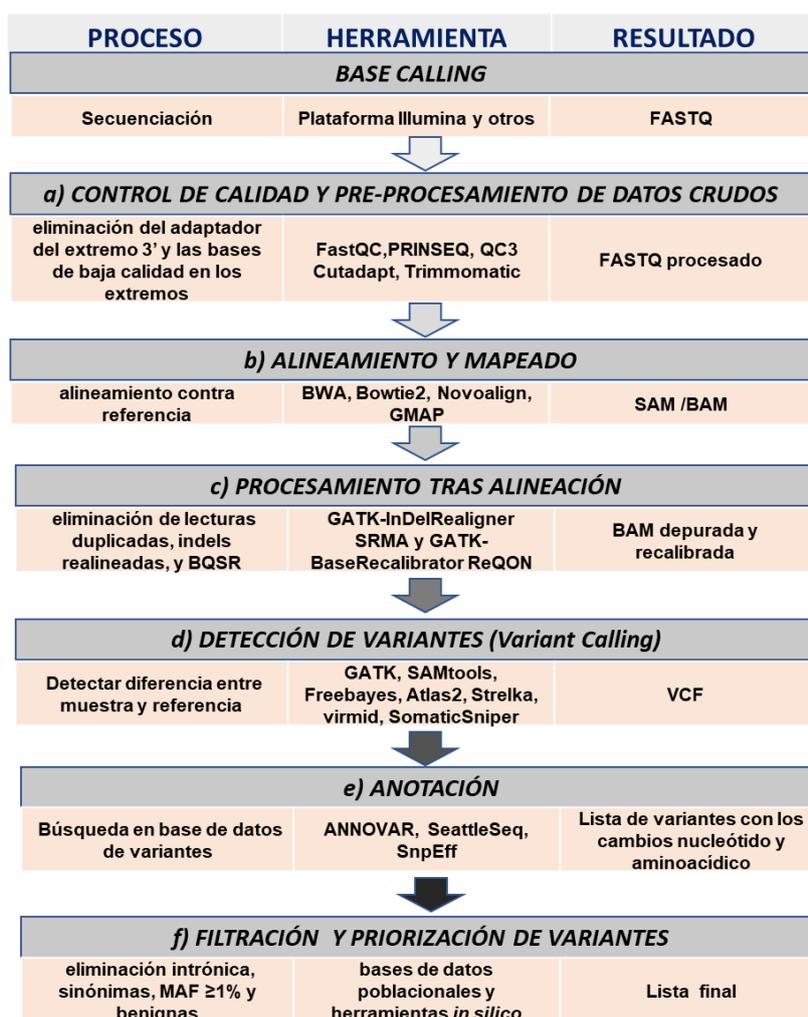


Las aplicaciones más comunes de la NGS incluyen la secuenciación de ADN, ARN, ChIP-seq (secuenciación con inmunoprecipitación de cromatina) y del metiloma. La secuenciación de ADN permite detectar variantes genómicas de nucleótido único (SNV, por sus siglas en inglés), pequeñas inserciones y deleciones de ADN (*indels*), variantes de número de copias génico (CNV, por sus siglas en inglés), lo que ha permitido dilucidar gran parte de las variantes constitucionales y/o somáticas relacionadas con las enfermedades humanas. La secuenciación NGS del ARN ha permitido entre otras aplicaciones, ampliar nuestros conocimientos de los genes de fusión, los eventos de *splicing* (empalmes postranscripcionales) y ha sustituido a los *arrays* de expresión en la medida cuantitativa del transcriptoma. El ChIP-seq se utiliza, fundamentalmente, para detectar los sitios de unión de las proteínas con el ADN, combinando los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación

masiva.<sup>201</sup> La secuenciación del metiloma se utiliza principalmente para detectar los distintos perfiles de metilación del ADN.

La utilidad de la *NGS* es muy amplia y su aplicación en la investigación se ha convertido, en la actualidad, en algo esencial para la detección de mutaciones tanto somáticas como germinales en el campo hemato-oncológico. En los siguientes apartados nos centraremos principalmente en los pasos de análisis de los datos obtenidos de la secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés). Las etapas básicas en el análisis del WES son el control de calidad de los datos crudos (QC), el pre-procesamiento, alineamiento y mapeado, procesamiento tras alineamiento, detección de variantes (*variant calling*, su traducción en inglés), anotación y filtrado/priorización de las mismas (Figura 4).

**Figura 4.** Flujo de trabajo en WES: pasos en el análisis de los datos obtenidos de la secuenciación del exoma completo.



a) *Control de calidad de los datos crudos y pre-procesamiento.* Existen varias herramientas bioinformáticas para evaluar la calidad de los datos crudos de la NGS. Las más comúnmente empleadas son FastQC,<sup>202</sup> FastQ Screen,<sup>203</sup> FASTX-Toolkit,<sup>204</sup> NGS QC Toolkit,<sup>205</sup> PRINSEQ,<sup>206</sup> QC-Chain,<sup>207</sup> y QC3.<sup>208</sup> FastQC es la aplicación más utilizada y genera el llamado Phred score (la probabilidad de un error en la detección de una base), la distribución del contenido de GC, la distribución de la longitud de las lecturas y el nivel de secuencias duplicadas. Además, el FastQC detecta secuencias sobrerrepresentadas, lo que puede indicar contaminación con el *primer* o adaptador. Los datos generados por FastQC permiten también realizar el pre-procesamiento, que incluye la retirada de los adaptadores, duplicados y contaminaciones.

El procedimiento estándar de pre-procesamiento incluye la eliminación del adaptador del extremo 3' y la retirada de las bases de baja calidad ubicadas en las terminaciones. Se encuentran disponibles varias herramientas de bioinformática para el pre-procesamiento como Cutadapt<sup>209</sup> y Trimmomatic.<sup>210</sup> Por otro lado, PRINSEQ y QC3 permiten tanto el control de calidad como realizar el pre-procesamiento, pero cada herramienta posee sus propias características. Trimmomatic es una aplicación de Java que provee varias funciones para manejar secuencias pareadas (*paired-end*). QC3 ofrece además del control de calidad de datos crudos, el mapeado y la detección de variantes.

b) *Alineamiento y Mapeado.* Hay varias herramientas bioinformáticas que se pueden utilizar para el mapeado de lecturas cortas. Estas herramientas utilizan la transformación Burrows–Wheeler (BWT, algoritmo de compresión que reduce la memoria necesaria para indexar el genoma humano), el algoritmo de programación dinámica de Smith–Waterman (SW, alinea dos secuencias en función un determinado sistema de puntos, que incluye no sólo la similitud entre bases, sino cómo de conservada está esa región a lo largo de la evolución, p.ej.) o ambos, permitiendo un alineamiento óptimo en un tiempo aceptable. Las herramientas, Bowtie2<sup>211</sup> y BWA<sup>212</sup> utilizan el algoritmo implementado por BWT. Por otro lado, el algoritmo SW se emplea para el alineamiento local de secuencias determinando sus regiones similares. Esta estrategia es especialmente útil cuando las secuencias a alinear presentan un grado de diferencia relevante frente a los casos en los que las secuencias a alinear son muy similares, en un alineamiento global es la aproximación más adecuada. MOSAIK,<sup>213</sup>

SHRiMP2,<sup>214</sup> y Novoalign son aplicaciones que utilizan el algoritmo SW. GMAP, por otro lado, utiliza ambos algoritmos.<sup>215</sup>

c) *Procesamiento tras el alineamiento.* Después de alinear y mapear las lecturas al genoma de referencia, hay dos pasos básicos en el procesamiento tras el alineamiento. El primer paso consiste en la eliminación de las secuencias duplicadas. Los programas Picard MarkDuplicates y SAM-tools pueden determinar la presencia de las lecturas duplicadas en función de las bases presentes en su extremo 5'.<sup>212</sup> Estas secuencias duplicadas serán más abundantes cuando se secuencie con una mayor profundidad de lecturas ( $\geq 500x$ ) y se utiliza en muestras tumorales.

Posteriormente a la eliminación de lecturas duplicadas, el segundo paso es la identificación de las regiones genómicas que contienen *indels* y la mejora en la calidad del alineamiento de esas regiones. En el caso de la secuenciación masiva de lecturas cortas, que presenta una mayor frecuencia de brechas (zonas en las que ninguna secuencia se ha alineado a la de referencia) tras alinear con el genoma humano, la identificación correcta de los *indels* constituye un problema crítico. Se desarrollaron dos algoritmos para solucionarlos: i) realineamiento local de las lecturas con brechas al genoma de referencia o haplotipos alternativos, y ii) ensamblaje local *de novo* de las lecturas alineadas entorno a la región problema, mediante una secuencia construida a partir de los *indels* hallados. Los programas que implementan estos algoritmos incluyen SRMA<sup>214</sup> e IndelRealigner dentro de la herramienta de análisis de genoma GATK.<sup>216</sup>

d) *Detección de variantes.* Las herramientas más antiguas para la detección de variantes, utilizadas en la clínica genómica, incluyen aquellas diseñadas específicamente para la identificación de variantes germinales, tales como HaplotypeCaller de GATK, MAQ y SAMtools mpileup. Las más recientes fueron diseñadas, principalmente, para la detección de variantes somáticas en estrategias de análisis que compararan muestra normal con tumoral, lo que facilita la distinción de los polimorfismos, variantes somáticas y secuencias erróneas (por ejemplo; MuTect2<sup>217</sup>, VarDict<sup>218</sup>, and VarScan2<sup>219</sup>). Existen otras herramientas diseñadas para obtener el mejor rendimiento posible a partir del análisis no pareado, esto es, cuando sólo se dispone de muestra tumoral, por ejemplo, la herramienta LoFreqStar<sup>220</sup>. Más recientemente, los métodos de secuenciación comienzan a incluir los identificadores

moleculares únicos (UMIs, por sus siglas en inglés) o “códigos de barras moleculares”. Se trata de secuencias cortas de oligonucleótidos, diferentes entre sí, que se añaden de forma exclusiva a cada molécula de ADN antes de la preparación de la librería, generando una identidad distinta para cada una de ellas. Tras la secuenciación, herramientas de detección especializadas como DeepSNVMiner<sup>221</sup> y smCounter2<sup>222</sup>, son capaces de identificar que las copias producidas proceden de una secuencia “real” de ADN con la que se inició el proceso de PCR, filtrando los posibles errores producidos durante la generación de las librerías y la secuenciación.

e) *Anotación de variantes.* Después de la detección de variantes, se realiza la anotación básica de las características de las mismas, incluyendo la nomenclatura del gen, el exón en el que se encuentra y el cambio aminoacídico que se produce. La información que los distintos paquetes informáticos pueden asociar a una determinada variante, recurriendo a bases de datos públicas, es muy amplia. Puede incluir la frecuencia de ese alelo en la población general o frecuencia alélica menor (MAF, por sus siglas inglés), estudios funcionales relacionados, asociaciones clínicas, predicciones *in silico* de la capacidad de esa variante de dañar la función del gen, y la descripción previa de esa variante asociada a neoplasias u otras enfermedades. Otros datos más específicos, como la potencial alteración del sitio de unión a factores de transcripción o de hipersensibilidad a la enzima ADNasa, la orientación espacial respecto a los potenciadores (*enhancers*, en inglés) puede ser recuperada a partir del proyecto ENCODE y las bases de datos públicas como RegulomeDB<sup>223</sup> y HaploReg<sup>224</sup>.

Un ejemplo de herramienta que es capaz de integrar varias bases es ANNOVAR. Es capaz de acceder a más de 4000 bases públicas en la anotación de las variantes, incluyendo registros de polimorfismo de nucleótido único, datos de secuenciación de grandes series de población sana o registros de información derivada del estudio integral molecular de líneas celulares.<sup>225</sup> En los programas de anotación de variante es constante la inclusión de información procedente del registro de variantes adquiridas en neoplasia del instituto Sanger COSMIC,<sup>226</sup> y ClinVar,<sup>227</sup> un registro que recoge información sobre cada variante y su relación con enfermedades, coordinado desde el instituto de salud estadounidense.

En una anotación estándar se suele incluir la valoración obtenida en una o varias escalas de predicción *in silico* de la potencial patogenicidad de la variante. Son numerosas, pueden ser consultadas en la sección de información suplementaria en este trabajo, pero destacamos dos, CADD<sup>228</sup> y REVEL<sup>229</sup> por integrar datos que otras herramientas recopilan de modo individual.

CADD (siglas en inglés de *Combined Annotation-Dependent Depletion*) otorga una puntuación a cada variante en función de 63 parámetros genómicos usando una estructurada basada en el aprendizaje automático (*machine learning*).<sup>228</sup> REVEL es otra meta-escala de predicción que reúne las predicciones de patogenicidad a partir de otras 18 escalas individuales, de las cuales ocho se basaban en la conservación a lo largo de la evolución de la variantes y diez eran predictores funcionales.<sup>229</sup> Además, REVEL obtuvo muy buen resultado al ser comparada frente a otras cinco meta-escalas.<sup>230</sup>

f) *Filtrado y priorización de variantes.* El primer paso consiste en eliminar las variantes con alta probabilidad de ser un falso positivo, como aquellas cubiertas por un número de lecturas bajo, localizadas en regiones en las que se ha detectado un número desproporcionado de variantes o aquellas procedentes de lecturas cuyo alineamiento es de baja confianza.<sup>231</sup> Este primer paso puede reducir la lista inicial de candidatas a la mitad. Otra estrategia que puede ayudar en la detección de errores de secuenciación en el análisis de variantes germinales, son los datos derivados de la secuenciación de un probando y sus progenitores. La ausencia de la variante problema en los padres apoyaría que se trate de un error.<sup>232</sup> Sin embargo, esta aproximación tiene limitaciones, debido al fenómeno del mosaicismo parental o a la posibilidad de la adquisición intraútero *de novo* de una variante en la línea germinal.

El segundo paso del filtrado consiste en descartar aquellas variantes que se presenten en la población general sana en más del 1% de los casos. Este hecho asume la improbabilidad estadística de que una variante tan frecuente cause una enfermedad rara. El límite del 1% es arbitrario, y es el utilizado en los estudios que investigan enfermedades con patrón de herencia potencialmente “mendeliana”. La principal limitación de este paso del filtrado lo representa el fenómeno de la patogenicidad derivada de la heterocigosis compuesta. En este caso, la presencia individual de cada variante en la población general puede superar el límite que establecimos como relevante. Sin

embargo, la asociación de estas dos variantes, que es lo que determina la patogenia, puede ser un fenómeno excepcional. Se han diseñado algunas herramientas que incorporan el valor de asociación de diversas variantes en el filtrado, por ejemplo, GeneTalk Suite.<sup>233</sup>

El tercer paso del filtrado asume que aquellas variantes deletéreas son las que afectan a regiones codificantes o de *splice* y alteran la composición aminoacídica de la proteína o la truncan. Ello supone el descarte de aquellas variantes sinónimas o localizadas en los intrones. La limitación de esta aproximación es cada más evidente, al comunicarse variantes patogénicas en regiones regulatorias localizadas en intrones o, incluso, variantes sinónimas capaces de alterar la conformación tridimensional de la proteína.

En cuarto lugar, las variantes germinales pueden ser priorizadas por su pertenencia a genes causantes o potencialmente causantes de la enfermedad en estudio. Esta aproximación limita el número ingente de variantes de un análisis de un exoma completo, pero también es un obstáculo para el descubrimiento de nuevas variantes patogénicas.

## **1.4. Inestabilidad de los microsatélites en cáncer**

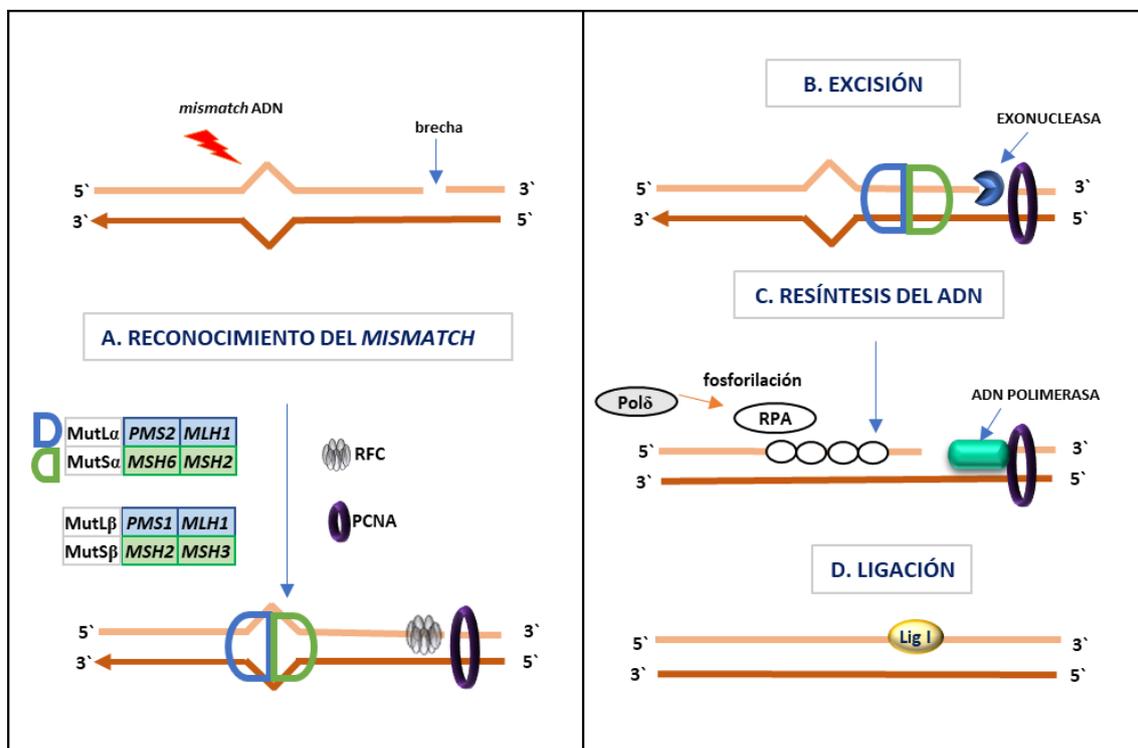
### **1.4.1. Sistema de reparación de ADN *mismatch***

Los microsatélites son secuencias cortas, repetidas en tándem (normalmente de 10 a 20 veces) de mononucleótidos, dinucleótidos o multinucleótidos (sin sobrepasar la mayoría de los casos las 6 bases), que se encuentran dispersos a lo largo de todo el genoma humano y cuya forma más frecuente es la repetición del dinucleótido CA.<sup>234</sup> Estos sitios en el genoma tienden a verse afectados con mayor frecuencia por errores en la replicación del ADN como consecuencia de un retraso en la intervención de la polimerasa del ADN, lo que puede provocar la inserción de bases adicionales en la cadena que se está sintetizando o la retirada de bases en la cadena que se está utilizando como modelo, lo que acaba dando lugar a dos cadenas de ADN no apareadas.<sup>235</sup> Se estima que las ADN polimerasas *epsilon* y *delta* originan un error, aproximadamente, en

1 de cada  $10^4$  y  $10^5$  nucleótidos que polimerizan, respectivamente.<sup>236</sup> Por lo tanto, cada vez que una célula se divide, ocurren cien mil errores de estas polimerasas. Si la capacidad de corrección sobrepasa ciertos límites, la reparación de los errores pasa ser la responsabilidad del sistema de reparación *mismatch*.<sup>237,238</sup>

Los genes homólogos 2 y 6 del complejo proteico MutS (*MSH2* y *MSH6*), el gen homólogo 1 del complejo proteico MutL (*MLH1*) y el gen homólogo 2 del *PMS1* (*PMS2*) son los principales genes involucrados en el sistema *mismatch*. Las proteínas que codifican actúan como heterodímeros: *MSH2* se une bien a *MSH6* o a *MSH3* (dando lugar a los complejos MutS $\alpha$  o MutS $\beta$ , respectivamente) y *MLH1* se une bien a *PMS2*, *PMS1* o a *MLH3* (dando lugar a MutL $\alpha$ , MutL $\beta$  o MutL $\gamma$ , respectivamente).<sup>239</sup> Los complejos formados por una unidad de MutS y una unidad de MutL son los finalmente responsables de reconocer la presencia de desapareamiento entre bases, de *loops* de inserción/delección y del posterior reclutamiento del complejo *MLH1/MSH2* que degradará el segmento mutado e iniciará la resíntesis correcta (Figura 5).<sup>240</sup>

**Figura 5.** Sistema de reparación de *mismatch* del ADN. Adaptada de Hsieh, P. y Zhang, Z., Proc Natl Acad Sci USA, 2017. <sup>241</sup>



**Nota:** A) Al producirse un desapareamiento en una región del ADN (*mismatch*), las unidades MutL $\alpha$  y MutS $\alpha$  reconocen el daño producido en el ADN y se unen al sitio. Este complejo formado recluta la

unidad RFC, que carga la unidad PCNA en el extremo 3' con lo cual inicia la reparación desde la brecha del extremo 3' y, al mismo tiempo, activa la endonucleasa de la unidad MutL $\alpha$  que se encarga del corte del extremo 5'. B) En el extremo 3', la exonucleasa reclutada realiza un corte aguas abajo del *mismatch* al interaccionar con el complejo MutL $\alpha$ /MutS $\alpha$ . C) En el extremo 5', la unidad RPA protege el extremo 5' cortado evitando la degradación del ADN por la exonucleasa I y, además, ayuda en la resíntesis del ADN desde el extremo 5'. Pol $\delta$  es enzima que se encarga de fosforilar la unidad RPA, aumentando su actividad en la resíntesis del ADN. Mientras tanto, la ADN polimerasa realiza la resíntesis desde el extremo 3' con la ayuda de la unidad PCNA. D) En el paso final, interviene una ligasa (Lig I) que se encarga de unir los extremos del ADN resíntetizada.

Los pacientes con un déficit en cualquiera de estos componentes desarrollarán lo que se ha llamado un “fenotipo mutante”, generando un exceso de mutaciones con pérdida del marco de lectura en los microsatélites, codificantes o no, y en otras regiones del genoma distintas.<sup>242</sup> La consecuencia final se conoce como fenotipo con alta inestabilidad de los microsatélites (MSI-H, por sus siglas en inglés), íntimamente relacionado con mecanismos carcinógenos en tumores esporádicos o hereditarios.

*Otras alteraciones desencadenantes de MSI.* Recientemente, otros genes han sido implicados en la MSI. La mayoría de estos genes regulan la epigenética de los cuatro componentes principales del MMR. Así, el déficit en el regulador de la cromatina, *SETD2*, la delección de la helicasa *FANCI* o la expresión al alza de *KMD4* reducen la expresión proteica de *MSH6*.<sup>243</sup> Las variantes en el gen *POLE* se observan en un 0,5% en los casos de cáncer colorrectal, tanto de manera adquirida como germinal, y también pueden provocar MSI.<sup>244</sup> Otras de las lesiones que pueden dar lugar a MSI en cáncer, son las delecciones en el extremo 3' del gen *EPCAM*, que conducen a un estado hipermetilado de su gen vecino, *MSH2*.<sup>245</sup>

#### **1.4.2. Etiología de los cánceres MSI-H**

*Tumores MSI-H esporádicos o relacionados con el Síndrome de Lynch.* La inestabilidad de los microsatélites es un marcador indirecto del síndrome de Lynch, también conocido como cáncer colorrectal hereditario no polipósico. El síndrome de Lynch está causado por mutaciones germinales en cualquiera de los cinco genes del sistema *mismatch*: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, menos frecuentemente, *PMS1*.<sup>246</sup>

Además, las deleciones germinales que afectan al tercer exón del gen *EPCAM* dan lugar al fenómeno “*transcriptional read-through*” (en castellano, ARN ultraleído) que induce el silenciamiento epigenético mediante la hipermetilación del promotor del gen que se encuentra aguas abajo, *MSH2*.<sup>247</sup>

Recientemente, se han descrito variantes germinales en *MSH3*, que dan lugar a alteraciones en regiones microsatélites caracterizadas por secuencias de repeticiones más largas, que no son las habitualmente analizadas en los test de MSI convencionales, hallazgos que expanden el espectro de las alteraciones del sistema *mismatch* en humanos.<sup>248</sup>

El síndrome de Lynch se define como una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por un riesgo aumentado de cáncer de ovario, riñón, vejiga, estómago, intestino delgado, sistema biliar, piel; siendo el mayor incremento de riesgo en cáncer de endometrio y colorrectal.<sup>249</sup> A mediados de los 60 del siglo pasado, Henry T. Lynch fue el primero en describir este síndrome y diferenciarlo de la poliposis no adenomatosa familiar que está causada por una mutación heredada en el gen supresor *APC*. Las variantes germinales en los genes del sistema *mismatch* conllevan un riesgo acumulado del 30 al 60% de desarrollar cáncer colorrectal en hombres, y de un 30 a 40% en mujeres. En cuanto al riesgo acumulado de desarrollar cáncer de endometrio, va desde un 40 a 80% de los casos.<sup>250</sup>

El síndrome de Lynch tiene una alta penetrancia y explica, aproximadamente, del 2 al 3% de todos los cánceres colorrectales. Se estima, según estudios poblacionales, que 1 de cada 35 casos de nuevo diagnóstico de cáncer colorrectal puede ser un síndrome de Lynch.<sup>251</sup>

En cuanto a la inestabilidad de los microsatélites esporádica (adquirida) se genera frecuentemente a través del silenciamiento epigenético del promotor de *MLH1*, ocasionado por la metilación aberrante de un islote CpG y asociado a la presencia de la mutación somática en el gen *BRAF V600E*.<sup>252</sup> Con menor frecuencia, los casos esporádicos se asocian a la inactivación bialélica de los genes de sistema *mismatch*.<sup>253</sup>

En el contexto del cáncer endometrial, el sistema de MMR es defectuoso hasta en el 30% de los pacientes.<sup>254</sup> Como ocurría en el cáncer colorrectal, solo un 25% de los pacientes son portadores de variantes patogénicas en uno de los genes asociados al síndrome de Lynch, explicándose el restante 75% de los casos por los mismos mecanismos de los cánceres esporádicos: la hipermetilación del promotor de *MLH1* y la adquisición de las mutaciones somáticas de los genes del sistema *mismatch*.<sup>255</sup> La incidencia de inestabilidad de microsatélites en el cáncer gástrico oscila entre el 8 y el 30% en las distintas series, siendo su causa más frecuente la hipermetilación del *MLH1*.<sup>256</sup>

Existe una relación especialmente interesante entre genotipo y fenotipo dentro de las variantes germinales en el sistema *mismatch*. Por ejemplo, las variantes germinales en *MSH2* suelen dar lugar a tumores distintos al colorrectal, ocurriendo lo contrario en los portadores de *MLH1*. En el caso del cáncer de endometrio, el riesgo es mayor si la variante germinal se localiza en el gen *MSH6*.<sup>247</sup> Estudios que han comparado la frecuencia de positividad, de cada uno de los loci individuales, en los test que determinan la inestabilidad de los microsatélites en pacientes con cáncer endometrial frente a cáncer colorrectal mostraron que, a pesar de presentar las mismas variantes genéticas, el perfil de inestabilidad era diferente. El cáncer colorrectal presentaba un predominio de inestabilidad en los loci BAT no codificantes, en *TGFR2*, en las repeticiones de dinucleótidos, en *MSH3*, y en *BATX*. Por otro lado, la inestabilidad en *PTEN* se asociaba al cáncer endometrial.<sup>257</sup> En el cáncer de endometrio, sin embargo, el patrón de inestabilidad tiende a ser más heterogéneo, incluyendo a diferentes loci.

#### **1.4.3. Métodos para determinar la inestabilidad de los microsatélites y el déficit del sistema *mismatch*.**

La función inadecuada del mecanismo del MMR y la presencia de MSI se pueden determinar mediante dos métodos: pruebas moleculares en el ADN extraído del tejido tumoral o pruebas de inmunohistoquímica de las proteínas del sistema MMR. La estabilidad de los microsatélites se determina mediante técnicas moleculares analizando

regiones con repeticiones de mononucleótidos o combinaciones de mononucleótidos y dinucleótidos (microsatélites).<sup>258</sup>

El primer panel de referencia, conocido como panel de Bethesda, consiste en dos regiones con mononucleótidos repetidos (BAT-25, BAT-26) y tres regiones con repeticiones de dinucleótidos (D2S123, D5S436 y D17S250).<sup>259</sup> BAT-25 se encuentra en el intrón 16 del gen *c-KIT* y BAT-26 en el intrón 5 del gen *MSH2*. D2S123, situado en el brazo corto de cromosoma 2, es telomérico respecto a los otros genes del MMR que se encuentran en este cromosoma, *MSH2* y *MSH6*. D5S346, situado en la banda 5q (21-22), se encuentra cercano al locus del gen supresor de tumor *APC*, responsable de la poliposis adenomatosa colónica. D17S250, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, próximo al gen supresor de tumores *BRCA1*.<sup>260</sup>

Como las repeticiones de dinucleótidos son menos sensibles que las de mononucleótidos en la detección de MSI, siempre se requiere la comparación de ADN no tumoral, al usar el panel Bethesda. Aquellos tumores que muestren inestabilidad en dos o más de estos loci se consideran de alta inestabilidad (*MSI-high*, en inglés). Aquellos cánceres con tan solo un loci de los cinco inestables son interpretados como de baja inestabilidad (*MSI-low*, en inglés). Sin embargo, no está claro si estos casos *MSI-low* representan una categoría biológica distinta, y la mayoría de los grupos los consideran como estables.

El segundo panel es conocido como el panel pentaplex y consiste en las siguientes cinco regiones de mononucleótidos: BAT-25, BAT-26, NR-21 (localizado en la región 5' del gen *SLC7A8*), NR-24 (localizado en la región 5' del gen *ZNF-2*), NR-27 o MONO-27 (localizado en la zona intrónica del gen *MAP4K3*). Estas repeticiones, exclusivamente de mononucleótidos, facilitan su análisis al ser muy homogéneas.<sup>261</sup> Este panel se ha convertido en el nuevo estándar internacional, y no requiere la comparación de tejido tumoral para la determinación de MSI.<sup>262</sup>

Ambas técnicas moleculares se basan en la amplificación simultánea de los cinco marcadores en una PCR multiplex. La amplificación de estos productos migra por una electroforesis capilar, lo que permite su distribución en función de sus tamaños. La polimerasa no es lo suficientemente precisa para reproducir con exactitud el número

exacto de nucleótidos, de tal manera que, para cada uno de los marcadores, el perfil de electroforesis mostrará un patrón de múltiples picos. El tamaño de referencia de cada microsatélite en cada muestra viene determinado por el pico más alto, que es comparado con el tamaño esperable en población sana.<sup>258</sup>

La técnica inmunohistoquímica detecta las expresiones de las proteínas directamente en las muestras de los tejidos. Como las proteínas principales del MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) se encuentran en el núcleo, es necesario que la tinción alcance a este. La pérdida de proteína del MMR se define como su ausencia en la tinción inmunohistoquímica en el núcleo de las células tumorales, mientras que las normales permanecen positivas. De hecho, esta positividad nuclear de las células no tumorales se considera como un control interno positivo, incluso en el síndrome de Lynch, siempre y cuando el daño en el gen MMR en tejido germinal sea en heterocigosis.<sup>263</sup>

La técnica molecular presenta la ventaja de estudiar la vía MMR sin estar limitada a la expresión proteica. De hecho, algunas variantes puntuales permiten cierta expresión en la vía MMR (lo que determinará inmunohistoquímica normal) pero con alteración de la función de la vía. Por otro lado, la técnica molecular no proporciona información en cuanto a cuál de los genes del MMR está alterado.<sup>264</sup>



# Hipótesis y objetivos



## 2.1. Hipótesis

La reciente descripción de las neoplasias mieloides con predisposición germinal sin disfunción orgánica previa es particularmente interesante dentro de los SMD por tres razones principales:

- i) A diferencia de los fallos medulares congénitos, no existe una estrategia de tratamiento definida (por ejemplo, el régimen de acondicionamiento de trasplante), siendo precisamente estos pacientes jóvenes, los casos de SMD candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos.
- ii) Es un grupo de pacientes relativamente importante en número, que supera a los casos secundarios a insuficiencia medular congénita.
- iii) En estos pacientes, las implicaciones del consejo genético, a ellos y a sus familiares están por definir y no han sido abordadas hasta el diagnóstico del SMD.

Consideramos que la descripción de esta categoría sigue siendo incompleta por haber sido generada a partir de grandes estudios que incluían pacientes con características muy heterogéneas y sin caracterización funcional de las variantes. Nuestra hipótesis es que existen genes no descritos hasta la fecha como predisponentes a desarrollar SMD y asociaciones entre el fenotipo clínico y el genotipo a caracterizar.

## 2.2. Objetivos

### *Principal*

Caracterización integral de las variantes germinales potencialmente predisponentes a SMD, en una cohorte nacional y multicéntrica, de pacientes adultos diagnosticados a una edad temprana sin enfermedad previa.

### *Específicos*

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

#### Capítulo I

- i) Detección y categorización de las variantes germinales potencialmente predisponentes a SMD en la cohorte global.
- ii) Determinación de las variantes adquiridas y patrones de coocurrencia con las variantes germinales.
- iii) Determinar asociaciones relevantes entre el genotipo y el fenotipo clínico.

#### Capítulo II

- i) Caracterización de las variantes germinales en los genes de la vía del *mismatch* de la reparación del ADN.
- ii) Validación funcional de las variantes germinales de la vía del *mismatch*.
- iii) Determinar asociaciones relevantes entre el genotipo y el fenotipo clínico.





**Capítulo I: “Caracterización genómica  
mediante secuenciación de alto  
rendimiento de una cohorte nacional de  
pacientes adultos diagnosticados de  
SMD/LMMC a edad temprana sin  
disfunción orgánica previa”**



### 3.1. Introducción

Los SMD son definidos por la OMS como una enfermedad clonal del tejido hematopoyético caracterizada por una incapacidad para generar células sanguíneas de manera adecuada, lo que se manifiesta a nivel clínico como citopenias periféricas y un mayor riesgo de transformación a LMA.<sup>3</sup>

Los SMD *de novo* se presentan habitualmente en edades avanzadas, con una media de 72-75 años. Al igual que con otras enfermedades malignas prevalentes en edad avanzada, la explicación patogénica se ha centrado en la adquisición progresiva de variantes somáticas a lo largo de la vida del paciente.<sup>120</sup> En el extremo opuesto, los SMD que se originan en niños y adolescentes se asocian, con una mayor frecuencia, a la presencia de variantes germinales predisponentes.<sup>121</sup>

El desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento nos ha mostrado, entre otros hallazgos inesperados, que una proporción de los casos con LMA y/o SMD diagnosticados en el adulto también presentan variantes germinales potencialmente predisponentes. Ello ha sido reconocido por la OMS, con la creación de una nueva categoría en su clasificación revisada de las neoplasias mieloides: neoplasias mieloides con predisposición germinal.<sup>3</sup> Esta nueva categoría considera tres grupos principales: i) las neoplasias mieloides con predisposición germinal sin enfermedad o alteración orgánica previa, ii) con trastorno plaquetar previo, iii) asociadas con síndromes de fallo medular congénito y/o las enfermedades de la biología de los telómeros. En este trabajo, nos centramos en el primero de los grupos, en el que, a la fecha de la publicación de la clasificación de la OMS, sólo estaba incluido un solo gen predisponente a SMD, *DDX41*.<sup>3</sup>

La relevancia práctica de determinar qué pacientes presentan estas mutaciones es crítica. Son, precisamente, los pacientes jóvenes con SMD los candidatos a recibir el único tratamiento curativo, el alo-TPH. Siempre que se pueda elegir un donante compatible, se elige a un hermano. Las células madre del familiar tienen muchas probabilidades de haber heredado también esa susceptibilidad a enfermar, y ello podría explicar los fallos de injerto, complicaciones pulmonares o, incluso, el desarrollo de un nuevo SMD o leucemia en las células donadas por ese hermano compatible.<sup>265-267</sup>

En adultos jóvenes con SMD, el acondicionamiento previo al trasplante se realiza habitualmente con quimioterapia de altas dosis (mieloablativo). Sin embargo, la presencia de variantes heredadas en determinadas vías, como las implicadas en la reparación del ADN, otorga una especial susceptibilidad al desarrollo de segundos tumores, siendo un grupo en el que se deberían evitar los citotóxicos a dosis altas, tal y como se lleva a cabo en los pacientes con disqueratosis congénita.<sup>268</sup> Finalmente, dentro de los factores relevantes a nivel clínico, destacamos el consejo genético, tanto al paciente como a los familiares, con implicaciones en el manejo de los primeros y en el seguimiento de los segundos.<sup>188</sup>

## **3.2. Pacientes, materiales y métodos**

### *Pacientes y variables clínicas*

Tras aprobación por la junta directiva del Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) en 2014, se reclutaron los pacientes que cumplían los siguientes criterios:

1. Diagnóstico de SMD o LMMC según la clasificación OMS.
2. Edad al diagnóstico entre los 16 y 60 años.
3. Ausencia de enfermedad previa o alteración orgánica que hiciera sospechar la presencia de un síndrome congénito subyacente no diagnosticado.
4. Ausencia de tratamiento quimioterápico y/o radioterápico previo por otro tipo de cáncer, que pudiera ser la causa del desarrollo del SMD.

Entre 2014 y junio de 2021, se reclutaron 209 casos, procedentes de 28 centros, hospitales e institutos de investigación integrantes del GESMD. La revisión anual de la evolución de los pacientes por parte de los investigadores del proyecto, llevó a la exclusión de 15 casos: 4 casos por haber recibido quimioterapia previa, 1 caso por presencia de hipoacusia leve desde la infancia, y 10 casos en los que la revisión de la clínica y el estudio medular llevó a la exclusión del diagnóstico de SMD/LMMC. Finalmente, se incluyeron 194 pacientes procedentes de los siguientes centros (Tabla 13).

**Tabla 13.** Centros participantes del GESMD.

<b>CENTRO</b>	<b>CIUDAD</b>
<i>Hospital Morales Meseguer</i>	<b>Murcia</b>
<i>Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca</i>	<b>Murcia</b>
<i>Hospital General Universitario Santa Lucía</i>	<b>Cartagena</b>
<i>Hospital Rafael Méndez</i>	<b>Lorca</b>
<i>Hospital Universitario y Politécnico La Fe</i>	<b>Valencia</b>
<i>Hospital Clínico Universitario de Valencia</i>	<b>Valencia</b>
<i>Hospital Arnau de Villanova</i>	<b>Valencia</b>
<i>Instituto de investigación Josep Carreras</i>	<b>Badalona</b>
<i>Hospital Germans Trias i Pujol</i>	<b>Badalona</b>
<i>Hospital Clínico de Barcelona</i>	<b>Barcelona</b>
<i>Hospital General de Hospitalet</i>	<b>Hospitalet</b>
<i>Hospital Vall d'Hebron</i>	<b>Barcelona</b>
<i>Hospital Universitario Son Espases</i>	<b>Palma de Mallorca</b>
<i>Hospital Josep Trueta</i>	<b>Girona</b>
<i>Hospital Universitario de Cabueñes</i>	<b>Gijón</b>
<i>Hospital Universitario Central de Asturias</i>	<b>Oviedo</b>
<i>Hospital Universitario Cruces</i>	<b>Barakaldo</b>
<i>Complejo Hospitalario de Navarra</i>	<b>Navarra</b>
<i>Hospital de Basurto</i>	<b>Bilbao</b>
<i>Hospital Clínico Universitario de Salamanca</i>	<b>Salamanca</b>
<i>Hospital de León</i>	<b>León</b>
<i>Hospital de Hellín</i>	<b>Hellín</b>
<i>MD Anderson Cancer Center</i>	<b>Madrid</b>
<i>Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz</i>	<b>Madrid</b>
<i>Hospital de Jerez de la Frontera</i>	<b>Cádiz</b>
<i>Hospital Virgen de las Nieves</i>	<b>Granada</b>
<i>Hospital Clínico de San Cecilio</i>	<b>Granada</b>
<i>Hospital Costa del Sol</i>	<b>Marbella</b>

Se recogieron 107 variables que se encuentran detalladas en el cuaderno de recogida de datos (CRD) incluido en el anexo II. A modo de resumen, las variables pertenecían a los cinco grupos principales que quedan reflejados en la tabla 14.

**Tabla 14.** Variables demográficas, clínicas y de laboratorio.

DEMOGRÁFICAS	TRATAMIENTO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sexo</li> <li>• Fecha de nacimiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soporte transfusional</li> <li>• Tratamientos modificadores de la enfermedad (quimioterapia, hipometilantes, lenalidomida y otros)</li> <li>• Otros tratamientos (AEEs, G-CSF y otros)</li> <li>• Alo-TPH (fecha, características del donante, paciente y datos de evolución y complicaciones postrasplante)</li> </ul>
ANTECEDENTES	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Personales (hemopatías y neoplasia oncológica sincrónicas)</li> <li>• Familiares (hemopatías y neoplasia oncológica sincrónicas)</li> </ul>	
AL DIAGNÓSTICO	EVOLUCIÓN
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fecha de diagnóstico</li> <li>• Presencia de hepatomegalia y/o esplenomegalia</li> <li>• Valores de laboratorio (hemograma, VSG, LDH, ferritina, eritropoyetina sérica)</li> <li>• Estudio medular, citogenético, índices pronósticos (IPSS, IPSS-R, WPSS, CPSS), clasificación OMS y FAB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Progresión a LMA (fecha, citogenética)</li> <li>• Fecha de último seguimiento</li> <li>• Situación en el último seguimiento</li> </ul>

**Abreviaturas:** VSG, velocidad de sedimentación globular; LDH, lactato deshidrogenasa; IPSS, Índice pronóstica internacional; IPSS-R, IPSS revisado; WPSS, Índice pronóstico según OMS; AEEs, agentes estimulantes de la eritropoyesis; G-CSF, factores estimulantes de las colonias de granulocitos; Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; LMA, leucemia mieloblástica aguda; FAB, Franco-Americana-Británica.

### *Secuenciación de alto rendimiento del exoma*

#### a) Obtención y procesamiento de las muestras

De cada paciente reclutado se extrajo de sangre periférica (SP): 12 ml en tubos con EDTA, 4 ml en un tubo con heparina de litio y, adicionalmente, se obtuvo dos hisopos de saliva/mucosa oral. Las muestras fueron procesadas en nuestro centro entre 24 a 36 horas desde su extracción para aquellas muestras procedentes de centros distintos al Hospital Universitario Morales Meseguer. Las muestras de nuestro centro fueron procesadas dentro de las 12 horas desde la extracción.

#### b) Obtención de tejido germinal y tumoral

##### b.1. Se obtuvo ADN de origen germinal mediante dos aproximaciones:

- Mediante inmunoselección positiva de células nucleadas CD3 positivas, a partir de SP.
- A partir del material celular de saliva y mucosa oral.

##### b.2. Se obtuvo el tejido tumoral por inmunoselección de los elementos celulares CD15 positivos de SP.

Se procedió a la separación inicial de los 12 ml de sangre periférica de los tubos con EDTA, usando HISTOPAQUE®-1077 (SIGMA, San Luis, MO, EEUU) para diferenciar tres capas: plasma, fracción mononuclear y fracción de hematíes-segmentados. Posteriormente, se procedió a la inmunoselección positiva de la fracción celular CD3 positiva de la capa mononuclear, con microesferas magnéticas específicas para CD3 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NW, Alemania) y separación celular con el equipo automatizado autoMACS® Pro Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NW, Alemania). Se aisló la fracción CD15+ de la capa hematíes-segmentados.

c) Aislamiento de ADN

Se realizó extracción manual de ADN mediante método de precipitación con reactivos de Qiagen® (Germantown, MD, EEUU). La cantidad y calidad se evaluó mediante espectrofotometría, utilizando NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). En el caso de la extracción del ADN del material celular de los hispos, utilizamos el mismo protocolo con la salvedad de una fase previa de lisado celular con proteinasa K e incubación 55°C por 18-24 horas.

d) Secuenciación del exoma completo

d.1. Preparación de las muestras: Se realizó un control de calidad previo a la construcción de la librería y una nueva cuantificación del ADN.

d.2. Construcción de la librería: Las librerías a secuenciar se generaron utilizando la tecnología WES Sure SelectXT (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU) y el protocolo “SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Version B.2, abril de 2015.

d.3. Secuenciación: Una vez preparado el *pool* de las librerías, esa mezcla se cargó en un cartucho específico para proceder a la secuenciación masiva en el secuenciador Novaseq 6000 (Illumina, San Diego, CA, EEUU). Las lecturas obtenidas fueron de tipo *paired-end* (2x150pb), con una profundidad media por nucleótido de 100 lecturas, generando aproximadamente 10-15 GB por muestra.

d.4. Análisis de los datos de secuenciación masiva: El secuenciador Illumina reproduce datos en imágenes y un análisis en tiempo real mediante un software integrado (RTA, por sus siglas en inglés) que permite, de manera paralela a la secuenciación, controles de calidad sistemáticos, análisis y detección de bases. Los resultados se presentan como datos binarios de BCL (*base calls*), los cuales son convertidos en archivos FASTQ, utilizando el paquete de Illumina, bcl2fastq. El control de calidad de los datos en crudo se expresa en el porcentaje de bases CG y el índice Q30 (probabilidad de 1 error en 1000 bases detectadas), los cuales se mantuvieron en torno al 50% y al 95%, respectivamente.

Brevemente, el análisis consta de dos partes:

- **Análisis automatizado:**

Se realiza el ensamblaje de las lecturas y el alineamiento contra el genoma de referencia (CRCh37.p13). Utilizando el algoritmo informático de Burrows-Wheeler Aligner (BWA v0.7.12).<sup>269</sup> Posteriormente, empleamos el paquete informático Genome Analysis ToolKit (GATK v3.1-1) para el procesamiento tras el alineamiento, que incluye la identificación de duplicados por errores de PCR, y la recalibración de la calidad de cada base detectada. Los archivos resultantes (BAM), fueron analizados para la detección de variantes. La herramienta empleada fue el paquete “GATK Haplotype Caller”. Finalmente, la anotación se realizó mediante la herramienta informática ANNOVAR, enlazando a la información de distintas bases poblacionales como “HapMap Consortium”, “The Genome Reference Consortium” o “1000 Genome Project. Phase 3”, mediante los que obtuvimos la frecuencia alélica menor (MAF) de cada variante. Además, con el proceso de anotación, determinamos el cambio aminoacídico, el tipo de variante resultante, y su categorización como polimorfismo de nucleótido único en las bases dbSNP, en sus versiones 148-151.

El filtrado de las variantes, en su fase automatizada, incluyó:

- Filtrado inicial: para las muestras germinales tuvimos aquellas variantes con 10 o más lecturas, una frecuencia alélica de la variante de más del 40% y que presentaran un  $MAF < 1\%$ . Excluimos las variantes sinónimas e intrónicas. Para las variantes somáticas, establecimos como condiciones iniciales que estuvieran cubiertas por 15 o más lecturas

y que la frecuencia del alelo variante supusiera más del 10% en esa posición, que no fueran sinónimas, y que su MAF<1%.

- Filtrado final: Las variantes anotadas como dbSNP fueron excluidas, excepto las pertenecientes a la lista de genes candidatos (ver información suplementaria, página 195-197), que fueron examinadas de manera individual.

- **Análisis manual:**

Las variantes fueron revisadas y priorizadas en función de las siguientes condiciones:

i) Eliminación de las variantes atribuibles a errores de secuenciación.

En total, las muestras fueron procesadas en carreras distintas en la plataforma Illumina. En cada carrera fue posible detectar variantes recurrentes, que no aparecían en el resto de las carreras, y provocadas por errores de secuenciación. Estas variantes idénticas, consideradas errores, se detectaron en exomas de una única tanda en más del 20% de las muestras incluidas, sin que ninguna de ellas hubiera sido descrita en la literatura previa como recurrente en neoplasia mieloide.

ii) Filtrado manual.

- Germinales: Se seleccionaron aquellas variantes que pertenecieran a una lista de candidatos a genes predisponentes (n=416). Incluimos esta lista en la información suplementaria (páginas 195 y 196). Brevemente, la inclusión de genes en esta lista se motivó en función de que hubieran sido descritos como predisponentes a neoplasia hematológica o tumor sólido, que pertenecieran a la vía de reparación del ADN y/o que hubieran sido descritos como mutados de manera recurrente en neoplasia mieloide. Para la categorización del potencial efecto deletéreo de las variantes germinales, utilizamos una serie de herramientas informáticas (tabla suplementaria 1). La lista resultante de variantes seleccionadas fue categorizada de acuerdo a los criterios de la Escuela Americana de Genética Clínica / Asociación de patólogos moleculares (ACMG / AMP).<sup>270</sup>

- Somáticas: Las variantes adquiridas fueron seleccionadas si estaban incluidas en una lista de genes (información suplementaria, ver página 197) que incluía a aquellos comunicados como recurrentemente mutados en las neoplasias mieloides y que, además, no se detectaran en el exoma germinal pareado. Definimos como variante

recurrentemente mutada a aquella que había sido comunicada por más de un autor en las principales bases de datos (COSMIC, IARC *TP53*, CLINVAR).

iii) Predicción *in silico* de la patogenicidad de las variantes.

Para la predicción *in silico* de la patogenicidad de cada una de las variantes germinales encontradas, se utilizaron 13 herramientas bioinformáticas distintas (Polyphen2, SIFT, CADD, Provean, VESTv4, FATHMM-MKL, GERP++, CONDEL, GAVIN/CAPRICE, Mutation Assessor, Mutation Taster, REVEL, LoFtool) (Tabla suplementaria 1). Las valoraciones de las escalas son aportadas en varias de las tablas de este trabajo, priorizando las metaescalas CADD y REVEL. La mayoría de los autores estiman que el potencial deletéreo de una variante es más probable si la puntuación otorgada por CADD es de 20 puntos o más y la otorgada por REVEL de 0,5 o superior. Sin embargo, la categorización de las variantes germinales con el objetivo de que fuera coherente en todos los casos, se realizó mediante la herramienta informática basada en la página web, *VARSOME* (<https://varsome.com/>) que, además, categoriza también las variantes con la información procedente de estos predictores *in silico*.

### ***Análisis Estadístico***

Los resultados de las variables categóricas se presentan como porcentajes o proporciones. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de las variables continuas paramétricas y ordinales. En los casos con una  $p \geq 0,05$  se empleó la media y desviación estándar (DE); para las variables con  $p < 0,05$ , la mediana y el rango intercuartílico (RIQ).

Para las comparaciones entre grupos se utilizó el método de la *t-student* para las variables continuas con distribución normal y el test de Mann-Whitney para aquellas de distribución anormal. En cuanto a las variables categóricas, se utilizó el test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, según el tamaño de las subcategorías en la tabla de contingencia.

Además, se realizó una correlación en función del tiempo, para los valores predictivos de SG y supervivencia libre de progresión a LMA (SLP), mediante el

modelo de regresión de Cox. Aquellas variables que alcanzaron una  $p < 0,150$  en la regresión univariante fueron consideradas para el posterior análisis multivariante.

Para la dicotomización de las variables continuas se determinó el valor del área bajo la curva, analizando la *receiver operating characteristic curve* (curva ROC), y se seleccionó el valor con mejor tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y menor tasa de falsos positivos (1-especificidad).

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS 21.0 (SPSS, Inc; Chicago, IL, EEUU). Para la representación gráfica de los datos se utilizaron, además, las herramientas Excel Office 2010 (Microsoft, Redmond, WA, EEUU), GraphPrism, versión 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, EEUU) y R software, versión 4.1.0 (GNU Project).

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Características clínicas y de laboratorio

##### *Cohorte Global*

Se incluyeron 194 pacientes, que presentaron una mediana de edad al diagnóstico de 49 años (RIQ, 40-55) y con un ligero predominio del género femenino (55%). La tabla 15 muestra las principales características al diagnóstico de los 177 (91%) pacientes con SMD y de los 17 (9%) con LMMC.

**Tabla 15.** Características principales al diagnóstico de la cohorte total (N=194) y agrupadas en función del diagnóstico de SMD o LMMC.

VARIABLE	TOTAL	SMD (n=177)	LMMC (n=17)	#p
Edad al diagnóstico, años, mediana (RIQ)	49 (40-55)	49 (39 - 55)	53 (46 - 56)	0,077
Género (F/M), %	55 / 45	56 / 44	41/ 59	0,250
Leucocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	3,9 (2,5 – 5,7)	3,5 (2,5 - 5,2)	12 (5,9 - 20,7)	<0,001
Neutrófilos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	1,5 (0,8 -2,9)	1,4 (0,8 - 2,6)	7,8 (1,7- 12,4)	0,001
Monocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	0,4 (0,2 – 0,7)	0,3 (0,2 - 0,5)	2,3 (1,5-3,6)	<0,001
Hemoglobina, g/dl, media ± DE	10,6 ± 2,7	10,5 ± 2,7	11,4 ± 2,0	0,207
VCM, fl, media ± DE	98,2 ± 11,5	98,6 ± 11,5	93,5 ± 10,5	0,126
Plaquetas, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	106 (58,1 – 222)	105 (57 - 222)	109 (74-243,5)	0,322
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	16,0	12,8	46,7	0,001
<b>Clasificación OMS 2016, %</b>				
• SMD-DU		16,0		
• SMD-DM		32,5		
• SMD-SA		12,4		
• SMD-EB1		14,8		
• SMD-EB2		16,0		
• SMD-del(5q) aislada		6,5		
• SMD-inclasificable		1,8		
• LMMC-0			5,9	
• LMMC-1			35,3	
• LMMC-2			58,8	
• Porcentaje de blastos, mediana (RIQ)	3 (1-7)	3 (1-7)	6 (2,5-9)	0,041
• Citogenética y/o FISH anormal, %	32,8	33,8	23,5	0,393

**Nota:** #comparación entre SMD y LMMC. **Abreviaturas:** SMD, síndrome mielodisplásico; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; F, femenino; M, masculino; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; OMS, Organización Mundial de la Salud; SMD-DU, SMD con displasia unilínea; SMD-DM, SMD con displasia multilinea; SMD-SA, SMD con sideroblastos en anillo; SMD-EB-1, SMD con exceso de blastos tipo-1; SMD-EB-2, SMD con exceso de blastos tipo-2; FISH, hibridación de fluorescencia *in situ*.

Los pacientes con LMMC presentaron una menor edad al diagnóstico que los de SMD (49 vs. 53 años,  $p=0,077$ ), pero sin que esta diferencia alcanzara la significación estadística. Encontramos las diferencias significativas esperables entre el grupo de SMD y de LMMC, motivadas por: criterios diagnósticos (mayor número de monocitos), y enfermedad más avanzada (más de 50% de los pacientes con LMMC, incluidos en este estudio, pertenecían a la LMMC tipo 2).

Los criterios de inclusión en este estudio descartaban aquellos casos con enfermedad previa, incluyendo neoplasias. Sin embargo, encontramos casos en los que el diagnóstico de SMD se acompañó de la detección de una neoplasia sincrónica. En cuanto a los antecedentes familiares, no encontramos un mayor porcentaje de tumores sólidos en uno de los dos grupos estudios (18,6% en SMD vs. 13,3% en LMMC,  $p=0,616$ ) (Tabla 16).

**Tabla 16.** Antecedentes personales y familiares de la cohorte total (N=194) y agrupadas en función del diagnóstico de SMD o LMMC.

VARIABLE	TOTAL	SMD (n=177)	LMMC(n=17)	#p
<b>Historia personal, %</b>				
• Neoplasia oncológica sincrónica	4,5	4,9	0	0,380
• Neoplasia hematológica linfoide sincrónica	2,8	3,1	0	0,491
• Neoplasia hematológica mieloide sincrónica	1,1	0,6	6,7	0,162
• Hemopatía no neoplásica	0,6	0,6	0	1,000
<b>Antecedentes familiares, %</b>				
• Neoplasia oncológica	18,1	18,6	13,3	0,616
• SMD/LMA	9,3	10,3	0	0,192
• Otras neoplasias hematológicas mieloides	0,6	0	6,7	1,000
• Neoplasia hematológica linfoide	0,6	0,7	0	1,000

Nota: #comparación entre SMD y LMMC.

Abreviaturas: SMD, síndrome mielodisplásico; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; LMA, leucemia mieloblástica aguda.

En cuanto a la estrategia terapéutica, un 43,8% del total de la cohorte recibió tratamiento modificador del curso de la enfermedad y un 23,6%, tratamiento de soporte

(incluyendo los factores de crecimiento), siendo estos porcentajes similares tanto en SMD como en LMMC. Las diferencias encontradas son las que podríamos esperar habida cuenta de las diferencias clínicas específicas de cada grupo: las citopenias más profundas en los SMD llevaron a un uso mayor de AEEs y de G-CSF. En cuanto al tratamiento modificador, el uso de agentes hipometilantes fue similar entre ambos grupos, y destacamos el mayor porcentaje de pacientes con LMMC que recibió quimioterapia intensiva y que fueron sometidos a un alo-TPH, lo que atribuimos a una mayor proporción de pacientes de alto riesgo en este grupo (Tabla 17).

**Tabla 17.** Datos de los tratamientos recibidos en la cohorte total (N=194).

VARIABLE	TOTAL	SMD (n=177)	LMMC(n=17)	#p
• Exclusivamente tratamiento de soporte*, %	23,6	23,6	23,5	0,995
<b>Tratamiento modificador, %</b>				
• Lenalidomida	6,2	6,8	0	0,266
• Hipometilantes, sólo o en combinación**	25,4	25,0	29,4	0,691
• Quimioterapia	10,8	10,1	17,6	0,338
• Alo-TPH	31,5	29,9	47,1	0,147

**Nota:** #comparaciones entre el grupo SMD y LMMC. \* Incluye transfusión de hemoderivados y factores de crecimientos; \*\* 5-azacitidina +/- venetoclax.

**Abreviaturas:** SMD, síndromes mielodisplásicos; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; AEEs, agentes estimulantes de la eritropoyesis, G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos; Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

En cuanto al uso de factores de crecimiento (Tabla 18), el porcentaje de pacientes tratados fue similar en ambos grupos, con la excepción de una tendencia estadística a un uso más frecuente de G-CSF en los pacientes con SMD, lo que no deja de ser un reflejo del mayor grado de neutropenia en estos.

**Tabla 18.** Tratamiento con factores de crecimiento en la cohorte total (N=194).

VARIABLE	TOTAL	SMD (n=177)	LMMC(n=17)	#p
<b>Uso de factores de crecimiento</b>				
• AEEs	25,7	26,6	17,6	0,423
• G-CSF	13,8	15,3	0	0,083
• Eltrombopag	5,7	5,7	5,9	0,970

**Nota:** # comparaciones entre el grupo SMD y LMMC.

**Abreviaturas:** SMD, síndrome mielodisplásico; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; AEEs, agentes estimulantes de la eritropoyesis, G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos.

En la tabla 19, se muestran las características generales de los pacientes que fueron sometidos a un alo-TPH (n=57). Brevemente, las principales diferencias entre ambos grupos la atribuimos a un mayor porcentaje del uso de acondicionamiento de intensidad reducida en el grupo de LMMC.

**Tabla 19.** Datos del alo-TPH de la cohorte total (N=194).

VARIABLE	TOTAL	SMD (n=49)	LMMC(n=8)	#p
Edad al alo-TPH, años, mediana (RIQ)	50 (45-56)	50 (45-56)	53 (45-55)	0,973
Género, F/M, %	47,3 / 52,7	49,0 / 51,0	37,5 / 62,5	0,549
RC/RP al alo-TPH, %	52,7	53,2	50	1,000
<b>Características del donante,</b>				
• Emparentado, %	47,3	48,9	37,5	0,478
• Edad, años, mediana (RIQ)	31 (24-49)	37 (24-51)	25 (20-42)	0,121
• Género, F/M, %	28 / 72	33,3 / 66,7	0 / 100	0,054
• HLA idéntico, %	71,2	70,5	75	0,794
<b>Fuente de progenitores hematopoyéticos, %</b>				
• Sangre periférica	93,8	92,5	100	
• Médula ósea	2,1	2,5	0	0,726
• Cordón umbilical	4,2	5,0	0	
Tipo de acondicionamiento, IR vs. MA, %	45,1 vs. 54,9	41,9 vs. 58,1	62,5 vs. 37,5	0,281
Fallo de movilización en potencial donante familiar, %	0	0	0	---
Fallo de injerto, %	11,8	9,3	25	0,242
Injerto de neutrófilos, días media ± DE	21 ± 23	21 ± 25	19 ± 6	0,805
Injerto de plaquetas, días media ± DE	26 ± 31	28 ± 33	15 ± 6	0,385
EICR aguda, %	58	55,8	85,7	0,438
EICR crónica, %	32,7	36,7	14,3	0,263
Síndrome sinusoidal hepático, %	6,1	7,1	0	1,000
Complicaciones pulmonares, %	8,2	7,1	14,5	0,523
<b>Mejor respuesta tras alo-TPH, %</b>				
• RC	78,7	80	71,4	
• Enfermedad estable	17	15	28,6	0,591
• Progresión / Recaída	4,3	5	0	

**Nota:** # comparaciones entre el grupo SMD y LMMC.

**Abreviaturas:** SMD, síndrome mielodisplásico; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; RIQ, rango intercuartílico; RC, respuesta completa; RP, respuesta parcial; Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; F, femenino; M, masculino; HLA, antígeno leucocitario humano (por sus siglas en inglés); IR, intensidad reducida; MA, mieloablativo; EICR, enfermedad de injerto contra receptor; DE, desviación estándar.

En cuanto al seguimiento, los pacientes con LMMC mostraron un mayor porcentaje de progresión a LMA y menor SLP, en concordancia con la mayor proporción de pacientes con enfermedad más avanzada (LMMC-2), pero sin repercusión sobre la SG, siendo similar a los pacientes con SMD (Tabla 20).

**Tabla 20.** Datos de progresión a LMA y situación en último seguimiento de la cohorte total (N=194). Las celdas sombreadas corresponden a los datos de análisis de supervivencia censurando el seguimiento de los pacientes trasplantados por la fecha de infusión de los progenitores hematopoyéticos.

VARIABLE	TOTAL (N=194)	SMD (n=177)	LMMC (n=17)	#p
<b>Progresión a LMA, %</b>	12,6	11,6	23,5	0,156
<b>Exitus, %</b>	21,6	20,9	29,4	0,416
<b>Causa principal de exitus</b>				
• <b>Progresión</b>	5,2	5,1	5,9	0,794
• <b>Infección</b>	9,3	9,0	11,8	
• <b>Secundaria complicaciones de alo-TPH</b>	2,1	2,8	5,9	
• <b>Otras causas / Desconocida</b>	4,6	3,4	5,9	
<b>DATOS CENSURADOS A FECHA DEL ALO-TPH</b>				
• <b>Progresión a LMA, %</b>	10,4	9,7	17,6	0,254
• <b>Exitus, %</b>	11,3	12,4	0	0,123

**Nota:** # comparaciones entre el grupo SMD y LMMC.

**Abreviaturas:** SMD, síndrome mielodisplásico; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; LMA, leucemia mieloblástica aguda; DE, desviación estándar, alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; DE, desviación estándar.

### 3.3.2. Variantes germinales

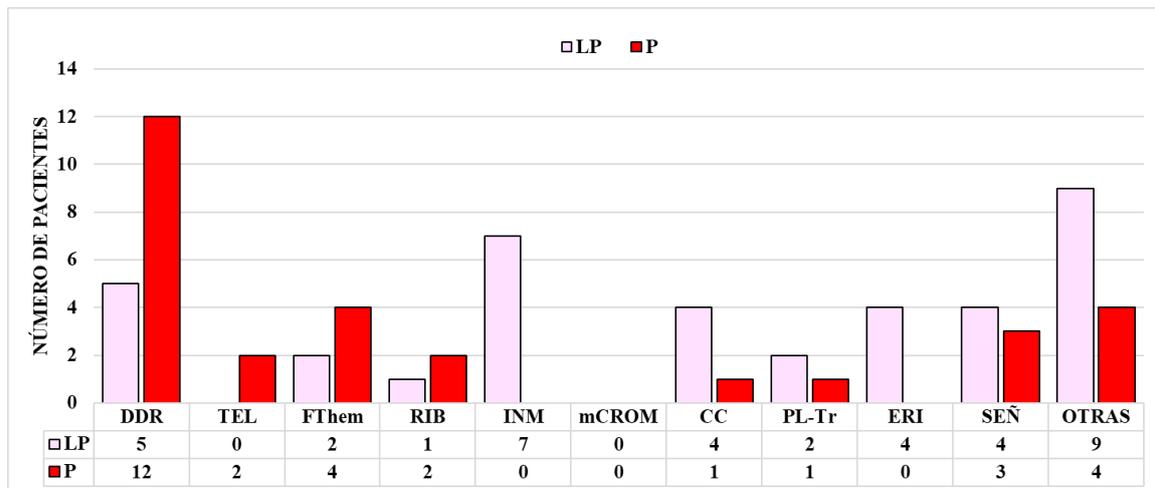
*Variantes germinales probablemente patogénicas (LP) y patogénicas (P)*

Cincuenta y cuatro pacientes de los 194 totales (27,8%) portaban, al menos, una variante germinal interpretada como LP y/o P (Figura 6).



A continuación, agrupamos las variantes germinales interpretadas como LP y P según el grupo funcional del gen afectado (Figura 7). Así, un 27,8% (n=15) se localizaban en genes de los mecanismos de reparación del ADN, un 12,9% (n=7) en genes pertenecientes a vías de señalización, un 12,9% (n=7) en los reguladores de la respuesta inmune, un 11,1% (n=6) en los factores de transcripción relacionados con la hematopoyesis, un 9,2% (n=5) en genes implicados en la proliferación, apoptosis y ciclo celular, un 5,5% (n=3) en genes implicados en el ensamblaje y el funcionamiento de los ribosomas, un 5,5% (n=3) en los reguladores de la función plaquetaria y relacionados con la trombosis, un 5,5% (n=3) en los determinantes de la biosíntesis eritroide, un 3,6% (n=3,7) en los genes implicados en la biología de los telómeros y, finalmente, un 24,1% (n=13) agrupaba otras variantes localizadas en genes no clasificables en los grupos anteriores.

**Figura 7.** Frecuencia de pacientes con variantes germinales categorizadas como LP y/o P, según la clasificación ACMG/AMP, agrupadas según vía o función (n=54).



**Abreviaturas:** **DDR**, relacionada con la respuesta al daño del ADN; **TEL**, relacionada con la función y/o mantenimiento de los telómeros; **FThem**, factores de transcripción/hematopoyesis; **RIB**, relacionado con el ensamblaje y funcionamiento de los ribosomas; **INM**, respuesta inmune; **mCROM**, modificadores de la cromatina; **CC**, Proliferación, apoptosis y ciclo celular; **PL-Tr**, Función plaquetaria y relacionado con la trombosis; **ERI**, Biosíntesis eritroide; **SEÑ**, Señales de activación; **VUS**, variante de significado incierto; **LP**, probablemente patológico; **P**, patológico.

Destacamos una mayor proporción de variantes categorizados como patológicas frente a las probablemente patológicas en los genes de los mecanismos de reparación del ADN, de la biología de los telómeros, y de los factores de transcripción relacionados con la hematopoyesis.

De manera interesante, tan solo cuatro pacientes eran portadores de variantes germinales, categorizadas como LP y P, en genes recurrentemente implicados en predisposición germinal y debut en edad temprana, sin alteraciones preexistentes: *DDX41*, *SAMD9*, *GATA2* (Tabla 21).

**Tabla 21.** Características generales y evolutivas de los pacientes portadores de variante germinal LP/P en los genes considerados, según la evidencia actual, como propios de adultos en edad temprana sin alteración preexistente.

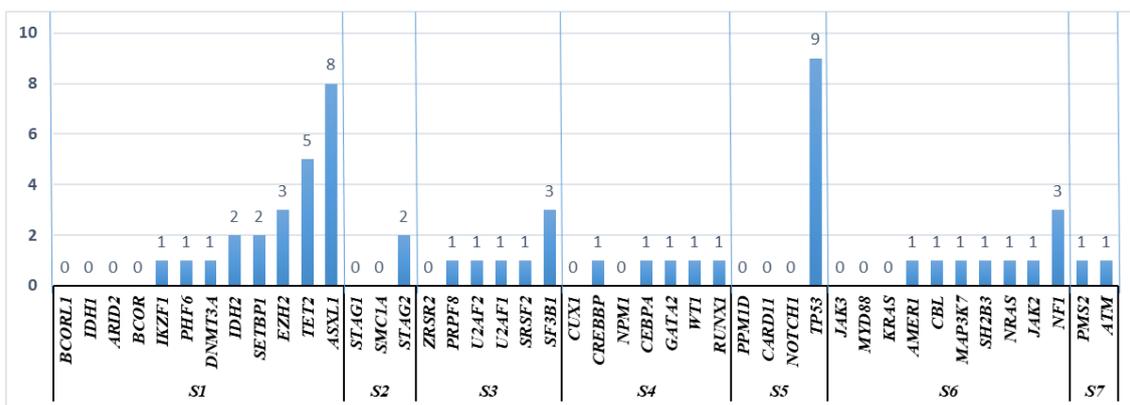
VARIABLE		VJ38	VJ48	VJ194	VJ210
Variantes germinales LP/P		<i>DDX41</i>	<i>DDX41, MSH2</i>	<i>SAMD9</i>	<i>GATA2</i>
Edad al diagnóstico, años		50	48	19	23
Género		F	F	F	F
Antecedente familiar de neoplasia	Hematológica	No	No	No	Madre con SMD
	Oncológica	Padre con cáncer de colon	No	No	No
Citopenia al diagnóstico		Neutropenia leve	Neutropenia moderada y anemia leve	Anemia moderada	Anemia leve
Clasificación OMS 2016		SMD-DM	SMD-EB2	SMD-del(5q) aislada	SMD-DM
Requerimiento de Tratamiento modificador		No	Hipometilante y alo-TPH	No	No
Progresión a LMA		No	No	No	No
<i>Exitus</i>		No	Sí	No	No
Variantes somáticas		No	<i>ASXL1</i>	No	<i>STAG2</i>
Otras variantes germinales		<i>ECHDC2, HELQ, PKD1L2</i>	<i>DOCK6, LYST, TCIRG1</i>	<i>DNAH11, ATM, HOXB13</i>	<i>CBL, ERCC4, FANCA, ADA2</i>

**Abreviaturas:** F, femenino; **SMD**, síndromes mielodisplásicos; **SMD-DM**, SMD con displasia multilineal; **SMD-EB2**, SMD con exceso de blastos tipo 2; **OMS**, Organización Mundial de la Salud; **LMA**, leucemia mieloblástica aguda; **alo-TPH**, trasplante alogénico de progenitores hematopoyético.

Treinta de los 54 pacientes portadores de variante germinal LP y/o P presentaban, al menos, una variante somática. La distribución de estas variantes somáticas según la vía funcional del gen afectado, fue como sigue (Figura 8): un 29,6% (n=16) de los pacientes adquirieron una variante en genes implicados en la modificación de la cromatina, un 16,7% (n=9) en el ciclo celular, un 13% (n=7) en el mecanismo de *splicing*, un 9,2% (n=5) en genes implicados en la señalización intracelular, un 5,5% (n=3) en los factores de transcripción, un 3,7% (n=2) en el complejo de la cohesina y,

finalmente, un 1,8% (n=1) en genes responsables de la reparación del ADN. Destacamos que, de los nueve pacientes con variantes germinales LP/P que portaban variantes somáticas en el gen *TP53* (categorizadas dentro del grupo de ciclo celular), cinco portaban también variantes germinales en genes implicados en la respuesta al daño del ADN (Figura 8). La frecuencia con la que, en nuestra cohorte, los genes habitualmente afectados en neoplasia mieloide, presentaban variantes adquiridas, resultó distinta de lo comunicado en las grandes series sin seleccionar por edad. Destacando *TP53* como el gen mutado con mayor frecuencia y el escaso protagonismo de las variantes adquiridas en los genes del mecanismo del *splicing*.

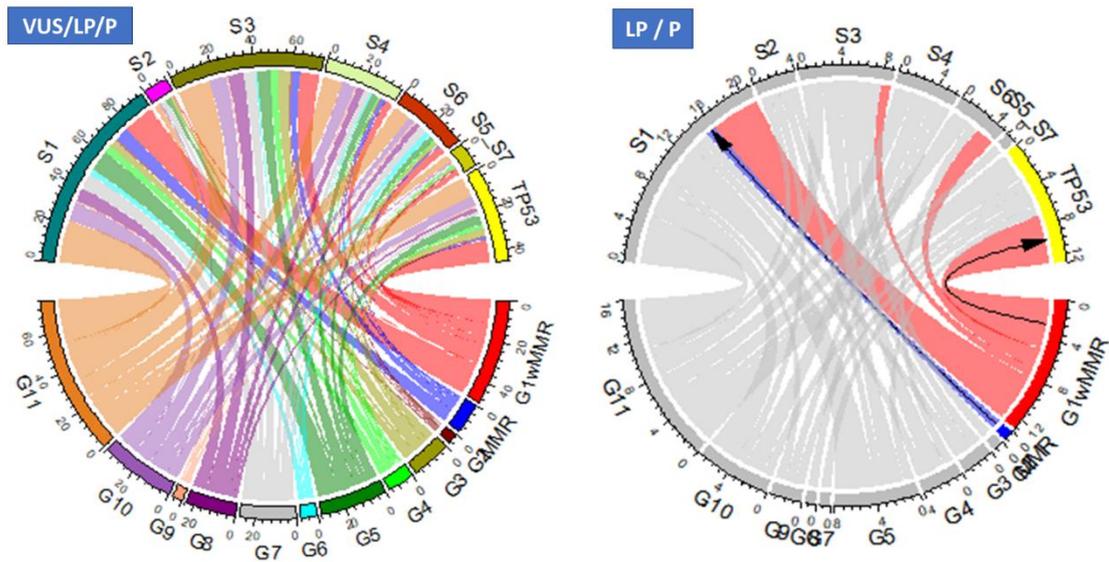
**Figura 8.** Distribución de variantes somáticas en pacientes portadores de las variantes germinales categorizadas como LP y/o P.



**Abreviaturas:** S1, modificadores de la cromatina; S2, complejo de la cohesina; S3, ARN *splicing*; S4, factores de la transcripción; S5, ciclo celular; S6, señales de activación; S7, respuesta al daño del ADN.

Los diagramas de cuerdas representados en la figura 9 incluyen aquellos pacientes que presentaban, al menos, tanto una variante germinal LP/P como una somática. Quisimos analizar con más detalle el grupo funcional afectado con mayor frecuencia por variantes germinales LP/P, la reparación de ADN. Para ello, dividimos este grupo en pacientes con variantes en la vía de reparación del *mismatch* y en pacientes con variantes en el resto de las vías de reparación del ADN. Ello nos permitió comprobar que el último grupo se asociaba, con mayor frecuencia, con variantes somáticas en genes modificadores de la cromatina y, especialmente, con *TP53* (n=5).

**Figura 9.** Coocurrencia, por grupos funcionales de genes, de variantes germinales y somáticas. A la izquierda, se incluyen variantes germinales VUS/LP/P. A la derecha, el análisis se limita a las variantes LP/P. El grosor de las líneas conectoras ilustra la frecuencia con la que las mutaciones, dentro de cada dos grupos, son detectadas en el mismo caso. Destacamos la interacción de las variantes germinales en vías de reparación de ADN *mismatch* (azul) y en otras vías de respuesta al daño del ADN (rojo), con las variantes somáticas del gen *TP53*.

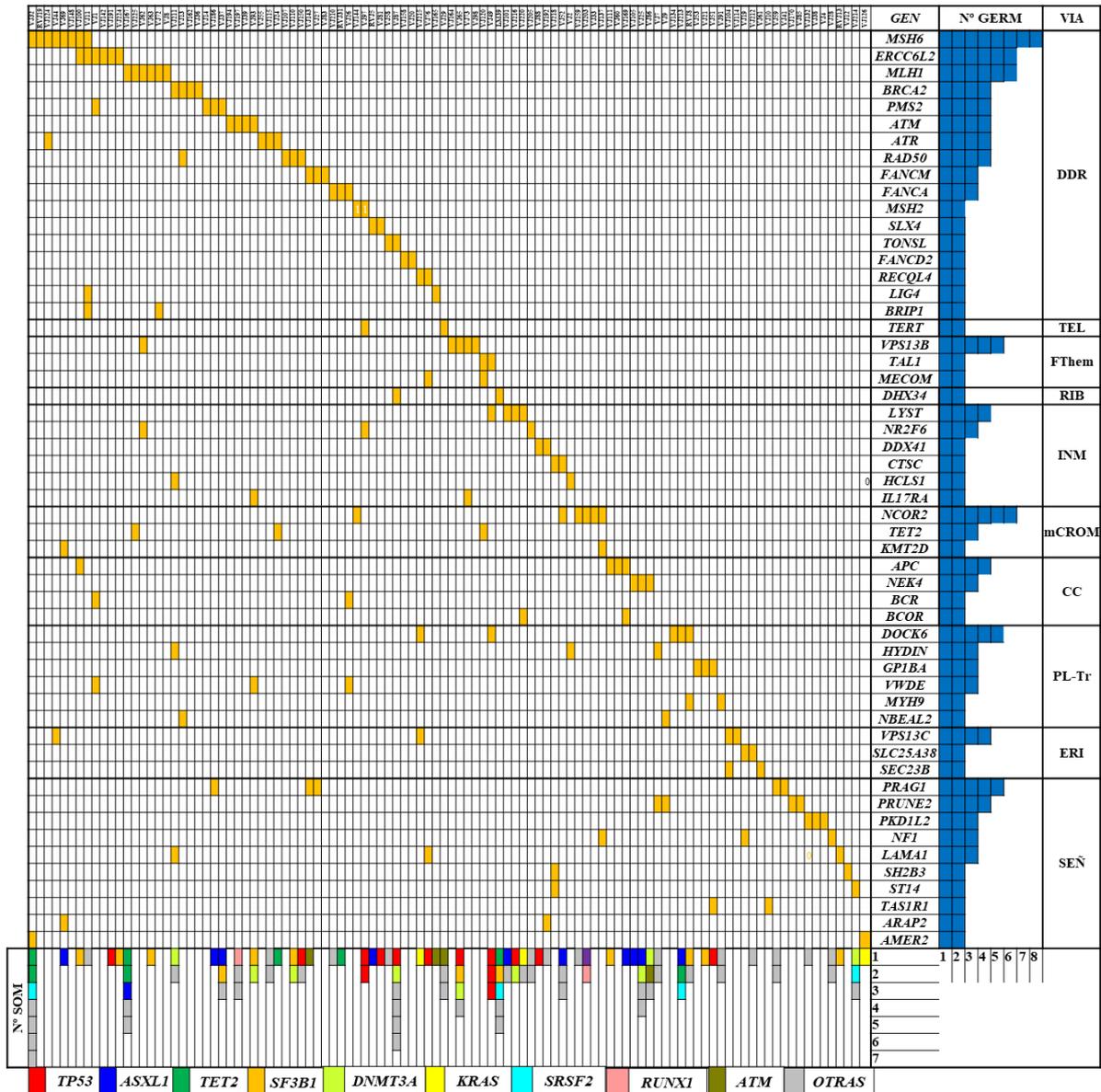


**Abreviaturas:** **G1**, relacionada con la respuesta al daño del ADN; **G2**, relacionada con la función y/o mantenimiento de los telómeros; **G3**, factores de transcripción/hematopoyesis; **G4**, relacionado con el ensamblaje y funcionamiento de los ribosomas; **G5**, respuesta inmune; **G6**, modificadores de la cromatina, **G7**, proliferación, apoptosis y ciclo celular; **G8**, función plaquetaria y relacionado con la trombosis; **G9**, biosíntesis eritroide; **G10**, señales de activación; **G11**, otras; **S1**, modificadores de la cromatina; **S2**, complejo de la cohesina; **S3**, ARN *splicing*; **S4**, factores de la transcripción; **S5**, ciclo celular; **S6**, señales de activación; **S7**, respuesta al daño del ADN; **P**, variante patogénica; **LP**, variante probablemente patogénica; **VUS**, de significado incierto.

### ***Variantes germinales de significado incierto (VUS)***

Ciento cincuenta pacientes (77,3%) portaban, al menos, una variante germinal categorizada como VUS (Figura 10).

**Figura 10.** Genes afectados por dos o más variantes categorizadas como VUS en la cohorte total. Cada línea representa un gen y cada columna un paciente. En el panel inferior, las barras verticales muestran las mutaciones somáticas totales en cada paciente. Aquellos genes afectados por variantes somáticas en seis o más casos presentan un código específico de color.

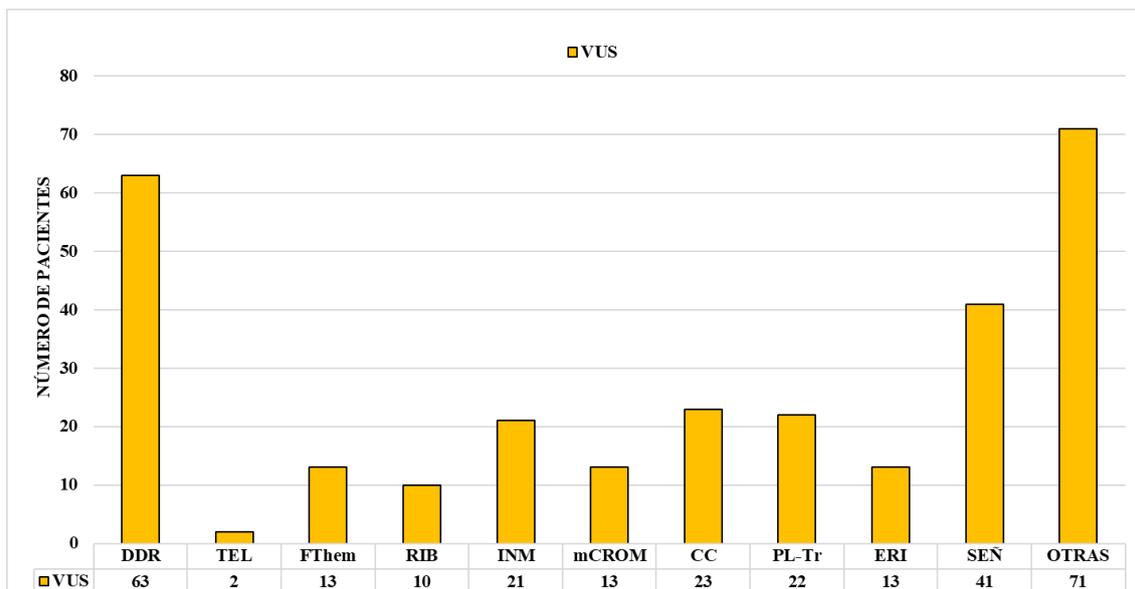


**Abreviaturas:** **DDR**, relacionada con la respuesta al daño del ADN; **TEL**, relacionada con la función y/o mantenimiento de los telómeros; **FThem**, factores de transcripción/hematopoesis; **RIB**, relacionado con el ensamblaje y funcionamiento de los ribosomas; **INM**, respuesta inmune; **CC**, proliferación, apoptosis y ciclo celular; **PL-Tr**, función plaquetaria y relacionado con la trombosis; **ERI**, biosíntesis eritroide; **SEÑ**, señales de activación; **SOM**, variantes somáticas; **GERM**, variantes germinales.

Según el grupo funcional del gen afectado, los pacientes se distribuían de la siguiente manera (Figura 11): un 42% (n=63) presentaban VUS germinales localizadas en genes de los mecanismos de reparación del ADN, un 27,3% (n=41) en

los genes pertenecientes a las vías de señalización, un 15,3% (n=23) en genes implicados en la proliferación, apoptosis y ciclo celular, un 14,7% (n=22) en los reguladores de la función plaquetaria y la trombosis, un 14% (n=21) en los reguladores de la respuesta inmune, un 8,7% (n=13) en los determinantes de la biosíntesis eritroide, un 8,7% (n=13) en los factores de transcripción relacionados con la hematopoyesis, un 8,7% (n=13) en genes implicados en la modificación de la cromatina, un 6,7% (n=10) en genes implicados en el ensamblaje y el funcionamiento de los ribosomas, un 1,3% (n=2) en los genes implicados en la biología de los telómeros y, finalmente, un 47,3% (n=71) de las variantes se localizaban en genes no clasificables en los grupos anteriores.

**Figura 11.** Frecuencia de pacientes con variantes germinales categorizadas como VUS, agrupadas según vía o función.



**Abreviaturas:** **DDR**, relacionada con la respuesta al daño del ADN; **TEL**, relacionada con la función y/o mantenimiento de los telómeros; **FThem**, factores de transcripción/hematopoyesis; **RIB**, relacionado con el ensamblaje y funcionamiento de los ribosomas; **INM**, respuesta inmune; **mCROM**, modificadores de la cromatina; **CC**, proliferación, apoptosis y ciclo celular; **PL-Tr**, función plaquetaria y relacionado con la trombosis; **ERI**, biosíntesis eritroide; **SEÑ**, señales de activación; **VUS**, variante de significado incierto; **LP**, probablemente patológico; **P**, patológico.

De manera llamativa, la distribución de las variantes VUS fue similar a la encontrada en las variantes LP/P. También se observó que las variantes germinales VUS afectaban con mayor frecuencia a los genes de la reparación del ADN y de señalización intracelular.

Destacamos que cuatro de los pacientes eran portadores de variantes germinales, categorizadas como VUS, en genes recurrentemente implicados en predisposición germinal y debut en edad temprana, sin alteraciones preexistentes: *DDX41*, *SAMD9L* y *GATA2* (Tabla 22).

**Tabla 22.** Características generales y evolutivas de los pacientes portadores de variante germinal VUS en los genes considerados, según la evidencia actual, como propios de adultos en edad temprana sin alteración preexistente.

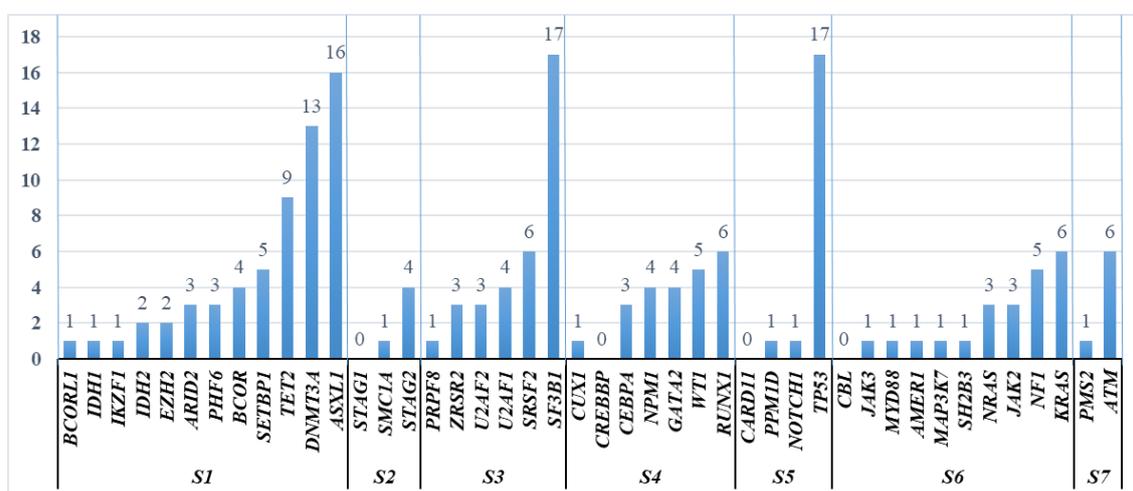
VARIABLE		VJ13	VJ88	VJ192	VJ221
Variante germinal VUS		<i>SAMD9L</i> , <i>DDX41</i>	<i>DDX41</i>	<i>DDX41</i>	<i>GATA2</i>
Edad al diagnóstico, años		52	53	49	34
Género		F	F	M	F
Antecedente familiar de neoplasia	Hematológica	No	No	No	No
	Oncológica	No	No	Padre con cáncer de estómago	No
Citopenia al diagnóstico		Neutropenia y trombocitopenia moderada	Trombocitopenia moderada	Neutropenia y trombocitopenia moderada	Anemia y Neutropenia leve, Trombopenia moderada
Clasificación OMS 2016		SMD-DM	LMMC	SMD-DM	SMD-EB1
Requerimiento de Tratamiento modificador		Alo-TPH	Hipometilante y alo-TPH	Hipometilante y alo-TPH	No hasta progresión a LMA
Progresión a LMA		No	No	No	Sí
<i>Exitus</i>		No	No	No	No
Variantes somáticas		No	<i>TP53</i>	<i>U2AF1</i>	<i>KRAS</i>
Otras variantes germinales		<i>BCL2L10</i> , <i>BRCA2</i> , <i>NBEAL2</i>	<i>HMCN1</i> , <i>HELQ</i>	<i>ARAP2</i> , <i>DNAH9</i>	<i>CILP2</i> <i>SEC23B</i>

**Abreviaturas:** F, femenino; **SMD**, síndromes mielodisplásicos; **SMD-DM**, SMD con displasia multilineal; **SMD-EB2**, SMD con exceso de blastos tipo 2; **OMS**, Organización Mundial de la Salud; **LMA**, leucemia mieloblástica aguda; **alo-TPH**, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Ochenta y ocho (58,7%) de los ciento cincuenta pacientes portadores de variante germinal VUS presentaban, al menos, una variante somática. La distribución de estas variantes adquiridas según la vía funcional del gen afectado fue la siguiente (Figura 12): un 26% (n=39) de los pacientes adquirieron una variante en genes implicados en la

modificación de la cromatina, un 21,3% (n=32) en el mecanismo de *splicing*, un 13,3% (n=20) en factores de transcripción, un 12,7% (n=19) en el ciclo celular, un 10% (n=15) en genes implicados en señalización intracelular, un 4% (n=6) en el complejo de la cohesina y, finalmente, un 4% (n=6) en genes responsables de reparación del ADN (Figura 12). Como ocurría en los pacientes con variantes germinales LP/P, la distribución de las variantes somáticas fue similar, manteniendo una alta frecuencia de variantes adquiridas en el gen *TP53*. Sin embargo, en este grupo de pacientes los genes del *splicing* sí mostraron estar mutados en frecuencia relevante.

**Figura 12.** Distribución de las variantes somáticas en pacientes portadores de variantes germinales categorizadas como VUS.

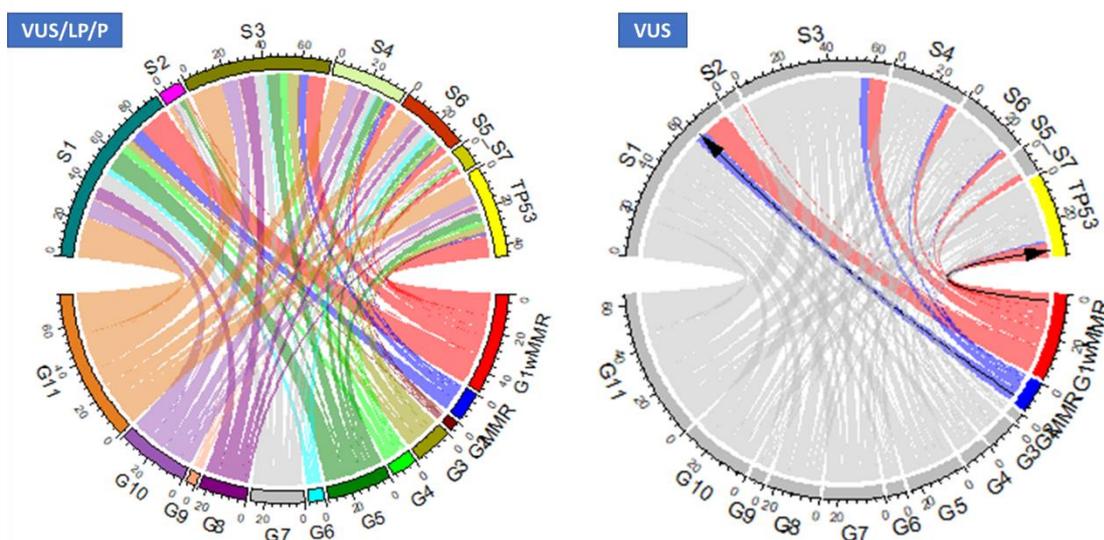


**Abreviaturas:** S1, modificadores de la cromatina; S2, complejo de la cohesina; S3, ARN *splicing*; S4, factores de la transcripción; S5, ciclo celular; S6, señales de activación; S7, respuesta al daño del ADN.

Los diagramas de cuerdas representados en la figura 13 incluyen aquellos pacientes que presentaban, al menos, tanto una variante germinal VUS como una somática. Al igual que ocurría con los pacientes con variantes germinales LP/P, quisimos analizar en más detalle el grupo funcional afectado con mayor frecuencia por variantes germinales VUS, el de la reparación del ADN. Para ello, lo dividimos en pacientes con variantes en la vía de reparación del *mismatch* y pacientes con variantes en el resto de las vías de la reparación del ADN. A diferencia de los LP/P, se observó una mayor asociación del primer grupo, las variantes VUS en MMR, con variantes adquiridas en genes modificadores de la cromatina y la vía implicada en el *splicing*. La asociación entre variantes somáticas en el gen *TP53* y germinales en genes de la vía de

reparación del ADN, fue menos evidente, dándose en siete de los diecisiete pacientes portadores de VUS germinal en genes de la reparación del ADN.

**Figura 13.** Coocurrencia, por grupos funcionales de genes, de variantes germinales y somáticas. A la izquierda, se destacan variantes germinales VUS/LP/P. A la derecha, se destacan sólo las variantes germinales categorizadas como VUS. El grosor de las líneas conectoras ilustra la frecuencia con la que las mutaciones dentro de cada dos grupos son detectadas en el mismo caso. Se destaca la interacción de las variantes germinales en la vía de reparación del ADN *mismatch* (azul) y en otras vías de respuesta al daño del ADN (rojo), con las variantes somáticas del gen *TP53*.



**Abreviaturas:** **G1**, relacionada con la respuesta al daño del ADN; **G2**, relacionada con la función y/o mantenimiento de los telómeros; **G3**, factores de transcripción/hematopoyesis; **G4**, relacionado con el ensamblaje y funcionamiento de los ribosomas; **G5**, respuesta inmune; **G6**, modificadores de la cromatina, **G7**, proliferación, apoptosis y ciclo celular; **G8**, función plaquetaria y relacionado con la trombosis; **G9**, biosíntesis eritroide; **G10**, señales de activación; **G11**, otras; **S1**, modificadores de la cromatina; **S2**, complejo de la cohesina; **S3**, ARN *splicing*; **S4**, factores de la transcripción; **S5**, ciclo celular; **S6**, señales de activación; **S7**, respuesta al daño del ADN; **P**, variante patogénica; **LP**, variante probablemente patogénica; **VUS**, de significado incierto.

### 3.3.3. Integración de los datos clínicos y moleculares

#### *Portadores de variantes germinales patogénicas y probablemente patogénicas*

Cincuenta y cuatro pacientes eran portadores de una variante germinal categorizada como LP/P (Tabla 23). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las variables al diagnóstico, aunque existía una tendencia a la

significación estadística a presentar una menor cifra de leucocitos (3,3 vs. 4,4 x10<sup>9</sup>/L, p=0,073) y a estar incluidos en las categorías de riesgo alto según el IPSS-R (42% vs. 28% con IPSS-R >3,5, p=0,068).

**Tabla 23.** Comparación de las características al diagnóstico de los pacientes con y sin variantes germinales categorizadas como LP/P.

VARIABLE	Cohorte total (N=194)	(A) Con variantes GERM LP/P (n=53)	(B) Sin variantes GERM LP/P (n=141)	P (A vs. B)
Edad al diagnóstico, años, mediana (RIQ)	49 (40-56)	49 (31-54)	49 (40-56)	0,533
Género (F/M), %	55 / 45	69,3 / 40,7	52,6 / 47,4	0,402
Leucocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	3,9 (2,5-5,7)	3,3 (2,4-4,8)	4,4 (2,6-5,9)	0,073
Neutrófilos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	1,5 (0,8-2,9)	1,3 (0,7-2,2)	1,8 (0,9-3,0)	0,124
Monocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	0,4 (0,2-0,7)	0,4 (0,2-0,7)	0,4 (0,2-0,7)	0,689
Hemoglobina, g/dl, media ± DE	10,6 ± 2,7	10,6 ± 2,5	10,6 ± 2,8	0,851
VCM, fl, media ± DE	98,2 ± 11,5	98,7 ± 11,8	98,1 ± 11,4	0,722
Plaquetas, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	106 (58,1-222)	85 (39-216)	110 (62-230)	0,154
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	296 (207-410)	309 (219-412)	291 (199-412)	0,397
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	226 (92-596)	193 (75-688)	256 (109-589)	0,704
sEPO, UI/L, mediana (RIQ)	72 (30-276)	71 (25-126)	72 (31-331)	0,464
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	16,3	11,6	17,5	0,367
Antecedentes familiares de neoplasia hematológica, %	10,6	11,6	10,2	0,839
Antecedentes familiares SMD y/o LMA, %, %	9,3	11,4	8,5	0,584
Antecedentes familiares de neoplasia oncológicas, %	18,1	23,3	16,1	0,342
Fibrosis en MO*, %	10,3	5,6	12,1	0,280
Celularidad de MO (hipo vs. normo/hiper), %	46,7 vs. 53,3	47,8 vs. 52,2	46,3 vs. 53,7	0,858
Blastos en MO, %, mediana (RIQ)	3 (1-7)	4 (1-7)	3 (1-7)	0,450
Líneas de displasia, 1 vs. 2/3, %	18,8 vs. 81,3	11,1 vs. 88,9	21,7 vs. 78,3	0,121
Citogenética y/o FISH anormal, %	32,8	36,0	31,5	0,565
Riesgo citogenético pobre/muy pobre según IPSS-R, %	23,2	26,0	22,0	0,575
IPSS-R, ≤3,5 vs. >3,5, %	68,2 vs. 31,8	58,0 vs. 42,0	72,2 vs. 27,8	0,068

Nota: \*porcentaje calculados sobre los casos que se realizó biopsia ósea.

Abreviaturas: GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisado.

Esto último se reflejaba en un mayor porcentaje de pacientes con LP/P que fallecieron en el curso del estudio (31,5% vs. 17,9 %, p=0,039) (Tabla 24).

**Tabla 24.** Comparación de los pacientes con y sin variantes germinales categorizadas como LP y/o P en relación a la evolución de la enfermedad.

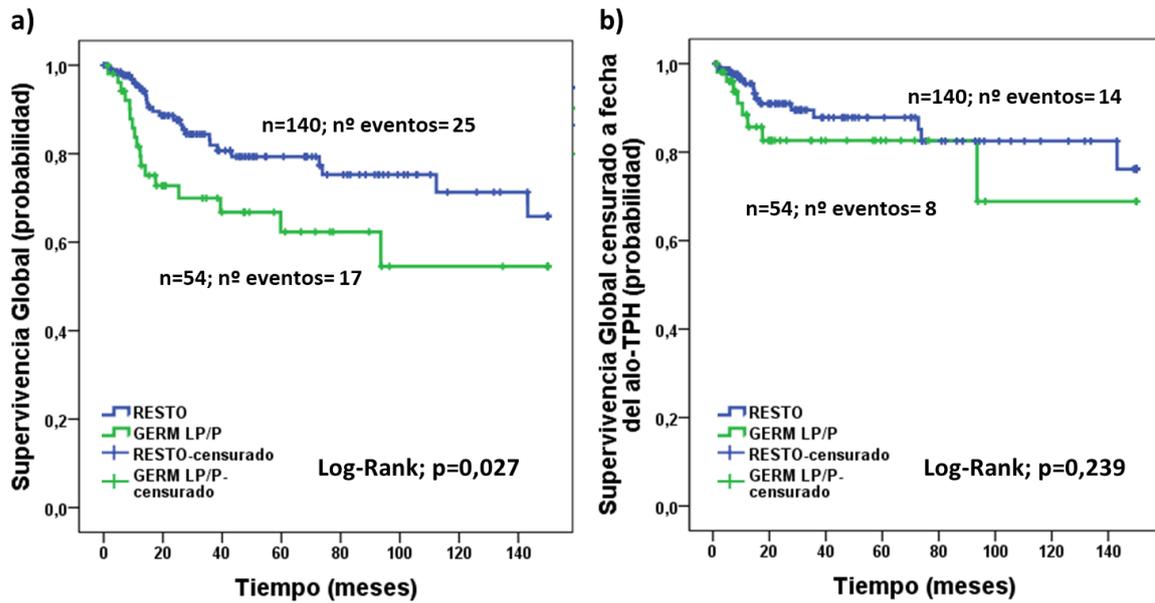
VARIABLE	Cohorte total (N=194)	(A) Con variantes GERM LP/P (n=54)	(B) Sin variantes GERM LP/P (n=140)	p (A vs. B)
<b>Progresión a LMA, %</b>	12,6	15,1	11,7	0,525
<b><i>Exitus</i>, %</b>	21,6	31,5	17,9	<b>0,039</b>
<b># Progresión a LMA, %</b>	10,4	13,2	9,3	0,425
<b># <i>Exitus</i>, %</b>	11,3	4,8	10	0,343

**Nota:** # Datos censurados a fecha del alo-TPH. En negrita, p<0,05.

**Abreviaturas:** LMA, leucemia mieloide aguda.

También en el análisis de supervivencia mediante Kaplan-Meier encontramos una diferencia significativa entre la SG de los pacientes con LP/P frente al resto (p=0,027), con una mediana de supervivencia no alcanzada por ninguno de los dos grupos (Figura 14). Este mismo análisis de supervivencia, censurando el seguimiento de los pacientes en la fecha de infusión de progenitores para aquellos que fueron tratados con un alo-TPH, no alcanzó, sin embargo, la significación estadística. En los análisis pronósticos de SLP y SG mediante regresión de Cox (Tablas suplementarias 4 y 5), decidimos adoptar la aproximación de censurar el seguimiento de los pacientes a la fecha del alo-TPH.

**Figura 14.** Kaplan-Meier de los pacientes con variantes germinales categorizadas como LP/P (n=54) vs. el resto de los pacientes (n=140). a) SG; b) SG censurando el seguimiento en la fecha de la infusión de progenitores en aquellos pacientes sometidos a alo-TPH.



***Pacientes portadores de variantes germinales LP/P en genes de reparación del ADN***

Debido al hallazgo inesperado del enriquecimiento en nuestra cohorte de variantes germinales en los genes de la reparación del ADN, nos centramos en ellas en el siguiente subanálisis. Dieciséis pacientes eran portadores de una variante germinal en un gen de la reparación del ADN ( $DDR^{GERM}$ ) categorizadas como LP/P. La tabla 25 muestra una comparación entre este grupo de pacientes frente al resto de la cohorte. Doce de estos 16 pacientes eran mujeres ( $p=0,085$ ). No encontramos diferencias que permitieran caracterizar el grupo portador de  $DDR^{GERM}$  LP/P en función de las variables clínicas y de laboratorio al diagnóstico.

**Tabla 25.** Comparación de las características al diagnóstico de los pacientes con y sin variantes germinales de la vía de reparación del ADN (DDR<sup>GERM</sup>) categorizadas como LP y/o P.

VARIABLE	(A) Con variantes GERM LP/P (n=53)	(B) Con variantes DDR <sup>GERM</sup> LP/P (n=16)	(C) Sin variantes DDR <sup>GERM</sup> LP/P (n=178)	p (B vs. C)
Edad al diagnóstico, años, mediana (RIQ)	49 (31-54)	47 (34-52)	49 (40-56)	0,342
Género (F/M), %	60,4 / 39,6	75 / 25	53 / 47	<b>0,085</b>
Leucocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	3,3 (2,4-4,5)	3,1 (2,4-4,2)	4,2 (2,5-5,8)	0,158
Neutrófilos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	1,3 (0,7-2,2)	1,2 (0,7-2,1)	1,6 (0,8-3,0)	0,386
Monocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	0,4 (0,2-0,6)	0,3 (0,2-0,4)	0,4 (0,2-0,7)	0,231
Hemoglobina, g/dl, media ± DE	10,5 ± 2,5	10,6 ± 2,6	10,7 ± 2,7	0,864
VCM, fl, media ± DE	98,5 ± 11,9	101 ± 14	99,4 ± 11,3	0,706
Plaquetas, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	88,2 (41,2-217,2)	96 (51-234)	108 (58-222)	0,938
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	304 (219-414)	319 (260-459)	290 (203-405)	0,235
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	190 (73-662)	233 (53-722)	226 (94-593)	0,777
sEPO, UI/L, mediana (RIQ)	71 (24-121)	40 (23-355)	72 (32-272)	0,617
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	11,9	21,4	11,6	0,558
Antecedentes familiares de neoplasia hematológica, %	11,6	0	10,2	0,178
Antecedentes familiares SMD y/o LMA, %	7,3	0	15,6	0,209
Antecedentes familiares de neoplasia oncológicas, %	23,3	42,9	15,9	<b>0,011</b>
Fibrosis en MO, %	11,6	12,5	20,7	0,874
Celularidad de MO (hipo vs. normo/hiper), %	47,8 vs. 52,2	38,5 vs. 61,5	48 vs. 52	0,535
Blastos in MO, %, mediana (RIQ)	4 (1-8)	4 (2,5-6,2)	3 (1-7)	0,583
Líneas con displasia, 1 vs. 2/3, %	11,4 vs. 88,6	14,3 vs. 85,7	19,2 vs. 80,8	0,654
Citogenética y/o FISH anormal, %	36,7	40	32,1	0,533
Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)	26,5	40	21,4	0,106
IPSS-R, ≤3,5 vs. >3,5, %	57,4 vs. 42,6	60 vs. 40	68,9 vs. 31,1	0,477

Notas: \* porcentaje calculados sobre los casos que se realizó biopsia ósea; en negrita, aquellas comparaciones con p<0,05.

Abreviaturas: GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisado.

Sin embargo, sí encontramos una asociación significativa con una mayor frecuencia de familiares afectados con neoplasias sólidas (42,9% vs. 15,9%; p=0,011), un mayor número de pacientes fallecidos (43,8% vs. 19,7%; p=0,025) y un mayor número de pacientes con progresión a LMA (37,5% vs. 10,3%; p=0,002), en este grupo con DDR<sup>GERM</sup>. En este caso, estas diferencias se mantuvieron, incluso, al repetir el análisis censurando el seguimiento de aquellos pacientes sometidos a alo-TPH por el día de infusión de progenitores (Tabla 26).

**Tabla 26.** Comparación de los pacientes con y sin variantes germinales de la vía del DDR categorizadas como LP y/o P en relación de la evolución.

VARIABLE	(A) Con variantes GERM LP/P (n=53)	(B) Con variantes DDR <sup>GERM</sup> LP/P (n=16)	(D) Sin variantes DDR <sup>GERM</sup> LP/P (n=178)	p (B vs. C)
Progresión a LMA, %	15,4	37,5	10,3	<b>0,002</b>
<i>Exitus</i> , %	32,1	43,8	19,7	<b>0,025</b>
# Progresión a LMA, %	13,5	37,5	7,9	<b>&lt;0,001</b>
# <i>Exitus</i> , %	15,1	31,3	9,6	<b>0,009</b>

**Nota:** # Datos censurados a fecha del alo-TPH. En negrita, p<0,05.

**Abreviaturas:** LMA, leucemia mieloide aguda; GERM, germinal.

En la regresión de Cox univariante, aquellos pacientes portadores de DDR<sup>GERM</sup> LP/P presentaron, de manera estadísticamente significativa, un tiempo más corto de progresión a LMA y una peor supervivencia (p=0,013 y p=0,027, respectivamente) (Tablas suplementarias 4 y 5).

En el análisis multivariante, analizando potenciales factores pronósticos independientes de una menor SLP, la presencia de una variante DDR<sup>GERM</sup> LP/P, al igual que el porcentaje de blastos en MO y un riesgo citogenético pobre/muy pobre según el IPSS-R, mantuvieron la independencia pronóstica (p=0,013, p=0,011 y p=0,014, respectivamente) (Tabla 27).

**Tabla 27.** Análisis Cox multivariante de los factores de riesgo de progresión a LMA en la cohorte global, incluyendo la variable DDR<sup>GERM</sup> LP/P y otras que en el univariante obtuvieron una p<0,150.

VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Multivariante			
			p	OR	IC95	
<b>DDR<sup>GERM</sup> LP/P</b>	Si/No	---	<b>0,013</b>	2,626	1,225	5,628
<b>Leucocitos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,386 (S=0,368; 1-E=0,649)	3	0,636	1,385	0,360	5,338
<b>Neutrófilos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	1,0	0,255	0,490	0,143	1,673
<b>Monocitos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,391 (S=0,278; 1-E=0,550)	0,3	0,107	0,386	0,121	1,227
<b>Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,314 (S=0,474; 1-E=0,681)	9,5	0,189	0,451	0,137	1,480
<b>Plaquetas, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,458 (S=0,579; 1-E=0,627)	80	0,205	0,511	0,181	1,441
<b>Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	340	0,998	1,002	0,316	3,177
<b>Blastos en MO, %, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,619 (S=0,500; 1-E=0,358)	4	<b>0,011</b>	4,876	1,435	16,573
<b>Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)</b>	Si/No	---	<b>0,014</b>	3,622	1,292	10,155

**Notas:** Para el análisis multivariante, se incluyeron las variables con p≤0,150 en el análisis univariante. En negrita, p<0,05.

**Abreviaturas:** GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional.

En el análisis multivariante de factores pronósticos de SG, las mismas tres variables mantuvieron la independencia pronóstica (p=0,042, p=0,005 y p=0,041, respectivamente) (Tabla 28).

**Tabla 28.** Análisis Cox multivariante de los factores de riesgo de SG en la cohorte global, incluyendo la variable DDR<sup>GERM</sup> LP/P y otras que en el univariante obtuvieron una p<0,150.

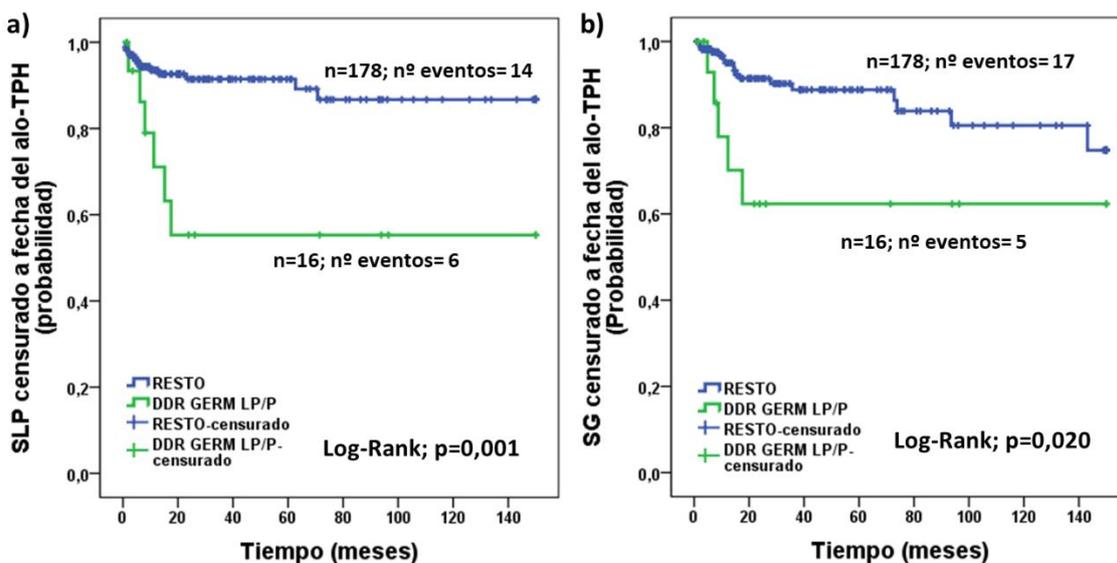
VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Multivariante			
			p	OR	IC95	
<b>DDR<sup>GERM</sup> LP/P</b>	Si/No	---	<b>0,042</b>	3,531	1,047	11,913
<b>Leucocitos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	3	0,920	0,937	0,263	3,333
<b>Neutrófilos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,391 (S=0,278; 1-E=0,550)	1,0	0,384	0,576	0,166	1,996
<b>Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,520 (S=0,529; 1-E=0,507)	9,5	0,369	1,689	0,539	5,294
<b>LDH, UI/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	290	0,369	1,689	0,539	5,294
<b>Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,690 (S=0,750; 1-E=0,522)	340	0,373	1,768	0,505	6,185
<b>Blastos en MO, %, mediana (RIQ)</b>	Si/No	4	<b>0,005</b>	5,324	1,651	17,170
<b>Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)</b>	Si/No	---	<b>0,041</b>	3,100	1,049	9,162

**Nota:** Para el análisis multivariante, se incluyeron las variables con  $p \leq 0,150$  en el análisis univariante. En negrita,  $p < 0,05$ .

**Abreviaturas:** **GERM**, germinal; **DDR**, vía de la respuesta al daño del ADN; **RIQ**, rango intercuartílico; **VCM**, volumen corpuscular medio; **LDH**, lactato deshidrogenasa; **sEPO**, eritropoyetina sérica; **MO**, médula ósea; **FISH**, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; **IPSS-R**, Índice Pronóstico Internacional.

La figura 15 muestra las curvas de Kaplan-Meier para SLP y SG en función de la presencia de DDR<sup>GERM</sup> LP/P.

**Figura 15.** Kaplan-Meier de la SLP (a) y SG (b) censurado a fecha del alo-TPH de los pacientes con y sin variantes DDR<sup>GERM</sup> LP/P.



El anterior análisis multivariante se modeló para evitar el fenómeno de colinealidad. Para ello, incluimos en el Cox univariante, de manera individual, las variables constituyentes del IPSS-R, dejando el valor de este índice fuera.

A continuación, decidimos enfrentar la presencia de DDR<sup>GERM</sup> LP/P a la variable IPSS-R dicotomizado (Tabla 29). De manera sorprendente, ambas variables mantuvieron la independencia pronóstica otorgando, cada una de ellas, un aumento del riesgo en cinco veces de progresar a una LMA. De la misma manera, también mantuvieron la independencia pronóstica para una menor SG. En este caso, el IPSS-R dicotomizado otorgaba un mayor riesgo relativo (6,2) que la presencia de una variante DDR<sup>GERM</sup> LP/P (4,2).

**Tabla 29.** Regresión multivariante de Cox incluyendo la presencia de variante DDR<sup>GERM</sup> LP/P y el IPSS-R dicotomizado para el análisis de SLP y SG.

VARIABLE	SLP				SG			
	p	OR	IC95		p	OR	IC95	
<b>IPSS-R</b> ( $\leq 3,5$ vs. $> 3,5$ )	<b>&lt;0,001</b>	5,519	2,173	14,020	<b>&lt;0,001</b>	6,240	2,529	15,394
<b>DDR<sup>GERM</sup> (LP/P)</b>	<b>0,002</b>	4,738	1,811	12,401	<b>0,006</b>	4,242	1,527	11,788

**Nota:** En negrita,  $p < 0,05$ .

**Abreviaturas:** IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional.

### *Asociaciones clínicas de los perfiles de coocurrencia germinal-somático*

De los dos perfiles de coocurrencia destacados en la sección 3.3.2. (página 74) nos interesaron los cinco pacientes con una variante DDR<sup>GERM</sup> LP/P y una adquirida en TP53. Estos pacientes presentaban una neutropenia más profunda que el resto de la cohorte (0,8 vs.  $1,6 \times 10^9/L$ ), mostrando tendencia a la significación estadística ( $p=0,078$ ), una mayor proporción de cariotipos anormales (80% vs. 21,4%,  $p=0,04$ ) y una proporción mayor de pacientes con IPSS-R  $> 3,5$  (80% vs. 30,4%,  $p=0,036$ ) (Tabla 30). Además, los pacientes con una variante DDR<sup>GERM</sup> LP/P y una adquirida en TP53 presentaban en forma significativa un mayor porcentaje de progresión a LMA (80% vs. 10,8%) y de *exitus* (100% vs. 19,6%) (Tabla 31). Al diagnóstico, no encontramos diferencias entre los pacientes con DDR<sup>GERM</sup> LP/P + TP53<sup>SOM</sup> y los pacientes sólo con TP53<sup>SOM</sup> (Tablas 30 y 31).

**Tabla 30.** Comparación de las variables al diagnóstico entre los pacientes portadores de variante DDR<sup>GERM</sup> LP/P +TP53<sup>SOM</sup> y resto de los pacientes (A vs. B) y entre los pacientes portadores de variante DDR<sup>GERM</sup> LP/P +TP53<sup>SOM</sup> y los pacientes sólo con TP53<sup>SOM</sup> (A vs. C).

VARIABLE	(A) Con DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup> (n=5)	(B) Sin DDR <sup>GERM</sup> LP/P + TP53 <sup>SOM</sup> (n=189)	(C) TP53 <sup>SOM</sup> sin DDR <sup>GERM</sup> LP/P (n=15)	P (A vs. B)	P (A vs. C)
Edad al diagnóstico, años, mediana (RIQ)	47 (38-56)	49 (40-55)	52 (49-57)	0,970	0,359
Género (F/M), %	80 /20	54 /46	60 /40	0,378	0,613
Leucocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	3 (2,2-3,3)	4 (2,5-5,8)	4,6 (2,2-5,2)	0,152	0,266
Neutrófilos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	0,8 (0,6-1,2)	1,6 (0,9-2,9)	1,4 (0,8-2,9)	0,078	0,168
Monocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	0,3 (0,1-0,7)	0,4 (0,2-0,7)	0,3 (0,2-0,7)	0,870	1,000
Hemoglobina, g/dl, media ± DE	9,4 ± 1,3	10,7 ± 2,7	8,7 ± 1,6	0,552	0,157
VCM, fl, media ± DE	89,7 ± 18,5	99,7 ± 11,3	98,7 ± 13,8	0,363	0,441
Plaquetas, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	64 (51-196)	109 (58-222)	110 (37-224)	0,462	0,800
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	424 (293-711)	292 (205-406)	324 (201-502)	0,107	0,382
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	758 (386-1866)	227 (90-583)	494 (177-801)	<b>0,040</b>	0,233
sEPO, UI/L, mediana (RIQ)	33 (25-33)	72 (31-300)	149 (55-524)	0,343	0,154
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	0	16,4	0	1,000	NC
Antecedentes familiares de neoplasia hematológica, %	0	10,8	0	1,000	NC
Antecedentes familiares SMD y/o LMA, %	0	9,6	0	1,000	NC
Antecedentes familiares de neoplasia oncológicas, %	25	17,9	6,7	0,553	0,386
*Fibrosis en MO, %	0	10,6	0	1,000	NC
Celularidad de MO (hipo vs. normo/hiper), %	25 vs. 75	47,2 vs.52,8	66,7 vs. 33,3	0,378	0,262
Blastos en MO, %, mediana (RIQ)	6 (3,5-10,7)	3 (1-7)	6 (3-13)	0,176	1,000
Líneas con displasia, 1 vs. 2/3, %	0 vs.100	19,2 vs. 80,8	6,7 vs. 93,3	1,000	1,000
Citogenética y/o FISH anormal, %	80	31,4	71,4	<b>0,040</b>	1,000
Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)	80	21,5	85,7	<b>0,011</b>	1,000

Notas: \* porcentaje calculados sobre los casos que se realizó biopsia ósea. En negrita, p<0,05.

Abreviaturas: GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisado.

**Tabla 31.** Comparación de los eventos en la evolución entre los pacientes portadores de variante  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$  y el resto de los pacientes (A vs. B) y entre los pacientes portadores de variante  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$  y los pacientes sólo con  $TP53^{SOM}$  (A vs. C).

VARIABLE	(A) Con $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$ (n=5)	(B) Sin $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$ (n=189)	(C) $TP53^{SOM}$ sin $DDR^{GERM} LP/P$ (n=15)	P (A vs. B)	P (A vs. C)
Progresión a LMA, %	80	10,8	40	<b>0,001</b>	0,303
Exitus, %	100	19,6	66,7	<b>&lt;0,001</b>	0,266
# Progresión a LMA, %	80	8,5	33,3	<b>&lt;0,001</b>	0,127
# Exitus, %	80	9,5	46,7	<b>0,001</b>	0,319

Notas: # Datos censurado a fecha del alo-TPH. En negrita,  $p < 0,05$ .

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda.

En el análisis multivariante, analizando factores pronósticos independientes de SLP, tan sólo la presencia de una variante  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$  mantuvo la independencia pronóstica al enfrentarlo con las otras variables significativas en el Cox univariante ( $p=0,011$ ) (Tabla 32).

**Tabla 32.** Análisis Cox multivariante en la cohorte global para la SLP, con la inclusión de la variable  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$

VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Multivariante			
			p	OR	IC95	
$DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$	Si/No	---	<b>0,011</b>	7,437	1,589	34,815
Leucocitos, $\times 10^9/L$ , mediana (RIQ)	AUC=0,386 (S=0,368; 1-E=0,649)	3	0,890	1,101	0,281	4,312
Neutrófilos, $\times 10^9/L$ , mediana (RIQ)	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	1,0	0,490	0,639	0,179	2,281
Monocitos, $\times 10^9/L$ , mediana (RIQ)	AUC=0,391 (S=0,278; 1-E=0,550)	0,3	0,130	0,377	0,107	1,333
Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,314 (S=0,474; 1-E=0,681)	9,5	0,283	0,530	0,166	1,689
Plaquetas, $\times 10^9/L$ , mediana (RIQ)	AUC=0,458 (S=0,579; 1-E=0,627)	80	0,390	0,611	0,199	1,878
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	340	0,817	1,146	0,361	3,642
Blastos en MO, %, mediana (RIQ)	AUC=0,619 (S=0,500; 1-E=0,358)	4	0,056	3,364	0,968	11,684
Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)	Si/No	---	0,061	2,921	0,953	8,955

Notas: Para el análisis multivariante, se incluyeron las variables con  $p \leq 0,150$  en el análisis univariante. En negrita,  $p < 0,05$ .

Abreviaturas: GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional.

En el análisis multivariante de SG, la presencia de  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$  y el porcentaje de blastos en MO fueron los únicos factores que mantuvieron la independencia pronóstica ( $p=0,003$  y  $p=0,011$ , respectivamente) (Tabla 33).

**Tabla 33.** Análisis de Cox multivariante en la cohorte global para la SG, con la inclusión de la variable  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$ .

VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Multivariante			
			p	OR	IC95	
$DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$	Si/No	---	<b>0,003</b>	11,121	2,215	55,832
Leucocitos, $\times 10^9/L$ , mediana (RIQ)	AUC=0,386 (S=0,368; 1-E=0,649)	3	0,932	0,951	0,295	3,063
Neutrófilos, $\times 10^9/L$ , mediana (RIQ)	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	1,0	0,470	0,659	0,213	2,039
Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,314 (S=0,474; 1-E=0,681)	9,5	0,254	0,498	0,150	1,651
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	AUC=0,599 (S=0,625; 1-E=0,508)	290	0,286	1,859	0,596	5,803
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	340	0,519	1,492	0,443	5,024
Blastos en MO, %, mediana (RIQ)	AUC=0,619 (S=0,500; 1-E=0,358)	4	<b>0,011</b>	4,490	1,410	14,299
Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)	Si/No	---	0,062	2,903	0,946	8,906

**Notas:** Para el análisis multivariante, se incluyeron las variables con  $p \leq 0,150$  en el análisis univariante. En negrita,  $p < 0,05$ .

**Abreviaturas:** **GERM**, germinal; **DDR**, vía de la respuesta al daño del ADN; **RIQ**, rango intercuartílico; **VCM**, volumen corpuscular medio; **LDH**, lactato deshidrogenasa; **sEPO**, eritropoyetina sérica; **MO**, médula ósea; **FISH**, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; **IPSS-R**, Índice Pronóstico Internacional.

Al igual que en el análisis con  $DDR^{GERM} LP/P$ , enfrentamos la presencia de  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$  a la variable IPSS-R dicotomizado (Tabla 34). Ambas variables mantuvieron la independencia pronóstica otorgando un aumento del riesgo de once veces para la SLP en el caso de  $DDR^{GERM} LP/P + TP53^{SOM}$  y de cuatro veces para el IPSS-R dicotomizado. De la misma manera, también mantuvieron la independencia pronóstica para una menor SG. En este caso, el IPSS-R dicotomizado otorgaba un mayor riesgo relativo (4,9) que la presencia de una variante  $DDR^{GERM} LP/P$  (24,4).

**Tabla 34.** Regresión multivariante de Cox incluyendo la presencia de variante  $DDR^{GERM}LP/P+TP53^{SOM}$  y IPSS-R para análisis de SLP y SG

VARIABLE	SLP				SG			
	p	OR	IC 95		p	OR	IC 95	
<b>IPSS-R</b> ( $\leq 3,5$ vs. $>3,5$ )	<b>0,002</b>	4,421	1,693	11,545	<b>0,001</b>	4,885	1,942	12,288
<b><math>DDR^{GERM}LP/P</math> <math>+TP53^{SOM}</math></b>	<b>&lt;0,001</b>	11,268	3,334	38,087	<b>&lt;0,001</b>	24,425	6,057	98,502

**Nota:** En negrita,  $p < 0,05$ .

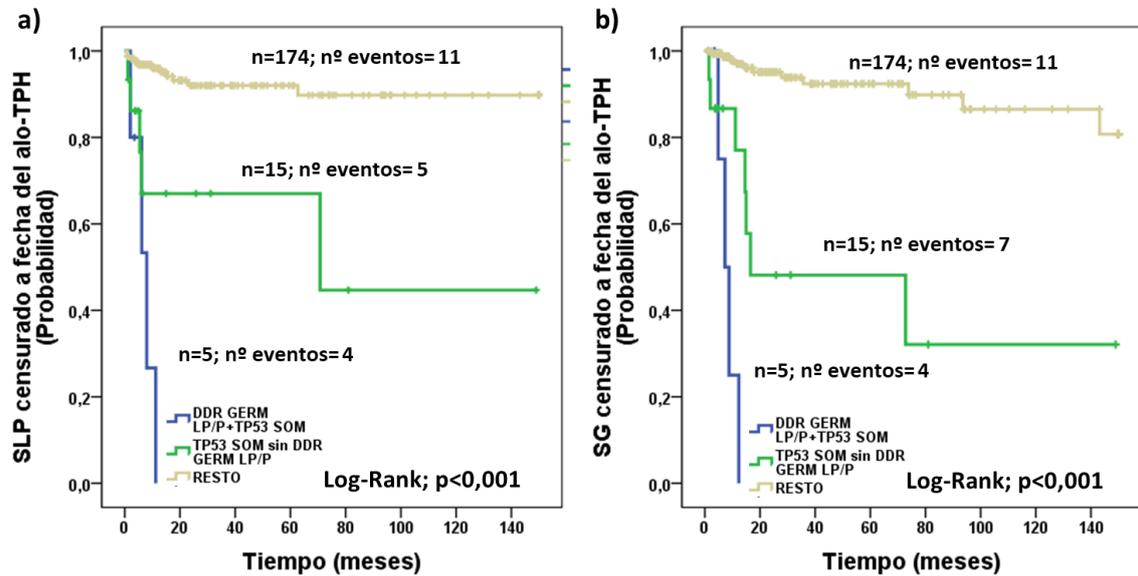
**Abreviaturas:** **IPSS-R**, Índice Pronóstico Internacional.

Utilizamos las curvas de Kaplan-Meier para representar la diferencia en evolución de los pacientes de la cohorte divididos en portadores de  $DDR^{GERM}LP/P + TP53^{SOM}$ , portadores de  $TP53^{SOM}$  sin variantes germinal en  $DDR^{GERM}LP/P$ , y el resto de la cohorte (definidos por la ausencia de la variante adquirida en  $TP53$ ) (Figura 16).

En cuanto a la progresión a LMA, los tres grupos definidos presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ), con un tiempo mediano de progresión a LMA de 8 meses para  $DDR^{GERM}LP/P+TP53^{SOM}$ , de 70,7 meses para  $TP53^{SOM}$  sin  $DDR^{GERM}LP/P$  y un tiempo mediano no alcanzado para el resto de la cohorte.

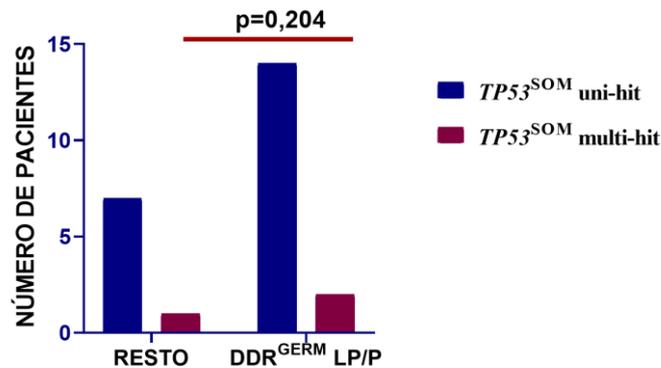
En cuanto al tiempo de SG, los tres grupos definidos presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ), con un tiempo mediano de supervivencia de 7,3 meses para  $DDR^{GERM}LP/P+TP53^{SOM}$ , de 16,5 meses para  $TP53^{SOM}$  sin  $DDR^{GERM}LP/P$  y un tiempo mediano no alcanzado para el resto de la cohorte.

**Figura 16.** Kaplan Meier de la SLP (a) y SG (b) censurado a fecha del alo-TPH de los pacientes con variantes  $DDR^{GERM} LP/P+TP53^{SOM}$ , con variantes  $TP53^{SOM}$  sin  $DDR^{GERM} LP/P$  y resto de los pacientes.



A continuación, dividimos los veinte casos con una variante adquirida en  $TP53$  en función del número de alteraciones en ese locus. Cuatro casos correspondían a lo que definimos como *multi-hit* (más de una mutación adquirida y/o delección añadida de 17p por citogenética y/o FISH). Dos de estos casos se incluían dentro de los cinco portadores  $DDR^{GERM} LP/P$  y solo uno en los quince casos con  $TP53$  mutadas que no presentaban ese tipo de variante germinal, sin que esta diferencia alcanzara la significación estadística ( $p=0,204$ ) (Figura 17).

**Figura 17.** Presencia de variante  $TP53$  multi-hit vs. uni-hit en pacientes con o sin variante  $DDR^{GERM} LP/P$ .



### 3.3.4. Asociaciones específicas genotipo-fenotipo.

#### *Variantes germinales en síndromes mielodisplásicos con sideroblastos en anillo*

En aquellos pacientes con sideroblastos en anillo  $\geq 1\%$  en MO, encontramos una mayor frecuencia de variantes germinales LP/P/VUS en genes relacionados con las anemias sideroblásticas congénitas (ASC): *FECH*, *SLC25A38*, *ALAS2*, *GLRX5*, *TRNT1*, *SLC19A2*. Estos casos representaban el 17% (8 de 47) de los pacientes con sideroblastos en anillos, mientras que sólo un paciente de los 147 sin sideroblastos en anillo presentaba una de estas variantes. Diferencia que resultó estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Dentro de los 47 pacientes con sideroblastos en anillo, en 22 de ellos encontramos una mutación adquirida en *SF3B1* (Tablas 35 y 36). Diecinueve de los casos mutados para *SF3B1* presentaban  $\geq 15\%$  de SA en MO. Los otros tres casos mutados presentaban exactamente un 5% de SA (Tabla 35).

**Tabla 35.** Características de los 22 pacientes portadores de una variante adquirida en *SF3B1*. Todos los casos presentaban sideroblastos en anillo en médula ósea (mediana de 37%, RIQ 19-55%). En negrita, variantes LP/P. En azul variantes germinales en genes causantes de ASC.

ID	OMS 2017	% SA MO	SOMÁTICAS	VALIDACION STATUS SF3B1	GERMINALES
VJ16	SMD-SA	30	<b>SF3B1, PMS2, ATM</b>	Sanger / NGS	<b>FH, WT1, CLCN7</b>
VJ37	SMD-SA	65	<b>ARID2, ASXL1, SF3B1</b>	Sanger	<b>PMS2</b>
VJ21	SMD-SA	64	<b>SF3B1</b>	Sanger	<b>GP1BA, GARI, CARD11</b>
RVJ8	SMD-SA	15	<b>SF3B1, IKZF1</b>	Sanger	<b>LYST, MYH9, SLC37A4, HNRNPA3, DOCK6</b>
RVJ13	SMD-SA	47	<b>TP53, SF3B1</b>	Sanger	<b>RXR1</b>
VJ63	SMD-SA	80	<b>SF3B1</b>	Sanger	<b>SP140L, MLH1, CLPB</b>
VJ64	SMD-SA	37	<b>SF3B1</b>	Sanger	<b>NO</b>
VJ65	SMD-SA	37	<b>DNMT3A, TP53, SF3B1, PHF6</b>	Sanger	<b>VPS13B, HKDC1</b>
VJ67	SMD-SA	25	<b>GATA2, DNMT3A, SF3B1, RUNX1</b>	Sanger	<b>COL4A1</b>
VJ92	SMD-SA	50	<b>SF3B1, TET2(X2), JAK3</b>	Sanger / NGS	<b>PDCD4, UTP20</b>
VJ93	SMD-SA	95	<b>SF3B1, DNMT3A</b>	Sanger / NGS	<b>ATM, VWDE, IL17RA, TRNT1</b>
VJ100	SMD-SA	16	<b>SF3B1</b>	Sanger / NGS	<b>RAF1, MSH6, ERCC6L2, APC, SLC19A2</b>
VJ110	SMD-SA	54	<b>SF3B1, DNMT3A</b>	NGS	<b>RAD50</b>
VJ111	SMD-SA	5	<b>SF3B1</b>	Sanger / NGS	<b>APC</b>
VJ127	SMD-EB1	4	<b>SF3B1</b>	Sanger / NGS	<b>NO</b>
VJ140	SMD-SA	33	<b>SF3B1</b>	Sanger	<b>NO</b>
VJ193	SMD-SA	60	<b>SF3B1, CREBBP, NF1</b>	Sanger	<b>NO</b>
VJ196	SMD-EB1	50	<b>SF3B1, GATA2, KRAS, NF1, CNOT3, BCOR</b>	NGS	<b>RARA</b>
VJ201	SMD-EB1	20	<b>SF3B1, RUNX1, BCOR</b>	NGS	<b>NO</b>
VJ209	SMD-EB2	40	<b>SF3B1</b>	NGS	<b>CACNA2D4, DNAJB1, RPS19, RUNX1</b>
VJ222	SMD-EB2	37	<b>SF3B1</b>	Sanger	<b>FANCC</b>
VJ224	SMD-DM	4	<b>SF3B1</b>	NGS	<b>ADCY5, FRAS1, ERCC6L2</b>

**Tabla 36.** Características de los 25 pacientes con  $\geq 1\%$  de sideroblastos en anillo en médula ósea (mediana de 17%, RIQ 5-28%) y sin variantes adquiridas en *SF3B1*. En negrita, variantes LP/P. En azul variantes germinales en genes causantes de ASC.

ID	OMS 2017	% SA MO	SOMÁTICAS	VALIDACION STATUS <i>SF3B1</i>	GERMINALES
VJ8	SMD-SA	17	<i>NO</i>	---	<i>MLH1, TXNDC11, NPAT, FECH</i>
VJ11	SMD-DM	18	<i>EZH2</i>	---	<i>U2AF2, BRIP1, ERCC6L2, MSH6, LIG4, COL4A1</i>
VJ19	SMD-SA	40	<i>NO</i>	Sanger	<i>SLC25A38, RYR1, ALAS2, NF1</i>
VJ26	SMD-SA	19	<i>NO</i>	---	<i>BCR, FANCA, VWDE, IDH1</i>
VJ29	SMD-DM	12	<i>CUX1, ATM, ARID2</i>	---	<i>TERT, DNAJC21</i>
VJ32	SMD-DM	4	<i>NRAS, TET2(x2), JAK2, NF1, SRSF2</i>	NGS	<i>MSH6, ANKRD26, AMER2, COL4A1</i>
VJ51	SMD-DM	13	<i>TP53</i>	Sanger	<i>MASTL, BRCA1, GP1BA, CILP2, TAS1R1</i>
SMD13	SMD-EB2	28	<i>WT1</i>	Sanger	<i>GLG1, RYR1</i>
SMD17	SMD-EB1	15	<i>IDH2, TP53, NF1</i>	Sanger	<i>CHEK2, APOB</i>
RVJ5	SMD-SA	31	<i>ASXL1</i>	Sanger	<i>SLC46A1, SLX4, RBBP6</i>
VJ71	SMD-INCLASIFICABLE	76	<i>SRSF2, ASXL1, IDH2</i>	NGS	<i>NO</i>
VJ72	SMD-EB2	6	<i>NO</i>	---	<i>MLH1, BRIP1</i>
VJ200	SMD-EB2	4	<i>CSF3R, TP53</i>	---	<i>CASP10, BRAF</i>
VJ78	SMD-SA	23	<i>NO</i>	Sanger	<i>G6PC3, LRP2</i>
VJ80	SMD-EB1	20	<i>RUNX1, ASXL1</i>	NGS /Sanger	<i>DGCR2, RAC2, FRAS1</i>
VJ84	LMMC	24	<i>TP53</i>	NGS /Sanger	<i>JAK2, GLRX5</i>
VJ94	SMD-EB1	11	<i>TP53</i>	NGS /Sanger	<i>NO</i>
VJ97	SMD-EB1	35	<i>TP53(X2)</i>	NGS /Sanger	<i>MSH2, NR2F6, TERT, LIG4</i>
VJ113	SMD-DU	2	<i>NO</i>	---	<i>SLC19A2, ATP10B</i>
VJ149	SMD-DU	14	<i>NO</i>	NGS /Sanger	<i>EML6</i>
VJ150	SMD-DM	4	<i>TP53, CEBPA</i>	NGS /Sanger	<i>RAD50</i>
VJ160	SMD-SA	28	<i>PPM1D, GATA2</i>	NGS /Sanger	<i>NMUR2</i>
VJ170	SMD-DM	2	<i>NO</i>	---	<i>TSPAN3, TRNT1</i>
VJ212	SMD-DM	4	<i>CREBBP</i>	NGS /Sanger	<i>SLC25A38, TRERF1</i>
VJ214	SMD-EB2	55	<i>DNMT3A, SRSF2, SETBP1</i>	Sanger	<i>ST14</i>

Las variantes germinales LP/P/VUS en genes causantes de ASC eran más frecuentes en los pacientes con SA sin mutación de *SF3B1* (seis de las 8 variantes encontradas con SA), aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística ( $p=0,175$ ). La tabla 37 incluye los seis casos con sideroblastos en anillo, sin variante adquirida *SF3B1* y variante germinal en gen causante de ASC (mediana de 17%; RIQ, 4-24%).

**Tabla 37.** Casos dentro de la cohorte total que presentaban variante germinal LP/P/VUS en genes causantes de ASC.

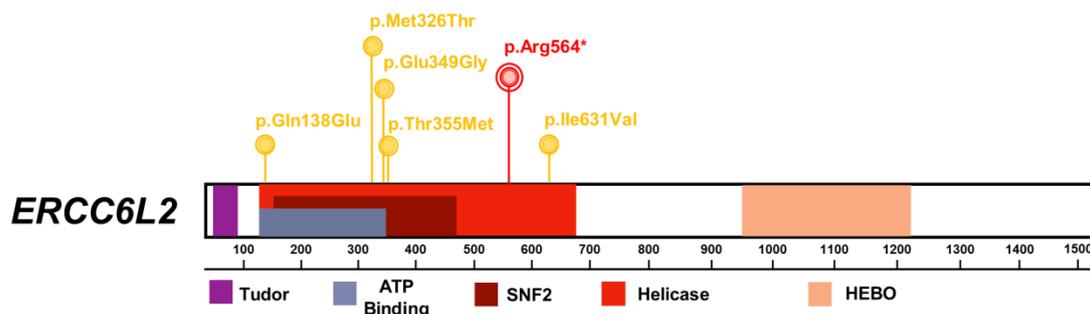
	ID	%SA MO	GEN	CHR	CAMBIO NC	CAMBIO AA	VAF (%)	MAF	CADD	REVEL	ACMG/AMP	CLINVAR	OTROS GERM
Sin SA y sin SF3B1 <sup>SOM</sup>	VJ183	0	ALAS2	X	c.1192G>A	p.Gly398Ser	56	NO	29	0,987	VUS	NO	RPL31, FRAS1, PPP1R3A
SA + SF3B1 <sup>SOM</sup>	VJ93	95	TRNT1	3	c.1292T>C	p.Ile431Thr	53	0,01	24	0,152	VUS	LB*	ATM, VWDE, IL17RA
	VJ100	16	SLC19A2	1	c.1092G>A	p.Met364Ile	42	<0,01	20	0,149	VUS	NO	RAF1, MSH6, ERCC6L2, APC
SA sin SF3B1 <sup>SOM</sup>	VJ8	17	FECH	18	c.380A>G	p.Glu127Gly	50	<0,01	26	0,876	VUS	NO	MLH1, TXNDC11, NPAT
	VJ19	40	SLC25A38	3	c.683G>T	p.Gly228Val	49	<0,01	29	0,915	LP	NO	RYR1, NF1
			ALAS2	X	c.509G>A	p.Arg170His	44	<0,01	29	0,977	LP	NO	
	VJ84	24	GLRX5	14	c.185C>T	p.Pro62Leu	59	<0,01	25	0,370	VUS	LB*	JAK2
	VJ113	2	SLC19A2	1	c.926A>G	p.Tyr309Cys	44	<0,01	29	0,874	VUS	NO	ATP10B
	VJ212	4	SLC25A38	3	c.415G>T	p.Val139Phe	44	<0,01	24	0,624	LP	NO	TRERF1
VJ170	2	TRNT1	3	c.1292T>C	p.Ile431Thr	35	0,01	24	0,152	VUS	LB*	TSPAN3	

De manera interesante, en el grupo de pacientes con sideroblastos en anillo y sin SF3B1 mutado se encontraban las 3 variantes calificadas como LP y las VUS con mayor puntuación según la metaescala de predicción *in silico* de patogenicidad, REVEL.

#### Variantes germinales en ERCC6L2

Detectamos variantes germinales en ERCC6L2 categorizadas como VUS/P en seis pacientes. Todas las variantes se ubicaban en el dominio helicasa de la proteína, sin afectar al dominio HEBO (Figura 18).

**Figura 18.** Resumen esquemático de las variantes germinales en ERCC6L2 VUS/P del estudio en relación con el sitio funcional de la proteína. VUS en color naranja y P en rojo.



La variante detectada en homocigosis (p.Arg564\*), resultó categorizada como patogénica. Las otras cinco variantes, todas en heterocigosis, fueron categorizadas como de significado incierto (Tabla 38). Ninguna de estas variantes germinales en el gen *ERCC6L2* ha sido descrita previamente.

**Tabla 38.** Casos dentro de la cohorte total que presentaban variante germinal VUS/P en el gen *ERCC6L2*.

ID	GERM	CAMBIO NC	CAMBIO AA	VAF (%)	MAF	CADD	REVEL	ACMG/AMP	OTROS GERM	SOM
VJ1	<i>ERCC6L2</i>	c.1064C>T	p.Thr355Met	40,3	<0,01	25,5	0,562	VUS	<i>HELOQ, PXDN, PMS2, VWDE, BCR</i>	---
VJ11		c.412C>G	p.Gln138Glu	41,3	<0,01	25,3	0,943	VUS	<i>U2AF2, BRIP1, MSH6, LIG4, COL4A1</i>	<i>EZH2</i>
VJ49		c.1690C>T	p.Arg564*	100	<0,01	40	---	P	<i>LYST, DNAH11, TAL1, DOCK6</i>	<i>TP53</i>
VJ100		c.977T>C	p.Met326Thr	54,9	<0,01	26,9	0,826	VUS	<i>RAF1, MSH6, APC</i>	<i>SF3B1</i>
VJ142		c.1046A>G	p.Glu349Gly	38	---	27,3	0,818	VUS	---	---
VJ191		c.1891A>G	p.Ile631Val	52,9	<0,01	25,6	0,569	VUS	<i>TP53</i>	<i>TP53</i>

**Abreviaturas:** **NC**, de nucleótidos; **AA**, aminoácidos; **MAF**, siglas en inglés de frecuencia alélica menor; **ACMG**, siglas en inglés del colegio americano de médicos genetista; **AMP**, siglas en inglés de la asociación americana de patólogos; **GERM**, variantes germinales; **SOM**, variantes somáticas.

A pesar de ser un número reducido de casos, quisimos comprobar si estos seis pacientes presentaban diferencias significativas con respecto al resto de la cohorte. El escaso número de pacientes portadores de variante germinal en *ERCC6L2* explica que diferencias llamativas en cuanto a la celularidad de MO, cariotipo anormal, niveles de ferritina, no alcanzaran el nivel de significación estadística (Tabla 39).

**Tabla 39.** Comparación de las variables al diagnóstico entre los pacientes portadores de variante *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> VUS/P y el resto de los pacientes.

VARIABLE	(A) <i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup> (n=6)	(B) RESTO (n=188)	P (A vs. B)
Edad al diagnóstico, años, mediana (RIQ)	52 (45-58)	49 (39-55)	0,252
Género (F/M), %	66,7 / 33,3	54,1 / 45,9	0,690
Leucocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	2,8 (2,5-5,2)	3,9 (2,5-5,7)	0,473
Neutrófilos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	1,4 (0,9-2,5)	1,6 (0,8-2,9)	0,777
Monocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	0,5 (0,3-1,3)	0,3 (0,2-0,7)	0,153
Hemoglobina, g/dl, media ± DE	9,3 ± 4,3	10,7 ± 2,6	0,479
VCM, fl, media ± DE	101 (99-112)	98 ± 11,6	0,220
Plaquetas, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	157 (50-262)	106 (58-221)	0,768
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	303 (217-830)	296 (206-407)	0,583
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	714 (135-1646)	225 (92-586)	0,169
sEPO, UI/L, mediana (RIQ)	387 (25-387)	73 (31-269)	0,750
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	0	16,6	0,277
Antecedentes familiares de neoplasia hematológica, %	16,7	10,3	0,494
Antecedentes familiares SMD y/o LMA, %	16,7	9	0,449
Antecedentes familiares de neoplasia oncológicas, %	16,7	18,1	1,000
Fibrosis en MO*, %	16,7	10,1	0,496
Celularidad de MO (hipo vs. normo/hiper), %	16,7 vs. 83,3	47,8 vs. 52,2	0,216
Blastos en MO, %, mediana (RIQ)	5,5 (1,5-9,7)	3 (1-7)	0,673
Líneas de displasia, 1 vs. 2/3, %	33,3 vs. 66,7	18,2 vs. 81,8	0,313
Citogenética y/o FISH anormal, %	50	32,2	0,395
Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)	50	22,2	0,138
IPSS-R, ≤3,5 vs. >3,5, %	50 vs. 50	68,8 vs. 31,2	0,384

**Nota:** \* porcentaje calculados sobre los casos que se realizó biopsia ósea.

**Abreviaturas:** GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisado.

En cuanto al curso evolutivo, se observó que los pacientes con *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> presentaban, de forma significativa, una tasa mayor de progresión a LMA y fallecimientos ( $p=0,028$  y  $p=0,021$ ). Al censurar el seguimiento de los pacientes que habían recibido un alo-TPH, en el día de la infusión de los progenitores hematopoyéticos, se perdió la significación estadística, manteniendo cierta tendencia ( $p=0,119$  y  $p=0,139$ ) (Tabla 40).

**Tabla 40.** Comparación de los pacientes con y sin variantes germinales *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> VUS/P en relación de la evolución.

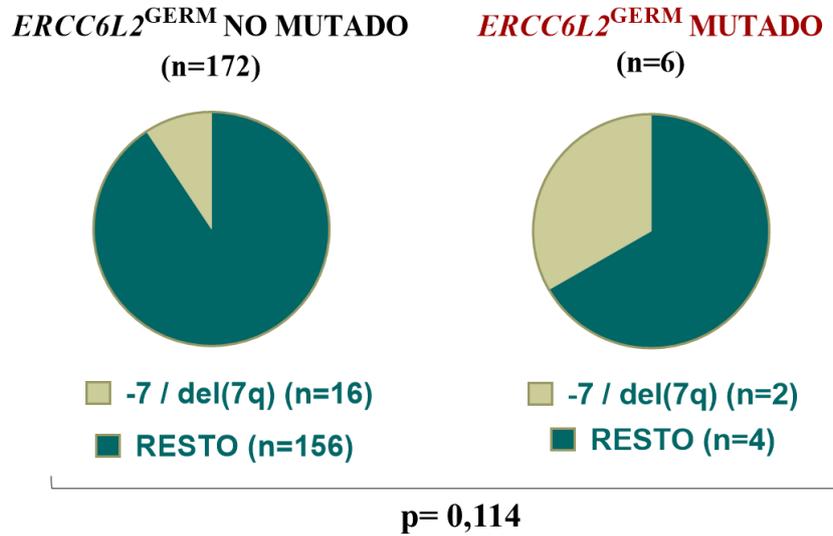
VARIABLE	(A) <i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup> (n=6)	(B) RESTO (n=188)	P (A vs. B)
<b>Progresión a LMA, %</b>	50	11,4	<b>0,028</b>
<i>Exitus, %</i>	33,3	20,2	<b>0,021</b>
# Progresión a LMA, %	33,3	9,6	0,119
# <i>Exitus, %</i>	33,3	10,6	0,139

**Nota:** # Datos censurado a fecha del alo-TPH. En negrita,  $p<0,05$ .

**Abreviaturas:** LMA, leucemia mieloblástica aguda.

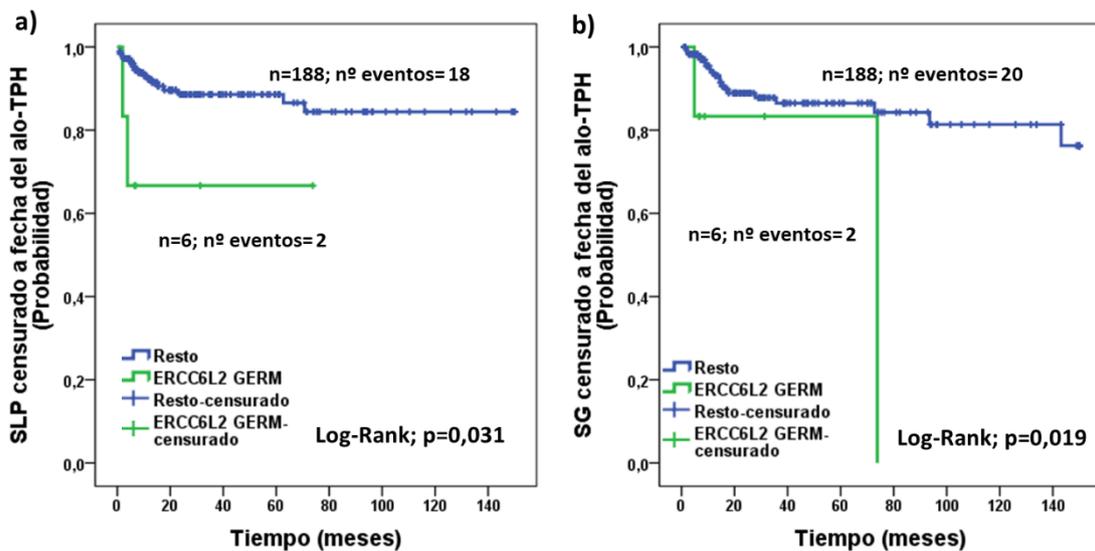
Al revisar los casos con *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> observamos que 2 de los seis pacientes presentaban monosomía del cromosoma 7 y/o del(7q) (33,3%), mientras que en los pacientes sin *ERCC6L2*<sup>GERM</sup>, tan sólo 16 de 172 presentaban monosomía del cromosoma 7 y/o del(7q) (9,3%). Esta diferencia no alcanzó la significación estadística ( $p=0,114$ ) (Figura 19).

**Figura 19.** Representación del porcentaje de los pacientes con monosomía y/o deleción del brazo largo del cromosoma 7 entre los portadores de variante germinal *ERCC6L2* VUS/P y el resto de la cohorte.



Al realizar un análisis de Kaplan-Meier, se observó que los pacientes portadores de *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> presentaban una SLP y una SG más corta al enfrentarlos contra el resto de los pacientes (p=0,031 y p=0,019, respectivamente).

**Figura 20.** Kaplan-Meier de la SLP (a) y SG (b) censurado a fecha del alo-TPH de los pacientes con variantes *ERCC6L2* VUS/P y resto de los pacientes.



En el análisis multivariante, analizando factores pronósticos independientes de una supervivencia libre de progresión a LMA, la presencia de una variante *ERCC6L2*<sup>GERM</sup>, el porcentaje de blastos en MO y una citogenética de riesgo pobre/muy pobre según el IPSS-R mantuvieron la independencia pronóstica (p=0,037, p=0,019 y p=0,031) (Tabla 41).

**Tabla 41.** Análisis Cox multivariante en la cohorte global para el SLP, con la inclusión de la variable *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> VUS/P.

VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Multivariante			
			p	OR	IC95	
<i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup>	Si/No	---	<b>0,037</b>	7,812	1,128	54,122
<b>Leucocitos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,386 (S=0,368; 1-E=0,649)	3	0,268	2,149	0,555	8,329
<b>Neutrófilos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	1,0	0,092	0,315	0,082	1,210
<b>Monocitos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,391 (S=0,278; 1-E=0,550)	0,3	0,072	0,302	0,082	1,113
<b>Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,314 (S=0,474; 1-E=0,681)	9,5	0,289	0,550	0,182	1,662
<b>Plaquetas, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,458 (S=0,579; 1-E=0,627)	80	0,343	0,588	0,196	1,764
<b>Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	340	0,940	0,959	0,316	2,908
<b>Blastos en MO, %, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,619 (S=0,500; 1-E=0,358)	4	<b>0,019</b>	4,117	1,259	13,462
<b>Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)</b>	Si/No	---	<b>0,031</b>	3,194	1,111	9,183

**Notas:** Para el análisis multivariante, se incluyeron las variables con p≤0,150 en el análisis univariante. En negrita, p<0,05.

**Abreviaturas:** **GERM**, germinal; **DDR**, vía de la respuesta al daño de ADN; **RIQ**, rango intercuartílico; **VCM**, volumen corpuscular media; **LDH**, lactato deshidrogenasa; **sEPO**, eritropoyetina sérica; **MO**, médula ósea; **FISH**, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; **IPSS-R**, Índice Pronóstico Internacional.

En el análisis multivariante de SG, la presencia de *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> y el porcentaje de blastos en MO mantuvieron la independencia pronóstica (p=0,031 y p=0,009, respectivamente) (Tabla 42).

**Tabla 42.** Análisis de Cox multivariante en la cohorte global para la SG, con la inclusión de la variable *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> VUS/P.

VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Multivariante			
			p	OR	IC95	
<i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup>	Si/No	---	<b>0,031</b>	8,649	1,219	61,391
<b>Leucocitos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,386 (S=0,368; 1-E=0,649)	3	0,758	1,233	0,325	4,677
<b>Neutrófilos, x10<sup>9</sup>/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	1,0	0,185	0,386	0,094	1,579
<b>Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,314 (S=0,474; 1-E=0,681)	9,5	0,331	0,550	0,165	1,835
<b>LDH, UI/L, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,599 (S=0,625; 1-E=0,508)	290	0,452	1,569	0,485	5,073
<b>Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	340	0,319	1,875	0,544	6,463
<b>Blastos en MO, %, mediana (RIQ)</b>	AUC=0,619 (S=0,500; 1-E=0,358)	4	<b>0,009</b>	4,544	1,455	14,193
<b>Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)</b>	Si/No	---	0,083	2,746	0,878	8,589

**Notas:** Para el análisis multivariante, se incluyeron las variables con  $p \leq 0,150$  en el análisis univariante. En negrita,  $p < 0,05$ .

**Abreviaturas:** GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño de ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular media; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional.

El anterior análisis multivariante se modeló a partir de un análisis univariante en el que, para evitar el fenómeno de colinealidad, incluimos las variables constituyentes del IPSS-R, dejando el valor de este índice fuera.

A continuación, enfrentamos la presencia de *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> a la variable IPSS-R dicotomizado (Tabla 43). A diferencia de la variable IPSS-R dicotomizado, la presencia de *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> sólo mantuvo la significancia estadística en la SG con un riesgo relativo de más de cinco veces.

**Tabla 43.** Comparación mediante el análisis multivariante de regresión de Cox de las variables, presencia de variante *ERCC6L2*<sup>GERM</sup> VUS/P y IPSS-R dicotomizado en relación al SLP y SG.

VARIABLE	SLP				SG			
	p	OR	IC 95		p	OR	IC 95	
<b>IPSS-R (&lt;3,5 vs. &gt;3,5)</b>	<b>&lt;0,001</b>	5,394	2,144	13,572	<b>&lt;0,001</b>	6,052	2,471	14,823
<i>ERCC6L2</i> <sup>GERM</sup>	0,076	3,826	0,869	16,841	<b>0,022</b>	5,927	1,292	27,194

**Nota:** En negrita,  $p < 0,05$ . **Abreviatura:** IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisada.

### 3.4. Discusión

La mayoría de los estudios previos sobre la predisposición germinal en pacientes con SMD o LMA se centraban en cohortes de pacientes diagnosticados en la infancia o adolescencia con una alta sospecha de insuficiencia medular congénita (no filiada con los estudios genéticos habituales) o bien con historia familiar de neoplasia hematológica. En ese contexto, se mostró que un 18% de los casos eran portadores de variantes germinales deletéreas en genes de los síndromes clásicos de insuficiencia medular,<sup>271</sup> y de un 19% a un 29% en genes habitualmente afectados en familias con varios casos de SMD/LMA,<sup>272,273</sup> respectivamente. En pacientes de hasta 45 años que fueron sometidos a alo-TPH, el 13% de los SMD y el 5% de los pacientes con aplasia medular presentaban un síndrome de predisposición germinal.<sup>274</sup>

Sin embargo, la cohorte más numerosa de pacientes con potencial predisposición que nos llega a consultas no ha sido estudiada de manera detallada y en cohortes amplias. Este trabajo es el primero en secuenciar los exomas pareados de tejido tumoral y germinal de una cohorte de pacientes entre los 16 y los 60 años de edad, con un seguimiento prospectivo que, en los casos reclutados inicialmente, supera ya los 7 años. Como esperábamos, la mayoría no presentaba otros casos de SMD/LMA en la familia; sólo un 9,3% de los pacientes tenían una familiar afectado. En cincuenta y cuatro (27,8%) de los 194 pacientes, encontramos una variante calificada como patogénica o probablemente patogénica según los criterios ACMG/AMP. Aunque no del todo comparable, ya que los genes priorizados en los análisis del exoma son distintos y en número diferente, ese 27,8% se sitúa ente el 48% del estudio WES en insuficiencias medulares pediátricas sin filiar,<sup>275</sup> el 57% de variantes LP/P en genes ya descritos en una series de casos familiares (llegando al 97% de las familias si se consideraban nuevos genes con variantes LP/P),<sup>276</sup> y el 19,9% en una cohorte extensa de pacientes con neoplasia mieloide sin seleccionar por edad o diagnóstico.<sup>277</sup>

Sorprendentemente, no encontramos que aquellos pacientes portadores de variantes germinales LP/P fueran diagnosticados a una menor edad. Un hecho que también fue comunicado por Li. et al., en su serie de neoplasias mieloides sin seleccionar por diagnóstico.<sup>277</sup> De la misma manera que este estudio no encontró

diferencias significativas según categorías diagnósticas o pronósticas, tampoco nosotros encontramos diferencias en relación al grupo pronóstico según el IPSS-R, entre los portadores o no portadores de variantes germinales LP/P.

Al no encontrar diferencias clínicas significativas, decidimos agrupar estas variantes germinales LP/P por las características de los genes afectos. Tan solo 25 de estos 54 pacientes eran portadores de variantes en los genes considerados en la actual clasificación de la OMS de las neoplasias mieloides con predisposición. En el resto de los casos, destacaba la frecuencia con la que esas variantes afectaban a genes conocidos como “predisponentes de cáncer” o genes implicados en los síndromes de cáncer hereditario, no considerados relevantes hasta ahora en las neoplasias hematológicas.

Aunque el término genes predisponentes de cáncer (CPG, por sus siglas en inglés) debería englobar a cualquier gen en el que la presencia de una variante predisponga a un mayor riesgo de cualquier tipo de cáncer, el término se suele utilizar por la comunidad científica referido a los descritos en ciertos tumores sólidos y con la característica de implicar dos vías funcionales: la reparación del ADN (*BRCA1*, *BRCA2*, y los genes del MMR, p.ej.) y el ciclo celular (*TP53*, *APC*, *RBI*, p.ej.).<sup>278</sup> En nuestro trabajo encontramos 13 pacientes con variantes P/LP en estos genes, distribuidos de manera heterogénea en los genes de reparación del ADN (dos pacientes con variante en *BRCA1* y 7 casos en los que el gen afectado era *MSH2*, *MUTYH*, *ATM*, *ATR*, *CHEK2*, *LIG4* y *BRIP1*) y en genes del ciclo celular (4 casos en los que se describieron variantes en *STK11*, *TP53*, *ABL1* y *PML*). Todas estas variantes se encontraban, en nuestra cohorte, en heterocigosis. Sin embargo, cabe resaltar que, a diferencia de los síndromes congénitos de insuficiencia medular como la anemia de Fanconi, donde la afectación bialélica es prácticamente necesaria en todos los casos, en la mayoría de estos CPG se ha descrito causalidad tanto en su forma bialélica como monoalélica. En la mitad de estos genes, está descrita que la alteración bialélica da lugar a manifestaciones más graves de la enfermedad. Es el caso de los portadores bialélicos de variantes patogénicas en *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, o *PMS2*, que presentan un riesgo muy elevado de tumores sólidos en la infancia temprana. Sin embargo, estos mismo genes mutados en heterocigosis aumentan el riesgo de esos mismos tipos de tumor, con desarrollo en la edad adulta.<sup>279</sup> El fenotipo clínico que generan las variantes patogénicas en estos CPGs es extremadamente amplio, dependiendo de la naturaleza de

la variante (pérdida o ganancia de función), localización a lo largo del gen (distintos dominios de la proteína o región exónica vs. intrónica), lo que lleva a extremos como que la presencia de una variante germinal patogénica en, por ejemplo, *WT1* predisponga a tumor óseo si se localiza en exón o a gonadoblastoma en caso de situarse en región intrónica.<sup>278,280</sup>

En nuestro análisis de correlación entre fenotipo clínico y presencia de variantes germinales LP/P en genes de la reparación del ADN, lo último se asoció a una mayor frecuencia de pacientes de género femenino y antecedentes familiares de neoplasia oncológica. Además, encontramos una relación recurrente y significativa con variables asociadas a un peor curso evolutivo, como una mayor tasa de progresión a LMA y de fallecimientos. De hecho, la presencia de una variante germinal LP/P en los genes de reparación del ADN se mostró como factor de riesgo independiente de menor SG, al enfrentarlo en un modelo multivariante al IPSS-R dicotomizado. Esa diferencia pronóstica no se explicaba por una mayor presencia de alteraciones “*multi-hit*” en *TP53*, recientemente comunicadas como de peor pronóstico, pues la distribución de las mismas no era diferente, desde el punto de vista de la significación estadística, entre los pacientes portadores de DDR<sup>GERM</sup> LP/P.<sup>281</sup>

La relativa frecuencia de variantes en estas vías de reparación del ADN y el valor pronóstico independiente que mostraban en nuestra serie nos llevó a explorar la posibilidad de que ello pudiera tener su explicación en la distribución de variantes somáticas en este grupo de pacientes. El perfil de coocurrencia más frecuente era la asociación de las variantes germinales LP/P en genes de la reparación del ADN y variantes somáticas en *TP53*, que podía describirse en 5 de los 9 pacientes portadores de variantes adquiridas en *TP53* en nuestra cohorte. Además, en estos 5 casos la variante germinal LP/P pertenecía a genes de la reparación distintos de los del MMR (*LIG4*, *ERCC6L2*, *BRCA1*, *CHEK2* y *FANCC*). Este análisis muestra como genes reguladores de funciones biológicas cruciales en el proceso del cáncer, como son la reparación de ADN y el ciclo celular, aparecen, en nuestra cohorte, afectados en los casos más agresivos por variantes germinales y adquiridas. Esta dualidad sugiere el requerimiento de ambas lesiones para el desarrollo de estos casos de SMD, lo que es consistente con estudios funcionales, en campos distintos a la hematología, que demuestran una interacción entre los eventos somáticos y germinales. Por ejemplo, la variante germinal

más frecuente en el receptor del factor de crecimiento del hepatocito (*cMET*, T1010I) incrementa la formación de colonias, la migración celular y la capacidad de invasión de las células portadoras, al ser introducida en una línea epitelial de cáncer de mama sólo si esa línea es portadora de alteraciones germinales en dos genes responsables del ciclo celular, *CDKN2A* y *MYC*, además de alteraciones adquiridas en *BRAF* o *ALK*.<sup>282</sup> Otro ejemplo, más cercano a nuestros hallazgos, lo constituye la delección germinal de *PALB2* (clave en el mecanismo de la recombinación homóloga de la reparación del ADN) en modelo murino, que lleva a la formación de cáncer de mama en un periodo de tiempo muy corto si se acompaña de una delección adquirida de *TP53*. Esta sinergia entre alteraciones germinales y adquiridas resulta un modelo de gran interés a explorar en las neoplasias mieloides.<sup>283</sup>

No es la primera ocasión en la que variantes germinales en los CPGs han sido asociados con neoplasias hematológicas. En 2016, Hindt y colaboradores, en un estudio de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) relacionaron la presencia de determinados polimorfismos en *ATM* y *CHEK2* con la predisposición a desarrollar no sólo neoplasias mieloproliferativas, sino también un fenómeno más común como es el de la hematopoyesis clonal definida por la variante adquirida *JAK2* V617F.<sup>284</sup> Recientemente, también en el contexto de los NMPc Filadelfia negativos, se ha descrito como de 5 familias, cada una de las cuales presentaba, al menos, dos familiares afectados (con una relación entre ellos de primer orden), en 4 de ellas se detectó la presencia de variantes germinales patogénicas en heterocigosis en *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* y *CHEK2*.<sup>285</sup>

Más allá de estudios pediátricos o familiares, existen algunos esfuerzos de investigación cercanos al nuestro en cuanto a objetivos. Feurstein y colaboradores analizaron el tejido germinal de 68 pacientes con SMD y 39 con aplasia medular diagnosticados entre los 18 y los 40 años de edad. A diferencia de nuestro estudio, permitían la presencia de otras alteraciones que hicieran sospechar la presencia de un síndrome congénito y no descartaron a los pacientes por haber presentado otra neoplasia que requiriera de tratamiento quimio o radioterápico previo. Encontraron variantes P/LP en 19 pacientes (17,7%) y en 11 de ellos esas variantes germinales pertenecían a genes involucrados en la reparación del ADN (*ATM*, *ERCC6L2*, *FANCA*) o en la biología de los telómeros (*TERC*, *CTC1*). Al igual que en nuestro estudio, los genes más

reconocidos como predisponentes sin alteraciones previas, como *DDX41* o *SAMD9/SAMD9L*, apenas estaban representados entre las variantes patogénicas.<sup>286</sup>

Hemos encontrado un porcentaje elevado de pacientes portadores de variantes germinales patogénicas en nuestra cohorte de pacientes SMD. Creemos que estos datos apoyan una evaluación germinal en todo paciente candidato a alo-TPH. De hecho, debido a los criterios de selección de nuestro estudio, los pacientes reclutados eran jóvenes y sin comorbilidades, candidatos adecuados a alo-TPH si la agresividad de su enfermedad así lo indica. Ese porcentaje elevado de portadores también implica que, en la actualidad, estamos trasplantando células donadas de familiares portadores en un número de alo-TPH indefinidos. El enriquecimiento en variantes pertenecientes a los mecanismos de reparación del ADN destaca otro punto de interés que requiere aclaración: si es necesario adaptar los regímenes de acondicionamiento hacia aquellos de intensidad reducida en estos casos. Y, por último, el trabajo nos ha permitido iniciar el seguimiento de familiares portadores de las variantes LP/P, lo que esperamos permita aportar más luz sobre la predisposición germinal a SMD.

Las anemias con sideroblastos en anillo son un grupo de enfermedades del tejido hematopoyético, heredadas o adquiridas, definidas por la acumulación patológica de hierro en la mitocondria de los precursores eritroides. Como en la mayoría de las enfermedades hematológicas, la explicación genética de la patogenia se ha ido completando de manera paralela al desarrollo de los avances tecnológicos. En los últimos 30 años, el desarrollo del proyecto genoma humano y la secuenciación masiva han provocado que, hoy en día, dos tercios de las ASC y un porcentaje aún mayor de las adquiridas puedan ser atribuidas a variantes en uno o varios genes específicos.<sup>287</sup>

La ASC mejor caracterizada es la forma ligada al cromosoma X debida, habitualmente, a variantes germinales con cambio de sentido en el gen *ALAS2*, responsable de la síntesis del ácido aminolevulínico, en el primer paso dentro de la biosíntesis del grupo heme. Aunque ligado al cromosoma X, hasta un tercio de los pacientes son mujeres, debido al fenómeno de la inactivación “sesgada” del cromosoma X (*X-inactivation skewing*, en inglés). Típicamente, cada cromosoma X se inactiva en la mitad de las células. Sin embargo, en un 5 al 20% de las mujeres, esa proporción no se mantiene y puede que se produzca una inactivación mayoritaria de uno de los dos

cromosomas X, permitiendo que, si el activo es el portador, el efecto vaya más allá de una heterocigosis clásica silente.<sup>288</sup> En nuestra cohorte, detectamos el caso de una mujer, con hemogramas normales previos, que fue diagnosticada a los 28 años de un SMD-SA (40% de SA en MO), sin mutaciones adquiridas en *SF3B1*. Era portadora de una variante probablemente patogénica, en heterocigosis, en *ALAS2*, situada en el exón 5. Las variantes causantes de la ASC ligada al X suelen encontrarse entre los exones 5 y 9, incluidos.<sup>289</sup> Los varones afectados por esta enfermedad suelen diagnosticarse en las dos primeras décadas de edad. La mujeres, sin embargo, suelen buscar atención en etapas más avanzadas de la vida, con una anemia normocítica o macrocítica, muy probablemente debida al fenómeno comentado de inactivación “sesgada” del cromosoma X.<sup>290,291</sup> Otro mecanismo que podría explicar la latencia en el desarrollo de la insuficiencia medular con presencia de sideroblastos en anillo, en nuestra paciente, sería la presencia de otra variante, también patogénica, en otro gen causante de ASC, *SLC25A38*. Esta heterocigosis en genes distintos causantes de la misma enfermedad, define a los “heterocigotos dobles” y podría explicar la presentación de nuestra paciente. De manera llamativa, la paciente mantiene una respuesta eritroide a eritropoyetina a bajas dosis de 7 años de duración, algo inusual en los casos de SMD-SA adquiridos, donde la mediana de duración de respuesta es de 24 meses.<sup>292</sup>

Un segundo caso con SMD-SA (con un 24% de SA en MO), sin mutación adquirida en *SF3B1*, era portador de una variante germinal de significado incierto en el gen *GLRX5*, en heterocigosis. El gen *GLRX5* codifica la proteína glutaredoxina 5, una enzima mitocondrial, con una función clave en la formación de las agrupaciones de hierro/azufre. El déficit de esta enzima da lugar a una anemia leve microcítica hipocrómica con sobrecarga de hierro en hígado, hepatoesplenomegalia y diabetes tipo 2. Descrita en muy escasos pacientes, estos no responden al tratamiento con vitamina B6 ni ácido fólico. Se han descrito casos en homocigosis y en heterocigosis compuesta, en este último caso, con un debut tardío a los 29 años.<sup>293,294</sup> El tercer caso con diagnóstico de SMD-SA (17% SA en MO) sin variante adquirida en *SF3B1*, era portador de una variante de significado incierto en el gen *FECH*, en heterocigosis. Como en el caso de *GLRX5*, interviene en la formación de las agrupaciones de hierro/azufre y era conocido porque variantes bialélicas en *FECH* ocasionan la protoporfiria eritropoyética. Sin embargo, se han descrito casos manifestados como anemia moderada con sideroblastos en anillo.<sup>295</sup>

Los otros tres casos con SA, sin variante adquirida en *SF3B1* y variante germinal en un gen causante de ASC, no tenían el diagnóstico de SMD-SA, al presentar, tan solo, del 2 al 4% de SA.

La asociación estadísticamente significativa de la presencia de estas variantes propias de ASC en 6 pacientes con SA sin *SF3B1* mutado, nos parece un hallazgo relevante a nivel diagnóstico, para aclarar el 20% de casos con SA sin la afectación de *SF3B1*. También nos parece importante a nivel terapéutico, ante la posibilidad de estrategias distintas en el uso de AEEs y, por supuesto, evitando al donante familiar portador en aquellos casos, que serán excepcionales en este subtipo, con indicación de alo-TPH.

El descubrimiento del gen *ERCC6L2* y su relación con enfermedades en humanos es reciente, ha tenido lugar durante la última década. La pérdida de la función del gen da lugar a la ineficacia del sistema de reparación de ADN por escisión de nucleótido (NER, por sus siglas en inglés), que corrige errores que afectan a cadenas de entre dos y treinta bases. Además, se ha descrito involucrado en la función de las mitocondrias, aumentando los niveles de especies reactivas de oxígeno y alterando la homeostasis celular en caso de verse alterado.<sup>296</sup>

La enfermedad relacionada con *ERCC6L2* ha sido descrita recientemente y, hasta 2018, solo se habían comunicado 6 casos, todos ellos con la variante germinal en homocigosis y de naturaleza truncante. Esos 6 casos iniciales mostraban un fenotipo amplio desde la infancia o adolescencia, incluyendo microcefalia, retraso en el desarrollo del sistema nervioso central e insuficiencia medular con pancitopenia. Ninguno de esos seis casos evolucionó a LMA.<sup>297</sup> Sin embargo, estudios posteriores han descrito pacientes en los que no existían esas manifestaciones extrahematopoyéticas, incluso con la misma configuración truncante y en homocigosis de las variantes. Así, Järviaho et al., describió dos casos de fallo medular explicados por la variante p.Ile486ThrfsTer36, con debut a los 8 años de edad, sin relación familiar, y sin que se acompañaran de otra clínica.<sup>298</sup> En 2019 se comunicaron 8 casos, en 4 familias, de LMA eritroide (M6 de la FAB) en portadores bialélicos de variante germinal. Además, describían como fenómeno asociado, la adquisición temprana de una mutación en *TP53*. Bluteau y colaboradores describieron 7 pacientes con variantes germinales bialélicas en

una cohorte con fallo medular entre los 2 y los 22 años (edad mediana al diagnóstico, 13 años). Tres pacientes no tenían familiares afectados. La médula ósea de estos pacientes se caracterizaba por ser hipocelular, con rasgos displásicos en dos pacientes, ambos portadores de una monosomía del cromosoma 7. Tan solo uno de los 7 pacientes se presentó con alteraciones extrahemapoyéticas, en forma de dificultades en el aprendizaje y lesiones vasculares cerebrales.<sup>275</sup>

De los 24 pacientes descritos hasta 2020 con mutaciones bialélicas, 4 de ellos desarrollaron SMD o LMA entre los 2 y los 22 años de edad, con los 4 pacientes desarrollando una monosomía del cromosoma 7.<sup>299</sup>

En nuestra cohorte describimos 6 pacientes portadores de variantes germinales en *ERCC6L2*. Uno de ellos en homocigosis y el resto en heterocigosis. Esos casos presentaban características comunes, como una celularidad elevada en médula ósea, niveles de ferritina y EPO sérica elevadas al diagnóstico y un curso clínico desfavorable. Tres de los 6 pacientes presentaban alteraciones citogenéticas de mal pronóstico, incluyendo dos pacientes con monosomía del cromosoma 7. Dos de los 6 pacientes adquirieron una mutación adquirida en *TP53*. La edad mediana de estos pacientes es de 52 años al diagnóstico, lo que contrasta marcadamente con los casos descritos, hasta la fecha, en la literatura. La agresividad biológica y clínica de los casos descritos, la participación del gen en un mecanismo crucial en la respuesta a la quimioterapia, potencialmente responsable de complicaciones derivadas del tratamiento, y el relativo desconocimiento de las funciones y lesiones en *ERCC6L2*, indican, en nuestra opinión, la necesidad de ser estudiado en pacientes más allá de la edad pediátrica y de ahondar en su papel biológico y las potenciales consecuencias de su alteración.

### 3.5. Conclusiones

1. Un 27,8% de los pacientes diagnosticados de SMD a edad inusualmente temprana, sin disfunción orgánica previa, presenta una variante germinal patogénica o probablemente patogénica potencialmente predisponente de su enfermedad. Estas variantes afectan, en su mayoría, a genes no considerados en la actualidad en la predisposición a neoplasia mieloide. Ello, junto con la heterogeneidad de las variantes detectadas complica la necesaria validación funcional de las mismas.

2. Si en edad pediátrica predominan las alteraciones en genes de insuficiencia congénita y en edad avanzada las que afectan a *DDX41* y las de naturaleza somática, en nuestra cohorte, los grupos funcionales afectados pertenecen, fundamentalmente, a la vía de reparación del ADN destacando, además, su asociación con variantes adquiridas en *TP53* y su capacidad de predecir de manera independiente un pronóstico desfavorable.

3. Un porcentaje significativo de los SMD con sideroblastos en anillo diagnosticados en edad adulta presenta variantes germinales en genes responsables de la anemia sideroblástica congénita, sugiriendo la penetrancia incompleta del daño causado por estas alteraciones.

4. Destaca, en nuestra cohorte, la asociación de variantes germinales en *ERCC6L2* con alteraciones genómicas de mal pronóstico y curso evolutivo agresivo. Describimos, por vez primera, estos cuadros en pacientes adultos entre los 20 y 60 años.





## Capítulo II: “Variantes germinales en genes pertenecientes a la vía de reparación *mismatch*”



## 4.1. Introducción

La inestabilidad de los microsatélites (MSI, por sus siglas en inglés) es un término que define tanto la alteración biológica de adquisición o pérdida de bases dentro de secuencias repetitivas de ADN (microsatélites), como una condición genética de hipermutabilidad (predisposición a adquirir variantes). Esta condición es debida a defectos de la vía de la reparación del *mismatch* del ADN. La presencia de MSI es la clave patogénica de determinados tumores sólidos, particularmente del carcinoma del endometrio (aproximadamente, un 30% de los pacientes presenta MSI), colon (15% de los pacientes) y gástrico (15% de los pacientes).<sup>300</sup> En cáncer de colon, la presencia o ausencia de MSI es crítica desde el punto de vista clínico, ya que aquellos pacientes con inestabilidad muestran una mejor evolución.<sup>301</sup> Sin embargo, en las pacientes con cáncer de endometrio, la MSI se ha asociado con un peor pronóstico.<sup>302</sup> La relevancia de estas alteraciones ha aumentado desde el descubrimiento de la eficacia de los inhibidores del *checkpoint* inmune en los pacientes con tumores sólidos y MSI.<sup>303</sup>

El diagnóstico molecular de la MSI es una técnica complementaria de la inmunohistoquímica en la rutina oncológica clínica. La MSI se detecta mediante la amplificación por PCR de repeticiones (microsatélites) en regiones específicas del ADN, estableciéndose la presencia de inestabilidad en función de la longitud de esa secuencia concreta de nucleótidos con respecto de la normalidad.<sup>304</sup>

A mediados de la década de los 90 del siglo pasado, se utilizaron diferentes microsatélites, lo que produjo una gran variabilidad en la frecuencia con la que se comunicaba la positividad de MSI dentro del mismo tipo de cáncer. Para superar este problema, en 1997, el instituto nacional del cáncer americano recomendó un panel (el panel Bethesda) con cinco microsatélites marcadores: dos estaban compuestos por repeticiones de mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y tres por repeticiones dinucleotídicas (D2S123, D5S346, D17S250).<sup>251</sup> Posteriormente, se extendió el uso del análisis de cinco microsatélites constituido, exclusivamente, por repeticiones mononucleotídicas (BAT-25, BAT-26, MONO-27, NR-21, NR-24), al demostrarse que este tipo de aproximación presentaba una mejor sensibilidad y especificidad.<sup>305</sup>

Siempre que sea posible, se compara el ADN de tejido normal con el del tumor. Sin embargo, la naturaleza de los marcadores mononucleotídicos, implica que no sea esencial la comparación con ADN normal. En función de los resultados de la prueba los tumores se clasifican en tres fenotipos: si ninguno de los microsatélites muestra inestabilidad, el tumor se clasifica como estable (MSS, por sus siglas en inglés); si uno de los microsatélites muestra inestabilidad, el tumor se clasifica como con inestabilidad baja (MSI-L, por sus siglas en inglés); si dos o más marcadores están alterados, el tumor se clasifica como con alta inestabilidad para los microsatélites (MSI-H, por sus siglas en inglés). A menudo, MSS y MSI-L se clasifican en un mismo subgrupo, ya que pocos de los tumores con estos fenotipos exhiben baja expresión de proteínas de los genes del *mismatch*. Existe controversia en cuanto a la presencia o no de diferencias clínicas, entre estos dos fenotipos tumorales y si está justificada la existencia del fenotipo MSI-L.<sup>306-309</sup>

En comparación con los tumores sólidos, tanto los SMD como las LMA se caracterizan por un menor número de variantes adquiridas.<sup>310</sup> A pesar de ello, diversos estudios han demostrado que un mayor número de variantes somáticas se relaciona con una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico.<sup>311</sup> La presencia y relevancia de la MSI en neoplasia mieloide ha sido estudiada, fundamentalmente, en LMA, con resultados contradictorios. Mientras que en algunos estudios no encuentran MSI, otros comunican que, aproximadamente, un 20% de los casos de LMA *de novo* la presentan.<sup>312-315</sup> En otros estudios, describen que la presencia de MSI es mayor en las LMA o los SMD secundarios a terapia previa (quimio o radioterapia) y, además, podría ser consecuencia de una hipermetilación de las zonas promotoras de los genes *MSH2* y *MLH1*.<sup>316,317</sup>

## 4.2. Pacientes, materiales y métodos

### *Pacientes y variables clínicas*

Se utilizaron las muestras y variables clínicas reflejadas en el primer capítulo: 194 pacientes de 28 centros nacionales (ver página 63), con diagnóstico de SMD/LMMC, de edad comprendida entre 16 a 60 años al diagnóstico y sin disfunción orgánica previa. El procesamiento de las muestras, la inmunoselección celular y la extracción del ADN se llevó a cabo según lo expuesto en el capítulo 1 (páginas 64 y 65).

### *Análisis adicional de las variantes del MMR*

Las variantes germinales VUS/LP/P de la vía del MMR detectadas a partir de la secuenciación del exoma, especificada en la metodología del primer capítulo, fueron reinterpretadas considerando las bases de datos InSIGHT (por sus siglas en inglés, International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours, página web, <http://insight-database.org/>), y la herramienta de predicción *in silico* específica del MMR, PON-MMR2 (<http://structure.bmc.lu.se/PON-MMR2/>).

### *Determinación de la inestabilidad de los microsatélites*

- MSI analysis system, version 1.2. (PROMEGA®, Madison, WI, EEUU)

Este ensayo se basa en la realización de PCR de cinco microsatélites (NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, MONO-27) con distintos marcadores de fluorescencia (Tabla 44) y posterior secuenciación por capilaridad mediante el sistema ABI 3130/3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, EEUU). Para el análisis de los resultados de secuenciación por capilaridad se utilizó el software Gene Mapper® 5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

**Tabla 44.** Características de los marcadores del *MSI analysis system, version 1.2.* (PROMEGA®, Madison, WI, EEUU)

MARCADOR	GEN	LOCALIZACIÓN	SECUENCIA DE REPETICIONES	RANGO DE TAMAÑO (BP)
<b>NR-21</b>	<i>SLC7A8</i>	5'UTR	(A) <sub>21</sub>	94-101
<b>BAT-26</b>	<i>MSH2</i>	Intrón 16	(A) <sub>26</sub>	103-115
<b>BAT-25</b>	<i>c-KIT</i>	Intrón 16	(A) <sub>25</sub>	114-124
<b>NR-24</b>	<i>ZNF2</i>	3'UTR	(A) <sub>24</sub>	130-133
<b>MONO-27</b>	<i>MAP4K3</i>	Intrón 13	(A) <sub>27</sub>	142-194

## ***Análisis Estadístico***

Los resultados de variables categóricas se presentan como porcentajes o proporciones. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de las variables continuas paramétricas y ordinales. En los casos con una  $p \geq 0,05$  se empleó la media y desviación estándar (DE); para las variables con  $p < 0,05$ , la mediana y el rango intercuartílico (RIQ).

Para las comparaciones entre grupos se utilizó el método de la *t-student* para las variables continuas con distribución normal y el test no paramétrico, el test de Mann-Whitney, para aquellas de distribución anormal. En cuanto a las variables categóricas, se utilizó el test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, según el tamaño de las subcategorías en la tabla de contingencia.

Además, se realizó una correlación en función del tiempo, para los valores predictivos de SG y supervivencia libre de progresión a LMA (SLP), mediante el modelo de regresión de Cox. Se consideró aquellas variables que alcanzaron una  $p < 0,150$  en la regresión univariante fueron consideradas para el posterior análisis multivariante.

Para la dicotomización de las variables continuas se determinó el valor del área bajo la curva, analizando el *receiver operating characteristic curve* (curva ROC), y se seleccionó el valor con mejor tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y menor tasa de falsos positivos (1-especificidad).

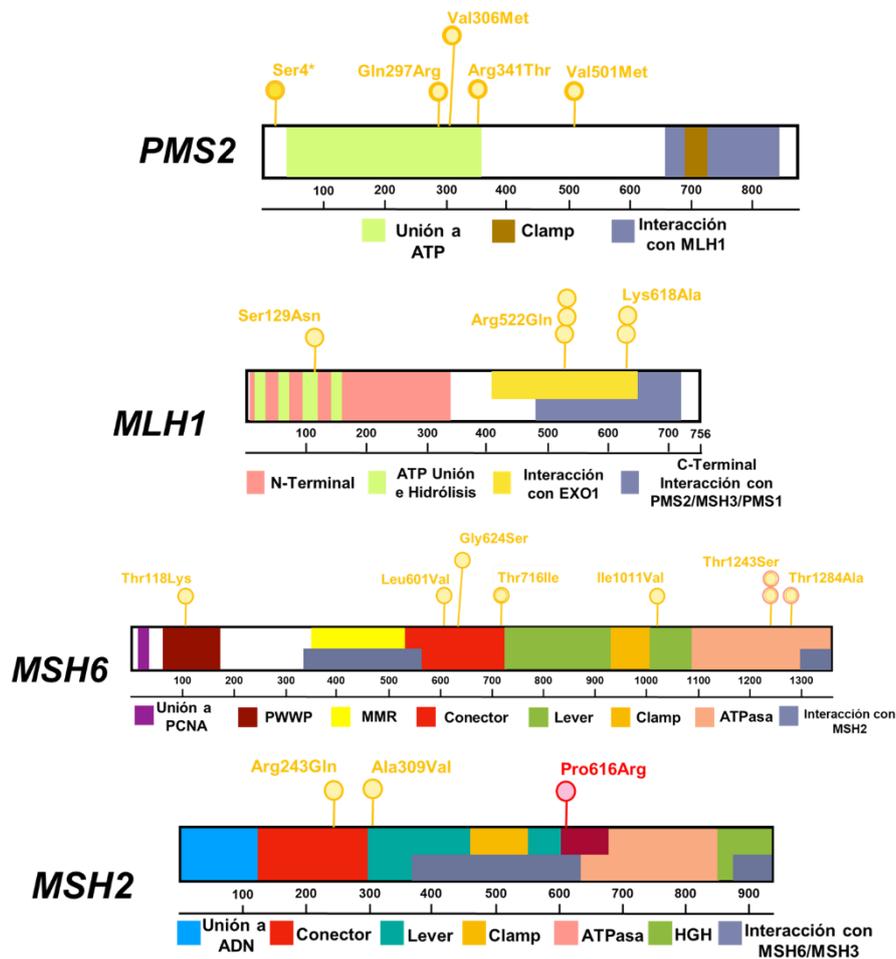
Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS 21.0 (SPSS, Inc; Chicago, IL, EEUU). Para la representación gráfica de los datos se utilizaron, además, las herramientas Powerpoint Office 2010 (Microsoft, Redmond, WA, EEUU).

## 4.3. Resultados

### 4.3.1. Variantes germinales en los genes de la vía de reparación del ADN del mismatch

De la cohorte total (N=194), veinte y dos pacientes (11,3%) portaban una variante en los principales genes de la vía del MMR (*PMS2*, *MLH1*, *MSH6*, *MSH2*). Las variantes halladas se muestran en la figura 21. Estos veintidós pacientes eran portadores de 19 variantes distintas. Dos variantes en el gen *MLH1* (p.Lys618Ala, p.Arg522Gln) fueron detectadas en dos y tres pacientes, respectivamente. Dos pacientes eran portadores de la misma variante en *MSH6* (p.Thr1243Ser). El gen más frecuentemente afectado fue *MSH6* (n=8; 36%), seguido en frecuencia por *MLH1* (n=6; 27,3%), *PMS2* (n=5; 22,7%) y *MSH2* (n=3; 13,6%).

**Figura 21.** Resumen esquemático de las variantes MMR del estudio en relación con el sitio funcional de la proteína.



Las características de las variantes germinales VUS/LP/P en los genes del MMR quedan resumidas en la tabla 45. Destacamos que, según *VAR SOME*, atendiendo a la clasificación de ACMG/AMP, la variante p.Pro616Arg (gen *MSH2*) era categorizada como LP y el resto como VUS. Utilizando la herramienta PON-MMR2, cuatro variantes fueron categorizadas como patogénicas (p.Pro616Arg y p.Ala309Val, en el gen *MSH2*; p.Arg341Thr, en el gen *PMS2*; p.Thr1284Ala, en el gen *MSH6*).

**Tabla 45.** Características de las variantes germinales de la vía del MMR halladas en los exomas.

ID	GEN	CHR	CAMBIO NC	CAMBIO AA	VAF (%)	MAF*	PON-MMR2	ACMG/AMP	#CLINVAR	INSIGHT	OTROS DDR <sup>GERM</sup>
VJ1	PMS2	7	c.1501G>A	p.Val501Met	49,8	<0,01	N	VUS	SI	SC	ERCC6L2, HELQ
VJ14			c.1022G>C	p.Arg341Thr	71	ND	P	VUS	NO	---	---
VJ15			c.11C>G	p.Ser4*	48	<0,01	---	VUS	NO	VUS	ATM, MUTYH
VJ37			c.916G>A	p.Val306Met	38	<0,01	N	VUS	SI	SC	---
VJ186			c.890A>G	p.Gln297Arg	46,9	<0,01	---	VUS	SI	---	---
VJ8	MLH1	3	c.1565G>A	p.Arg522Gln	35	<0,01	N	VUS	SI	VUS/LB	---
VJ62			c.1565G>A	p.Arg522Gln	44,1	<0,01	N	VUS	SI	VUS/LB	---
VJ63			c.1565G>A	p.Arg522Gln	51,9	<0,01	N	VUS	SI	VUS/LB	---
VJ72			c.1852_1853delinsGC	p.Lys618Ala	45	ND	N	VUS	NO	P7VUS/B	BRIP1
VJ167			c.1852_1853delinsGC	p.Lys618Ala	51,7	ND	N	VUS	NO	P7VUS/B	---
VJ225			c.386G>A	p.Ser129Asn	44,9	<0,01	N	VUS	SI	---	---
VJ11	MSH6	2	c.3727A>T	p.Thr1243Ser	53	<0,01	N	VUS	SI	VUS	BRIP1, ERCC6L2, LIG4
VJ32			c.2147C>T	p.Thr716Ile	51	<0,01	N	VUS	SI	SC	---
VJ44			c.1801C>G	p.Leu601Val	52	ND	N	VUS	SI	SC	---
RVJ19			c.353C>A	p.Thr118Lys	37	<0,01	N	VUS	NO	SC	---
VJ69			c.3031A>G	p.Ile1011Val	50	ND	N	VUS	NO	SC	---
VJ100			c.1870G>A	p.Gly624Ser	53	<0,01	N	VUS	SI	SC	ERCC6L2
VJ124			c.3850A>G	p.Thr1284Ala	53	ND	P	VUS	SI	SC	ATR
VJ148			c.3727A>T	p.Thr1243Ser	54,9	<0,01	N	VUS	NO	VUS	---
VJ48	MSH2	2	c.1847C>G	p.Pro616Arg	55	<0,01	P	LP	SI	VUS	---
VJ97			c.728G>A	p.Arg243Gln	58	<0,01	N	VUS	SI	VUS	LIG4
VJ144			c.926C>T	p.Ala309Val	47	<0,01	P	VUS	SI	---	FANCM

**Abreviaturas:** ID, número de identificación; CHR, cromosoma del inglés; NC, de nucleótido; AA, de aminoácido; VAF, frecuencia alélica de la variante; MAF\*, frecuencia alélica menor; PON-MMR2, herramienta *in silico* para evaluación de efecto deletéreo de las variantes de los genes de la vía del *mismatch*; ACMG/AMP, escuela americana de médicos genetistas y asociación de médicos patólogos; VUS, variante de significado incierto, LP, probablemente patogénicas; P, patogénico; LB, probablemente benigno; B, benigno; SD, no disponible; SC, sin clasificar; DDR<sup>GERM</sup>, variante germinal de la vía de la reparación del ADN.

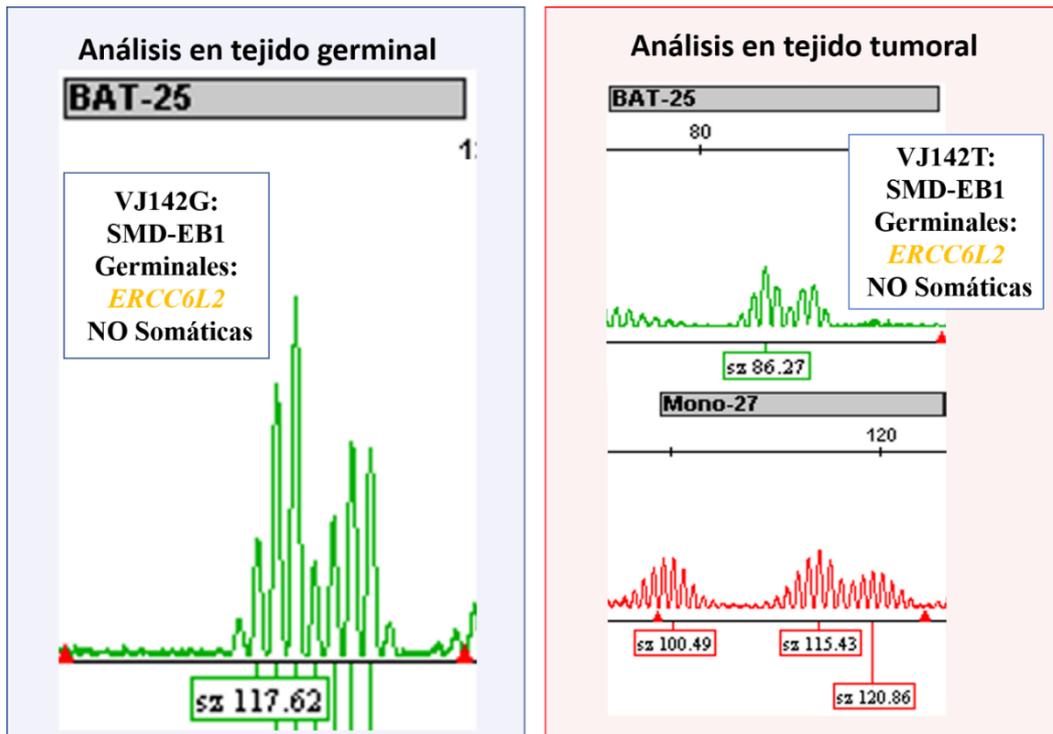
### 4.3.2 Análisis de la inestabilidad de los microsatélites en la cohorte total

Ante el hallazgo de un enriquecimiento de las variables de la vía del MMR, decidimos realizar un cribado global para detectar la presencia de inestabilidad de los microsatélites, utilizando un test molecular frecuentemente empleado en el síndrome de Lynch. En 126 pacientes de la cohorte disponíamos de ADN de tejido germinal y tumoral en los que realizar el test molecular sobre los cinco mononucleótidos incluidos en el kit de Promega. En las siguientes figuras mostramos los electroferogramas, en 10 casos de los estudiados, que presentaron alteración.

Un único caso presentó una alteración en el análisis del tejido germinal con la adición de una segunda alteración en el análisis del tejido tumoral. Es el único caso de la cohorte que, empleando la categorización en tres grupos, habitual en el contexto de los tumores sólidos, en función del grado de inestabilidad de los microsatélites, quedaría clasificado como de inestabilidad alta o MSI-H (Figura 22).

Este caso, la paciente VJ142, correspondía a una mujer que debutó con un SMD con exceso de blastos tipo 1 (9% de blastos en MO) y con una monosomía del cromosoma 7 en 15 de las metafases analizadas. La paciente presentaba antecedentes familiares muy relevantes desde el punto de vista hematológico, con un hermano diagnosticado de LMA promielocítica y un tío fallecido de una LMA (sin que se disponga de un informe más detallado sobre el diagnóstico). Los dos progenitores de la paciente presentaban como antecedente un cáncer de colon. La paciente alcanzó remisión completa tras siete ciclos de 5-azacitidina y se procedió a un alo-TPH de un hermano sano con un esquema de acondicionamiento de intensidad reducida, sin complicaciones relevantes en el periodo postrasplante, pero con recaída de la enfermedad cuatro meses tras el mismo. En el análisis WES no detectamos variantes adquiridas, si bien mediante panel dirigido con mayor profundidad de lecturas, dentro la rutina diagnóstica del centro de procedencia, se detectaron variantes subclonales en *DNMT3A* (p.547\_549del, VAF de 8,7% y P1315fs, VAF 5,29%) y *IDH1* (p.R132C, VAF de 9,86%).

**Figura 22.** Electroferogramas aberrantes en el estudio de inestabilidad de los microsatélites para el caso VJ142. El panel de la izquierda muestra el análisis en tejido germinal mostrando un alelo de mayor longitud (electroferograma superior) que el control normal (electroferograma inferior). El panel de la derecha muestra el análisis de tejido tumoral en el que, además del mononucleótido BAT-25 afectado, se añade el mononucleótido MONO-27.

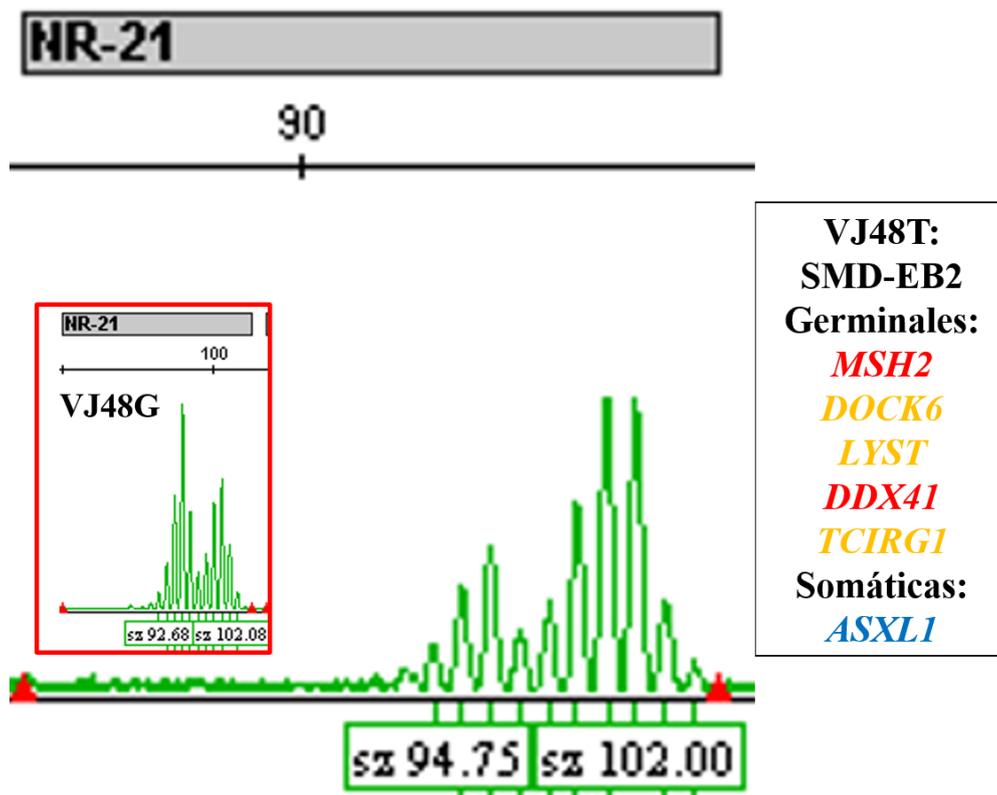


El siguiente grupo de figuras ilustra los tres casos en los que se encontró una alteración en una de las sondas de detección de MSI tanto en tejido germinal como en el tumoral y que, además, presentaban una variante germinal VUS/LP/P en uno de los genes relacionados con el MMR.

La figura 23 corresponde a una paciente portadora de una variante probablemente patogénica en el gen *MSH2* (p.Pro616Arg) del MMR que determina un cambio de sentido en la proteína. Esta misma variante ha sido descrita como probablemente patogénica en tejido germinal en tres casos de LLA en edad pediátrica (dos casos de estirpe B con una translocación de *ETV6-RUNX1* y, el tercer caso, Filadelfia positiva),<sup>318</sup> en un caso de LLA de estirpe T,<sup>319</sup> y en tres casos relacionados

con tumor sólido (mama, ovario y síndrome de Lynch).<sup>320,321</sup> La paciente fue diagnosticada a los 48 años de un SMD con exceso de blastos tipo-2 y cariotipo normal. Alcanzó remisión completa previa a un alo-TPH de un donante no emparentado. Desafortunadamente, falleció en el día+28 por una complicación infecciosa. Acompañando a la variante LP en *MSH2*, la paciente presentaba otra variante germinal *DDX41* (p.Glu256Lys) categorizada por *VAR SOME* como LP, pero no descrita hasta la fecha asociada a ningún tipo de neoplasia. Se detectó una variante adquirida en *ASXL1* (p.Glu635fs), comúnmente encontrada en neoplasia mieloide.

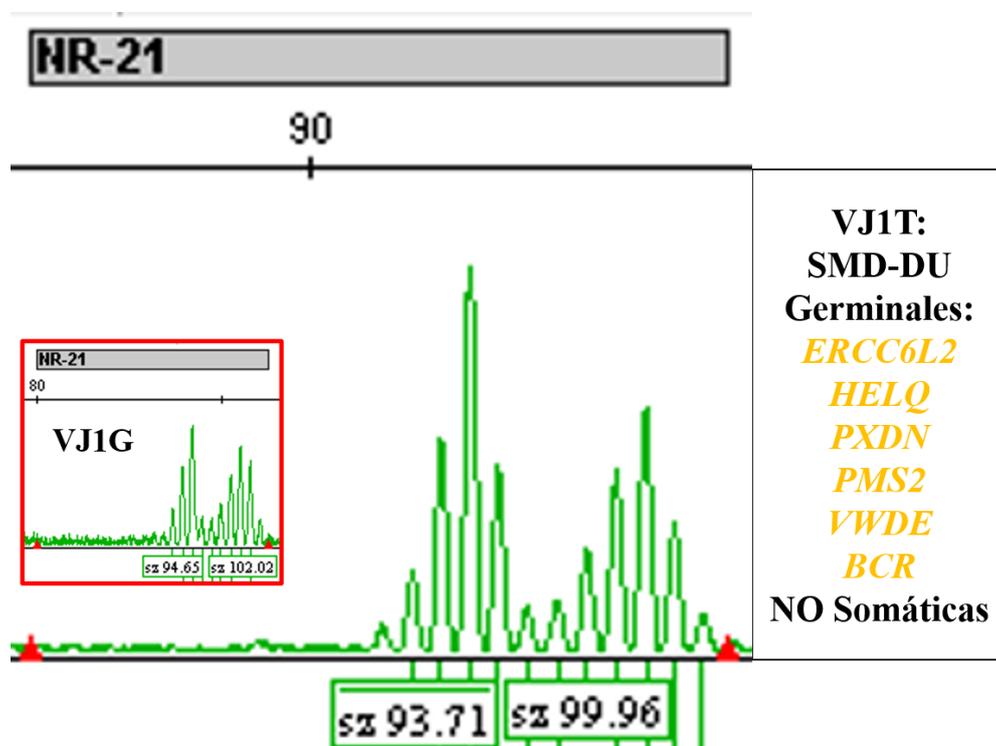
**Figura 23.** A) Electroferograma del microsatélite NR-21 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en la paciente VJ48.



La figura 24 corresponde a una paciente diagnosticada de un SMD a los 50 años con displasia de una sola línea y cariotipo normal. Presentaba neutropenia severa desde el diagnóstico como única citopenia, pero sin complicaciones clínicas ni necesidad de tratamiento específico tras dos años de seguimiento. La paciente era portadora de

variantes de significado incierto en tres genes de la reparación del ADN: en *PMS2* (p.Val501Met) de la vía MMR, en *ERCC6L2* (p.Thr355Met) y *HELQ* (p.Ser113Asn). Ninguna de estas tres variantes ha sido comunicada en tejido germinal en neoplasia. Sin embargo, la variante *PMS2* ha sido descrita como adquirida en un paciente con inestabilidad de los microsatélites, sin variante germinales en los genes de esta vía.<sup>320</sup>

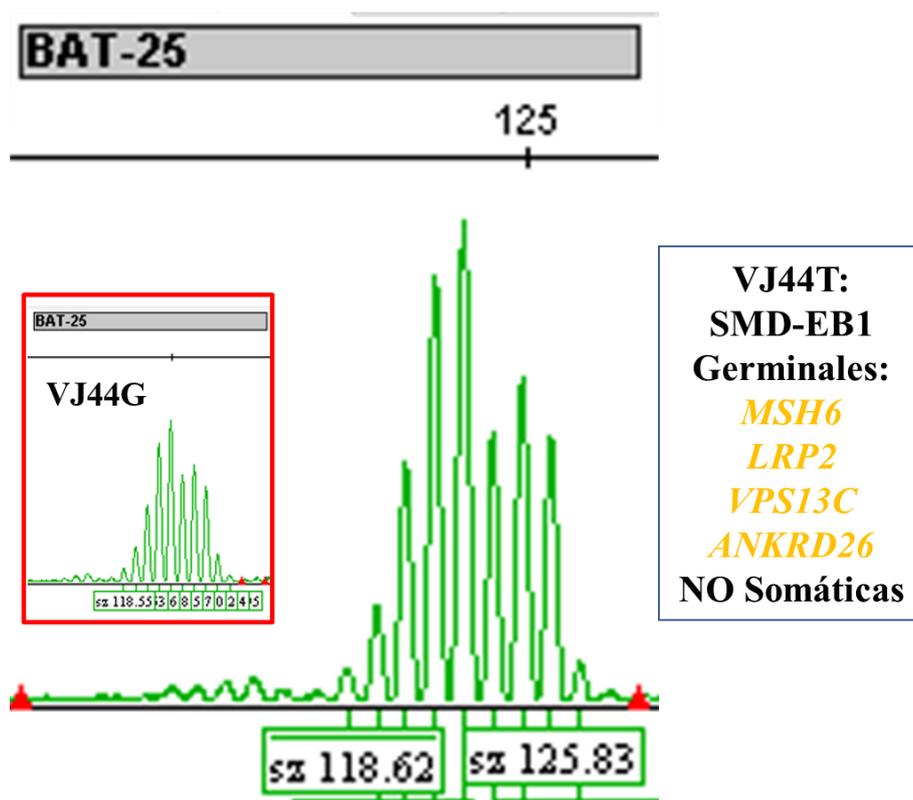
**Figura 24.** Electroferograma del microsatélite NR-21 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en la paciente VJ1.



La figura 25 corresponde a un paciente de 40 años que desarrolla una trombopenia severa previamente no conocida y recibe el diagnóstico de un SMD con exceso de blastos tipo-1 con cariotipo normal. Sin antecedentes familiares de neoplasia, el análisis de inestabilidad de los microsatélites mostró el mismo mononucleótido alterado en tejido germinal y tumoral. Detectamos una variante germinal de significado incierto en *MSH6* del MMR, únicamente descrita como adquirida en un carcinoma neuroendocrino.<sup>322</sup> Sin duda, el hallazgo más relacionado con la forma de presentación de este paciente es la presencia de una variante germinal en *ANKRD26*, en su extremo

5'UTR (c.-118C>G). Aunque esta variante en concreto no ha sido comunicada, hasta la fecha, asociada con el trastorno plaquetar relacionado con *ANKRD26*, son numerosas las variantes descritas, en esta misma posición, pero con otro cambio nucleotídico en casos de trastorno familiar plaquetar con predisposición a neoplasia mieloide asociado a este gen.

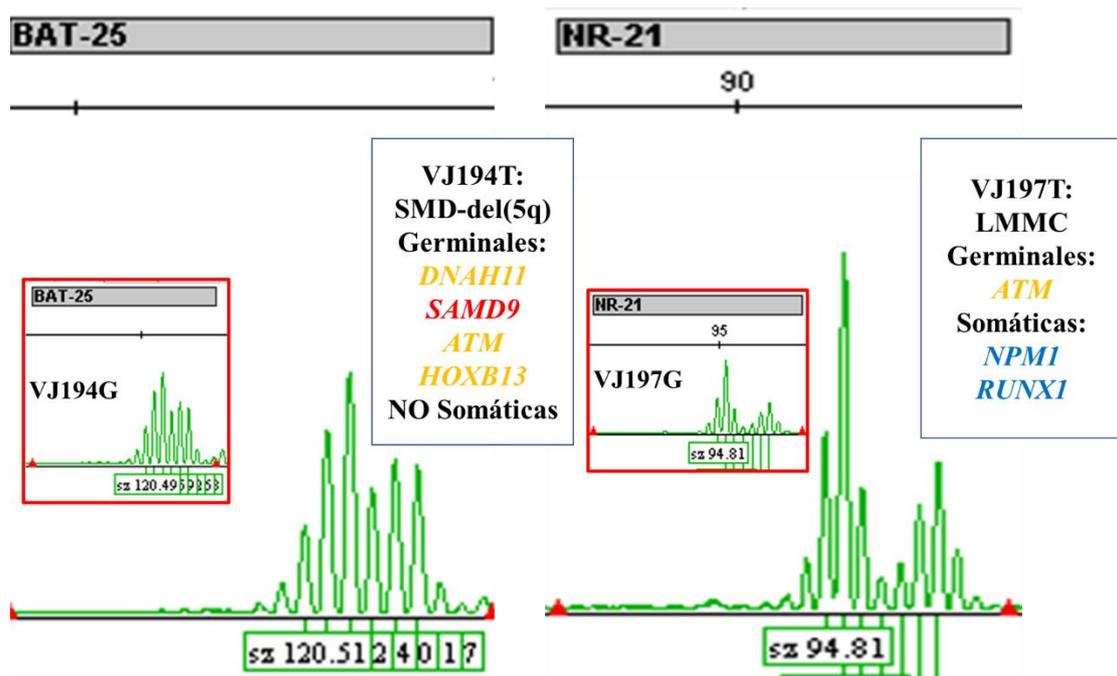
**Figura 25.** Electroferograma del microsatélite BAT-25 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en la paciente VJ44.



La figura 26 muestra a dos pacientes con inestabilidad en un microsatélite tanto en tejido germinal como tumoral. La paciente VJ194 se diagnosticó a los 19 años de edad de un SMD con del(5q) aislada. La alta sospecha de predisposición, dada una edad tan temprana de debut, se confirmó con la presencia de una variante truncante en heterocigosis en el gen *SAMD9*. Además de esta variante, presentaba una alteración en el gen *ATM* que fue categorizada como de significado incierto. No se detectaron en esta paciente alteraciones en los genes comúnmente implicados en el desarrollo de MSI. La segunda paciente con una variante germinal en *ATM*, categorizada de significado

incierto, se diagnosticó a los 57 años de edad de una LMMC con cariotipo normal sin otras variantes germinales detectadas. Sin embargo, se observaron variantes adquiridas en los genes *NPM1* y *RUNX1* con una VAF muy baja en ambos casos, 11% y 5%, respectivamente.

**Figura 26.** Electroferogramas del microsatélite BAT-25 y NR-21 alterados tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en los pacientes VJ194 y VJ197, respectivamente.



La figura 27 muestra los últimos cuatro pacientes con alteración en, al menos, un microsatélite. El paciente VJ216 se diagnosticó con 56 años de edad de un SMD con exceso de blastos tipo-2 y cariotipo complejo, incluyendo una delección 5q y una monosomía de cromosoma 7 en 10 de las 20 metafases analizadas. Este paciente presentaba una doble mutación heterocigota en *CDANI*, gen causante de un tipo de anemia diseritropoyética congénita. Esta entidad se diagnostica en la infancia temprana y es causada por variantes patogénicas en homocigosis, si bien se han descrito casos en heterocigosis compuesta, como la de nuestro paciente.

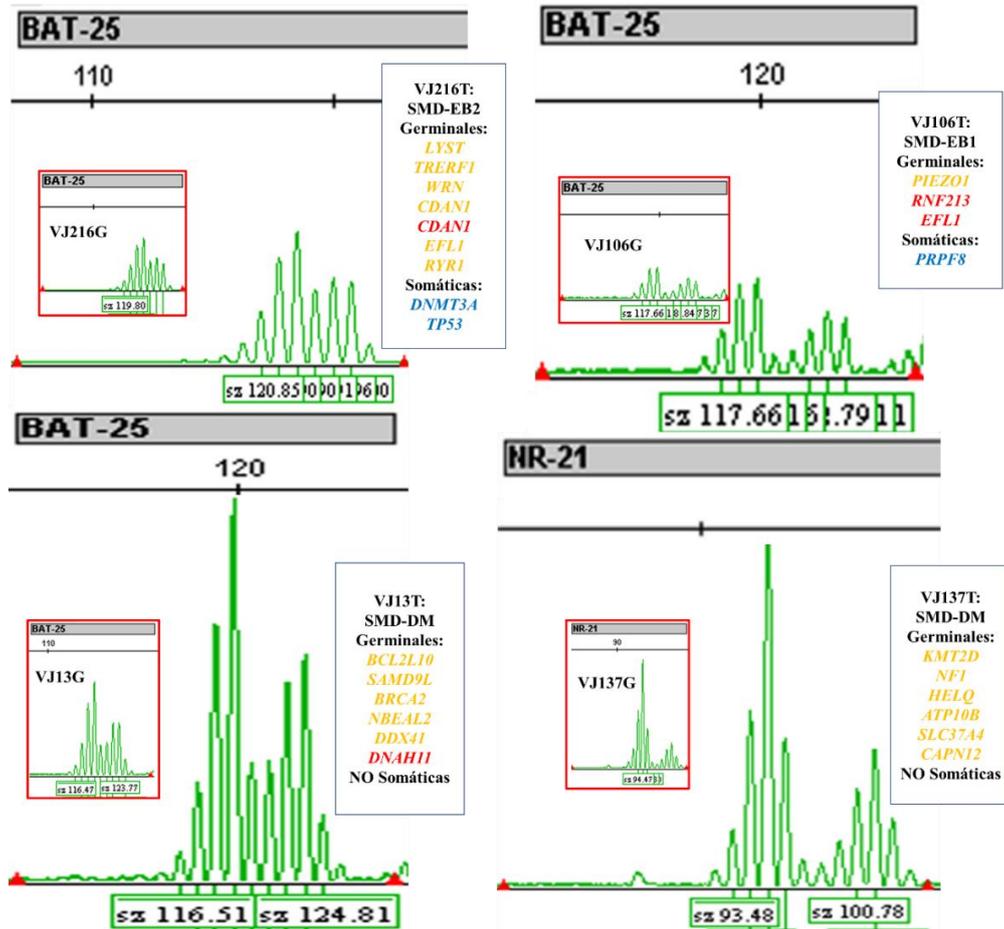
El paciente VJ106 se diagnosticó, a los 59 años, de un SMD con exceso de blastos tipo-1 y con cariotipo normal. Presenta dos variantes categorizadas como

probablemente patogénicas, *RNF213* (p.Tyr831\*) y *EFL1* (p.Gln172Arg), pero no descritas, hasta la fecha, asociadas a neoplasia.

El VJ13 corresponde a una paciente diagnosticada a los 50 años de un SMD con displasia multilínea y cariotipo normal. Presentaba dos variantes heterocigotas en genes muy relacionados con la predisposición a neoplasia mieloide, *SAMD9L* (p.Val56Ala) y *DDX41* (p.Pro179Leu). Sin embargo, ninguna de estas dos variantes ha sido descrita como predisponente a neoplasia mieloide y, además, son categorizadas como de significado incierto. La paciente era portadora de una variante germinal, también de significado incierto, en un gen de la reparación del ADN (*BRCA2*) pero no presentaba alteraciones en los genes relacionados con la inestabilidad de los microsatélites.

La paciente VJ137, diagnosticada a los 40 años, de un SMD con displasia multilínea y cariotipo normal. No se detectó ninguna variante germinal LP/P. Presentando una variante germinal en una helicasa de la reparación del ADN (*HELQ*) y en un gen de predisposición a neoplasia mieloide (*NFI*), con características mieloproliferativas.

**Figura 27.** Electroferogramas del microsatélite BAT-25 alterado tanto en el tejido germinal (recuadro rojo) como en el tumoral (electroferograma de mayor tamaño) en los pacientes VJ216, VJ106 y VJ13. Microsatélite NR-21 alterado tanto en el tejido germinal como tumoral del paciente VJ137.



### 4.3.3. Integración de datos clínicos y genómicos

Al comparar los 22 pacientes portadores de, al menos, una variante germinal VUS/LP/P de la vía del MMR con el resto de los pacientes (n=172), encontramos que los primeros presentaban un mayor porcentaje de displasia unilínea (38,9% vs. 16,2%, p=0,020) y un menor porcentaje de citogenética anormal al diagnóstico (5,6% vs. 35,8%, p=0,009), con un porcentaje inferior de pacientes con citogenética pobre/muy pobre según el IPSS-R (5,6% vs. 25,2%, p=0,062) (Tabla 46).

**Tabla 46.** Comparación de las características al diagnóstico de los pacientes con y sin variantes germinales MMR<sup>GERM</sup>.

VARIABLE	(A) Con MMR <sup>GERM</sup> (n=22)	(B) Sin MMR <sup>GERM</sup> (n=172)	p (A vs. B)
Edad al diagnóstico, años, mediana (RIQ)	49 (33-54)	49 (40-56)	0,597
Género (F/M), %	40,9 / 59,1	56,2 / 43,8	0,175
Leucocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	3,9 (2,5-6,2)	3,9 (2,5-5,7)	0,818
Neutrófilos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	1,6 (0,6-3)	1,5 (0,8-2,9)	0,672
Monocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	0,4 (0,3-0,5)	0,3 (0,2-0,7)	0,314
Hemoglobina, g/dl, media ± DE	10,9 ± 2,9	10,6 ± 2,7	0,648
VCM, fl, media ± DE	95,9 ± 11,1	98,5 ± 11,5	0,372
Plaquetas, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	104 (44-248)	107 (58,7-221,5)	0,887
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	315 (256-393)	290 (204-419)	0,470
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	173 (88-684)	249 (92-595)	0,724
sEPO, UI/L, mediana (RIQ)	53 (32-489)	72 (29-272)	0,977
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	23,5	15,1	0,367
Antecedentes familiares de neoplasia hematológica, %	5,9	11,1	0,507
Antecedentes familiares SMD y/o LMA, %	5,9	9,7	0,606
Antecedentes familiares de neoplasia oncológicas, %	6,7	19,3	0,227
Fibrosis en MO*, %	9,1	11	0,330
Celularidad de MO (hipo vs. normo/hiper), %	30 vs. 70	49 vs. 51	0,110
Blastos en MO, %, mediana (RIQ)	2 (1-5)	3 (1-7)	0,243
Líneas de displasia, 1 vs. 2/3, %	38,9 vs. 61,1	16,2 vs. 83,8	<b>0,020</b>
Citogenética y/o FISH anormal, %	5,6	35,8	<b>0,009</b>
Riesgo citogenético pobre/muy pobre según IPSS-R, %	5,6	25,2	0,062
IPSS-R, ≤3,5 vs. >3,5, %	78,9 vs. 21,1	66,9 vs. 33,1	0,286

Notas: \* porcentaje calculados sobre los casos que se realizó biopsia ósea. En negrita, p<0,05.

Abreviaturas: GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisado.

El predominio de estas características de buen pronóstico, se reflejan en un menor porcentaje de progresión a LMA, pero sin alcanzar la significación estadística (5% vs. 13,5%,  $p=0,277$ ) (Tabla 49).

**Tabla 47.** Comparación de los pacientes con y sin variantes MMR<sup>GERM</sup> en relación a la evolución de la enfermedad.

VARIABLE	(A) Con MMR <sup>GERM</sup> (n=22)	(B) Sin MMR <sup>GERM</sup> (n=172)	P (A vs. B)
<b>Progresión a LMA, %</b>	5	13,5	0,277
<i>Exitus, %</i>	27,3	20,9	0,496
<b># Progresión a LMA, %</b>	4,8	11	0,372
<i># Exitus, %</i>	13,6	11	0,718

**Nota:** # Datos censurado a fecha del alo-TPH. En negrita,  $p<0,05$ .

**Abreviaturas:** LMA, leucemia mieloblástica aguda.

En el análisis de la regresión de Cox univariante, la presencia de una variante MMR<sup>GERM</sup>, no proporcionó un valor significativo pronóstico significativo para la SLP y la SG (Tablas suplementarias 4 y 5, respectivamente).

## 4.4. Discusión

La inestabilidad de los microsatélites en las neoplasias mieloides ha sido muy poco explorada y, los estudios realizados muestran resultados muy contradictorios. Ello puede ser el reflejo de la heterogeneidad de técnicas y definiciones para establecer los estados de MSI y de la heterogeneidad de las propias series investigadas. De manera llamativa, los estudios, fundamentalmente japoneses, realizados entre 1995 y 2000, describían un predominio muy marcado de la MSI en los SMD frente a las LMA y resto de enfermedades mieloides. Así, Oyahshiki y colaboradores describen como no encontraron ningún caso con LMC y MSI, detectando MSI en <1% de pacientes con LMA *de novo*, lo que contrastaba con el 50% de pacientes con SMD o con LMA secundaria a SMD que describían con positividad para MSI.<sup>323,324</sup> Estos estudios y sus resultados han sido cuestionados posteriormente, por el uso de técnicas no estandarizadas y poco específicas. Aunque series recientes de hasta 1300 casos, cribados mediante NGS, descartan la presencia de MSI en LMA (incluso en LMA relacionada con la terapia), los resultados en SMD no habían sido explorados hasta nuestro estudio.<sup>325</sup>

Tan sólo uno de los casos de la cohorte podía ser categorizado como con inestabilidad de los microsatélites alta, según los criterios usados para tumores sólidos. Con presencia de un patrón aberrante en el microsatélite BAT-25 en el análisis germinal, en el tejido tumoral se añadió un segundo marcador alterado, MONO-27. El caso es de particular interés debido a la escasez de lesiones detectadas que pudieran explicar este fenotipo. Portadora de una variante germinal en *ERCC6L2*, la paciente no presentaba otras variantes adquiridas, pero sí la monosomía del cromosoma 7. De tal manera que resulta tentador achacar ese aumento en el grado de MSI a la haploinsuficiencia de genes localizados en el cromosoma 7. Dentro de los principales genes ya relacionados con la MSI, *PMS2* es el único localizado en el cromosoma 7, en la banda 7p22. Sin embargo, el hecho de que el resto de portadores de monosomía 7 en nuestra cohorte no muestren MSI, descarta esta lesión adquirida como hecho suficiente.

Como ocurría en el primer capítulo de este trabajo, las variantes encontradas en el gen *ERCC6L2* se convirtieron en foco de nuestra atención. Fundamentalmente, por ser la única lesión germinal detectada en el único paciente con MSI-H. Y, además,

porque la adquisición del segundo microsatélite alterado se acompañó, exclusivamente, de la alteración recurrente en los escasos pacientes descritos, hasta la fecha, con síndrome de predisposición a neoplasia mieloide asociado a *ERCCL6*, la monosomía del cromosoma 7.<sup>299</sup> En el segundo caso con variante germinal en *ERCC6L2*, con fenotipo de MSI bajo, el cromosoma 7 no presentaba lesión adquirida. Sin embargo, sí se detectaron otras lesiones, germinales, que se localizaban en dicho cromosoma: dos variantes germinales VUS en heterocigosis en *PMS2* (gen del MMR) y en *VWDE*, ambos localizados en el brazo corto del cromosoma 7.

Otra cuestión abierta es determinar el grado preciso en el que la MSI contribuye a la leucemogénesis. La MSI parece más prevalente en las LMA secundarias a terapia (hasta un 50%) que en los casos *de novo*, donde el máximo porcentaje comunicado alcanza al 5% de los casos.<sup>326</sup> Esta diferencia entre las formas *de novo* y tras quimio/radioterapia podría sugerir que, dentro de la patogénesis, se requiera de periodos prolongados de inmunosupresión (como ocurre a lo largo de los ciclos de quimioterapia), lo que reduciría las capacidades de la vigilancia inmune para eliminar los clones alterados e inmunógenos que convivan con la hematopoyesis normal. De hecho este mecanismo ha sido propuesto para explicar el desarrollo de LMA/SMD en el periodo de inmunosupresión tras trasplante de órgano sólido.<sup>327</sup> Los autores de este trabajo encontraron una relación directa entre el uso de azatioprina, un profármaco de la 6-mercaptopurina (un alquilante), que genera daño en el ADN, con predominio de los errores de desapareamiento, aumentando la presión sobre el sistema MMR. De hecho, en 7 pacientes con LMA/SMD tras trasplante de órgano sólido, encontraron una marcada disminución en la expresión de los genes del MMR en tejido hematopoyético. El uso de azatioprina provocaba, en experimentos *in vitro*, la selección y expansión de clones deficientes en el sistema MMR, que mostraban otras alteraciones (metilación) que les permitían equilibrar el déficit en el MMR, a cambio de ocasionar una expansión de un clon maligno. Los autores concluyen subrayando una idea, en nuestra opinión, clave: las células con MMR deficiente no son malignas *per se*, pero debido a que desarrollan una tasa constante e incrementada de mutaciones, son más susceptibles de acumular lesiones adquiridas que desencadenen la selección clonal maligna. En nuestra cohorte no hemos incluido pacientes que hubieran desarrollado SMD tras tratamiento quimio o radioterápico previo. Aun así, los 10 pacientes en los que detectamos alteración en uno de los microsatélites, mostraban ya esa alteración en tejido germinal,

lo que podría determinar una especial susceptibilidad heredada a presentar una mayor tasa de lesiones adquiridas.

En cualquier caso, la frecuencia de SMD *de novo* con alta MSI en nuestra cohorte (sólo un paciente cumple criterios de MSI-H) es tan baja como la comunicada recientemente en LMA *de novo*.<sup>325</sup> Entre las hipótesis que han intentado explicar la relativa escasa prevalencia de MSI en leucemias y SMD frente a la mayoría de los tumores sólidos, destaca la desarrollada por Maletzki y colaboradores.<sup>328</sup> Estos autores proponen que, al contrario de lo que ocurre en los tumores sólidos, en los que las células malignas se encuentran “aisladas” por las células epiteliales y del estroma, las células circulantes (leucémicas) cancerígenas MSI positivas, no pueden ocultarse del sistema inmune con la misma eficacia. Para apoyar esta hipótesis, mostraron como las células leucémicas MSI eran particularmente susceptibles al ataque por parte de linfocitos T específicos, al presentar abundantes neoantígenos secundarios a su alta tasa mutacional. Se postula que esa podría ser la causa no sólo del limitado número de leucemias MSI positivas, sino del hecho de una menor frecuencia de metástasis a distancia en el cáncer colorrectal MSI positivo.<sup>329</sup> Esta teoría no se aplicaría a nuestros casos, donde el daño, al ser constitucional-germinal, sería tolerado, pero podría explicar la ausencia de clones con segundo *hit* adquirido.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es el uso de un sistema de detección de MSI diseñado para el análisis de MSI en cáncer sólido.<sup>330</sup> En este sentido, el grupo de Haferlach mostró que microsatélites localizados en regiones dañadas con frecuencia en neoplasia mieloide (5q, 7q, 8q, 11q, 21q), mostraban patrones deficientes en el 14,7% de los casos para el microsatélite D7S515 (banda 7q22) y del 13,3% de los casos en el microsatélite IRF1 (banda 5q31.1). Ello contrastaba de manera marcada con el escaso 6% de positivos que encontraron en los microsatélites de consenso utilizados en el cáncer colorrectal.<sup>331</sup> En este trabajo, con el uso de sondas *ad hoc* para neoplasias mieloides, encontraron un mayor tasa de MSI en pacientes con LMA secundaria a quimio/radioterapia, en aquellas secundarias a SMD previo y en aquellas con alteraciones citogenéticas. Curiosamente, el único dato que no correlacionaba mayor número de lesiones con mayor tasa de MSI fue la presencia de mutaciones en *TP53*. No encontraron una mayor frecuencia de mutaciones en *TP53* en pacientes MSI positivos, lo que los llevó a postular la independencia entre los mecanismos de MMR y ciclo

celular, mediado por *TP53*, en las neoplasias mieloides. En nuestra cohorte, los pacientes con variante germinal en el sistema del MMR presentaban características de mejor pronóstico con respecto al resto de la cohorte.

Es previsible un interés creciente en el campo hematológico en la inestabilidad de los microsatélites. Una de las clases de fármacos más prometedoras en el momento actual, los inhibidores de *checkpoint* inmune, han mostrado resultados particularmente buenos en tumores sólidos con MSI y, además, ya están siendo explorados en neoplasias mieloides, con un interés particular en aquellas que recaen tras alo-TPH.<sup>332,333</sup> Sin embargo, será obligatorio aclarar si es necesario un test específico para neoplasia hematológica para caracterizar el déficit funcional en la vía de MMR.

## 4.5. Conclusiones

1. Las variantes germinales en los genes de la reparación del *mismatch* se asocian con características al diagnóstico propias de una menor agresividad de la enfermedad. Con el seguimiento actual no hemos encontrado relación significativa con una mayor tasa de neoplasia sólida en los portadores o en sus familiares.

2. Hemos encontrado un número de casos relevante con baja inestabilidad de microsatélites en tejido germinal. Estos casos presentaban variantes germinales en genes de la reparación del MMR, pero también en otros genes de otras vías de la reparación del ADN. Requeriremos de nuevos estudios para clarificar el verdadero impacto de esta alteración germinal.



# Conclusiones generales



1. Un 27,8% de los pacientes diagnosticados de SMD a edad inusualmente temprana, sin disfunción orgánica previa, presenta una variante germinal patogénica o probablemente patogénica potencialmente predisponente de su enfermedad. Estas variantes afectan, en su mayoría, a genes no considerados en la actualidad en la predisposición a neoplasia mieloide.
  
2. Encontramos dos asociaciones genotipo-fenotipo relevante: i) un porcentaje significativo de los SMD con sideroblastos en anillo diagnosticados en edad adulta presentan variantes germinales en genes responsables de la anemia sideroblástica congénita, sugiriendo la penetrancia incompleta del daño causado por estas alteraciones, ii) Describimos, por vez primera, variantes germinales en *ERCC6L2*, de manera recurrente, en pacientes por encima de los 20 años, asociadas a alteraciones genómicas de mal pronóstico y curso evolutivo agresivo.
  
3. Las variantes germinales en los genes de la reparación del *mismatch* y la alteración funcional de esta vía se relaciona con características al diagnóstico propias de una menor agresividad de la enfermedad. Con el seguimiento actual no hemos encontrado relación significativa con una mayor tasa de neoplasia sólida en los portadores o en sus familiares.



# Referencias



1. Dao, K. H. T. Myelodysplastic Syndromes: Updates and Nuances. *Medical Clinics of North America* (2017) doi:10.1016/j.mcna.2016.09.006.
2. Solary, E. & Itzykson, R. How I treat chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* (2017) doi:10.1182/blood-2017-04-736421.
3. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* (2016) doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
4. Cazzola, M. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* **383**, 1358–1374 (2020).
5. Chan, O., Renneville, A. & Padron, E. Chronic myelomonocytic leukemia diagnosis and management. *Leukemia* **35**, 1552–1562 (2021).
6. Goldberg, S. L. *et al.* Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *Journal of Clinical Oncology* (2010) doi:10.1200/JCO.2009.25.2395.
7. Rollison, D. E. *et al.* Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* (2008) doi:10.1182/blood-2008-01-134858.
8. Hasle, H., Kerndrup, G. & Jacobsen, B. B. Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions. *Leukemia* **9**, 1569–1572 (1995).
9. Srour, S. A. *et al.* Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001–12. *British Journal of Haematology* (2016) doi:10.1111/bjh.14061.
10. Niemeyer, C. M. & Flotho, C. Juvenile myelomonocytic leukemia: who's the driver at the wheel? *Blood* **133**, 1060–1070 (2019).
11. Morton, L. M. *et al.* Association of Chemotherapy for Solid Tumors With Development of Therapy-Related Myelodysplastic Syndrome or Acute Myeloid Leukemia in the Modern Era. *JAMA Oncol* **5**, 318–325 (2019).
12. Takahashi, K. *et al.* Clinical characteristics and outcomes of therapy-related chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **122**, 2807–2811; quiz 2920 (2013).
13. Pellagatti, A. & Boulwood, J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology* (2015) doi:10.1111/ejh.12515.
14. Haase, D. *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **110**, 4385–95 (2007).

15. Raza, A. & Galili, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer* **12**, 849–859 (2012).
16. Greenberg, P. L. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **120**, 2454–65 (2012).
17. Schanz, J. *et al.* New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology* (2012) doi:10.1200/JCO.2011.35.6394.
18. Starczynowski, D. T. *et al.* MicroRNA-146a disrupts hematopoietic differentiation and survival. *Experimental Hematology* (2011) doi:10.1016/j.exphem.2010.09.011.
19. Ribezzo, F. *et al.* Rps14, Csnk1a1 and miRNA145/miRNA146a deficiency cooperate in the clinical phenotype and activation of the innate immune system in the 5q- syndrome. *Leukemia* (2019) doi:10.1038/s41375-018-0350-3.
20. Jerez, A. *et al.* Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *Journal of Clinical Oncology* **30**, 1343–1349 (2012).
21. Van den Berghe, H. *et al.* Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* **251**, 437–438 (1974).
22. Barlow, J. L. *et al.* A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* **16**, 59–66 (2010).
23. Starczynowski, D. T. *et al.* Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med* **16**, 49–58 (2010).
24. Schneider, R. K. *et al.* Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell* **26**, 509–520 (2014).
25. Stengel, A., Kern, W., Haferlach, T., Meggendorfer, M. & Haferlach, C. The 5q deletion size in myeloid malignancies is correlated to additional chromosomal aberrations and to TP53 mutations. *Genes Chromosomes and Cancer* (2016) doi:10.1002/gcc.22377.
26. Möllgård, L. *et al.* Clinical effect of increasing doses of lenalidomide in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities. *Haematologica* (2011) doi:10.3324/haematol.2010.039669.
27. Kantarjian, H. *et al.* The heterogeneous prognosis of patients with myelodysplastic syndrome and chromosome 5 abnormalities: How does it relate to the original lenalidomide experience in MDS? *Cancer* (2009) doi:10.1002/cncr.24575.

28. Haase, D. *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* (2007) doi:10.1182/blood-2007-03-082404.
29. Jerez, A. *et al.* Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: Clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* **119**, 6109–6117 (2012).
30. McNerney, M. E. *et al.* CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood* (2013) doi:10.1182/blood-2012-04-426965.
31. Singh, H. *et al.* Putative RNA-splicing gene LUC7L2 on 7q34 represents a candidate gene in pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood Cancer Journal* (2013) doi:10.1038/bcj.2013.16.
32. Ernst, T. *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics* (2010) doi:10.1038/ng.621.
33. Nagamachi, A. *et al.* Haploinsufficiency of SAMD9L, an Endosome Fusion Facilitator, Causes Myeloid Malignancies in Mice Mimicking Human Diseases with Monosomy 7. *Cancer Cell* (2013) doi:10.1016/j.ccr.2013.08.011.
34. Paulsson, K., Säll, T., Fioretos, T., Mitelman, F. & Johansson, B. The incidence of trisomy 8 as a sole chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age, prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology. *Cancer Genetics and Cytogenetics* (2001) doi:10.1016/S0165-4608(01)00486-1.
35. De Souza Fernandez, T., Ornellas, M. H., Otero De Carvalho, L., Tabak, D. & Abdelhay, E. Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* (2000) doi:10.1016/S0145-2126(00)00056-4.
36. Sloand, E. M. *et al.* CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* (2007) doi:10.1182/blood-2006-01-030643.
37. Solé, F. *et al.* Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* (2000) doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01868.x.
38. Ogawa, S. Genetics of MDS. *Blood* (2019) doi:10.1182/blood-2018-10-844621.
39. Saygin, C. & Godley, L. A. Genetics of Myelodysplastic Syndromes. *Cancers (Basel)* **13**, 3380 (2021).

40. Walter, M. J. *et al.* Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* (2011) doi:10.1038/leu.2011.44.
41. Delhommeau, F. *et al.* Mutation in TET2 in myeloid cancers. *New England Journal of Medicine* (2009) doi:10.1056/NEJMoa0810069.
42. Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* (2010) doi:10.1038/nature09586.
43. Di Nardo, C. D. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia* (2016) doi:10.1038/leu.2015.211.
44. Haferlach, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* (2014) doi:10.1038/leu.2013.336.
45. Prensner, J. R. & Chinnaiyan, A. M. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nature Medicine* (2011) doi:10.1038/nm0311-291.
46. Nikoloski, G. *et al.* Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics* (2010) doi:10.1038/ng.620.
47. Bejar, R. *et al.* Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine* (2011) doi:10.1056/NEJMoa1013343.
48. Khan, S. N. *et al.* Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia* (2013) doi:10.1038/leu.2013.80.
49. Shi, J. *et al.* The Polycomb complex PRC2 supports aberrant self-renewal in a mouse model of MLL-AF9;Nras(G12D) acute myeloid leukemia. *Oncogene* **32**, 930–8 (2013).
50. Boultonwood, J. *et al.* Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* (2010) doi:10.1038/leu.2010.20.
51. Yang, H. *et al.* Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood* (2018) doi:10.1182/blood-2017-06-789669.
52. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature10496.
53. Makishima, H. *et al.* Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics* **49**, 204–212 (2017).
54. Wahl, M. C., Will, C. L. & Lührmann, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* (2009) doi:10.1016/j.cell.2009.02.009.

55. Fei, D. L. *et al.* Wild-Type U2AF1 Antagonizes the Splicing Program Characteristic of U2AF1-Mutant Tumors and Is Required for Cell Survival. *PLoS Genetics* (2016) doi:10.1371/journal.pgen.1006384.
56. Yoshida, K. & Ogawa, S. Splicing factor mutations and cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (2014) doi:10.1002/wrna.1222.
57. Mupo, A. *et al.* Hemopoietic-specific Sf3b1-K700E knock-in mice display the splicing defect seen in human MDS but develop anemia without ring sideroblasts. *Leukemia* (2017) doi:10.1038/leu.2016.251.
58. Shiozawa, Y. *et al.* Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia. *Nature Communications* (2018) doi:10.1038/s41467-018-06063-x.
59. Gruber, S. *et al.* Evidence that Loading of Cohesin Onto Chromosomes Involves Opening of Its SMC Hinge. *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.08.048.
60. Kon, A. *et al.* Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature Genetics* (2013) doi:10.1038/ng.2731.
61. Noutsou, M. *et al.* The Cohesin Complex Is Necessary for Epidermal Progenitor Cell Function through Maintenance of Self-Renewal Genes. *Cell Reports* (2017) doi:10.1016/j.celrep.2017.09.003.
62. Jädersten, M. *et al.* TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *Journal of Clinical Oncology* (2011) doi:10.1200/JCO.2010.31.8576.
63. Montalban-Bravo, G. *et al.* Impact of the number of mutations in survival and response outcomes to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget* (2018) doi:10.18632/oncotarget.23882.
64. Bejar, R. *et al.* Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology* (2014) doi:10.1200/JCO.2013.52.3381.
65. Wong, T. N. *et al.* Cellular stressors contribute to the expansion of hematopoietic clones of varying leukemic potential. *Nature Communications* (2018) doi:10.1038/s41467-018-02858-0.
66. Hosono, N. *et al.* Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. *Oncotarget* (2017) doi:10.18632/oncotarget.14130.

67. Jädersten, M. *et al.* Clonal heterogeneity in the 5q- syndrome: P53 expressing progenitors prevail during lenalidomide treatment and expand at disease progression. *Haematologica* (2009) doi:10.3324/haematol.2009.011528.
68. Schneider, R. K. *et al.* Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nature Medicine* (2016) doi:10.1038/nm.4047.
69. Such, E. *et al.* Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* (2011) doi:10.3324/haematol.2010.030957.
70. Leukemia, M. *et al.* Prognostic score including gene mutations in chronic Myelomonocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* (2013) doi:10.1200/JCO.2012.47.3314.
71. Merlevede, J. *et al.* Mutation allele burden remains unchanged in chronic myelomonocytic leukaemia responding to hypomethylating agents. *Nature Communications* (2016) doi:10.1038/ncomms10767.
72. Malcovati, L. *et al.* Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood* (2014) doi:10.1182/blood-2014-03-560227.
73. Palomo, L. *et al.* Impact of SNP array karyotyping on the diagnosis and the outcome of chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features or no metaphases. *American Journal of Hematology* (2016) doi:10.1002/ajh.24227.
74. Itzykson, R. *et al.* Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* (2013) doi:10.1182/blood-2012-06-440347.
75. Itzykson, R. & Solary, E. An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* (2013) doi:10.1038/leu.2013.100.
76. Fuster, J. J. *et al.* Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* (2017) doi:10.1126/science.aag1381.
77. Vardiman, J. W. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* (2016) doi:10.1182/blood-2016-03-643544.The.
78. Komrokji, R. S. *et al.* Autoimmune diseases and myelodysplastic syndromes. *American Journal of Hematology* (2016) doi:10.1002/ajh.24333.
79. Greenberg, P. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**, 2079–88 (1997).

80. Greenberg, P. L. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **120**, 2454–65 (2012).
81. Zahid, M. F. *et al.* Spectrum of autoimmune diseases and systemic inflammatory syndromes in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* (2017) doi:10.1080/10428194.2016.1243681.
82. Fraison, J. B. *et al.* Efficacy of Azacitidine in autoimmune and inflammatory disorders associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia Research* (2016) doi:10.1016/j.leukres.2016.02.005.
83. Tsagaratou, A. *et al.* TET proteins regulate the lineage specification and TCR-mediated expansion of iNKT cells. *Nature Immunology* (2017) doi:10.1038/ni.3630.
84. Yue, X. *et al.* Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *Journal of Experimental Medicine* (2016) doi:10.1084/jem.20151438.
85. Fenaux, P. *et al.* Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology* (2009) doi:10.1016/S1470-2045(09)70003-8.
86. El-Fattah, M. A. Clinical Prognostic Factors and Survival Outcome Of Chronic Myelomonocytic Leukemia: Reviewing 3,686 Patients. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* (2016) doi:10.1016/j.clml.2016.04.018.
87. Elena, C. *et al.* Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* (2016) doi:10.1182/blood-2016-05-714030.
88. Koreth, J. *et al.* Role of reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in older patients with de novo myelodysplastic syndromes: An international collaborative decision analysis. *Journal of Clinical Oncology* (2013) doi:10.1200/JCO.2012.46.8652.
89. Garcia-Manero, G., Chien, K. & Montalban-Bravo, G. Myelodysplastic Syndromes: 2021 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *American Journal of Hematology* (2020) doi:10.1002/ajh.25950.
90. Fenaux, P. *et al.* Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* **382**, 140–151 (2020).
91. Papaemmanuil, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* (2013) doi:10.1182/blood-2013-08-518886.

92. Moyo, V., Lefebvre, P., Duh, M. S., Yektashenas, B. & Mundle, S. Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Annals of hematology* **87**, 527–36 (2008).
93. Jädersten, M., Montgomery, S. M., Dybedal, I., Porwit-MacDonald, A. & Hellström-Lindberg, E. Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood* (2005) doi:10.1182/blood-2004-10-3872.
94. Park, S. *et al.* Outcome of lower-risk patients with myelodysplastic syndromes without 5q deletion after failure of erythropoiesis-stimulating agents. *Journal of Clinical Oncology* (2017) doi:10.1200/JCO.2016.71.3271.
95. Buckstein, R. *et al.* ITACA: A new validated international erythropoietic stimulating agent-response score that further refines the predictive power of previous scoring systems. *American Journal of Hematology* (2017) doi:10.1002/ajh.24842.
96. Hellström-Lindberg, E. *et al.* A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: Significant effects on quality of life. *British Journal of Haematology* (2003) doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04153.x.
97. Fenaux, P. *et al.* A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood* (2011) doi:10.1182/blood-2011-01-330126.
98. Mossner, M. *et al.* Prevalence, clonal dynamics and clinical impact of TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome with isolated deletion (5q) treated with lenalidomide: Results from a prospective multicenter study of the German MDS study group (GMDS). *Leukemia* (2016) doi:10.1038/leu.2016.111.
99. Sallman, D. A. *et al.* Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* (2016) doi:10.1038/leu.2015.304.
100. Stahl, M. *et al.* The use of immunosuppressive therapy in MDS: clinical outcomes and their predictors in a large international patient cohort. *Blood Advances* (2018) doi:10.1182/bloodadvances.2018019414.
101. Kantarjian, H. M. *et al.* Long-term follow-up for up to 5 years on the risk of leukaemic progression in thrombocytopenic patients with lower-risk myelodysplastic syndromes treated with romiplostim or placebo in a randomised double-blind trial. *The Lancet. Haematology* **5**, e117–e126 (2018).

102. Platzbecker, U. *et al.* Relationship of different platelet response criteria and patient outcomes in a romiplostim myelodysplastic syndromes trial. *Leukemia* **28**, 2418–21 (2014).
103. Oliva, E. N. *et al.* Eltrombopag versus placebo for low-risk myelodysplastic syndromes with thrombocytopenia (EQoL-MDS): phase 1 results of a single-blind, randomised, controlled, phase 2 superiority trial. *The Lancet. Haematology* **4**, e127–e136 (2017).
104. Fenaux, P. *et al.* Challenges of phase III trial design for novel treatments in diseases with no standard treatment: the AZA-001 myelodysplasia study model. *Leuk Res* **38**, 258–262 (2014).
105. Itzykson, R. *et al.* Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* **117**, 403–11 (2011).
106. Damaj, G. *et al.* Impact of azacitidine before allogeneic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndromes: A study by the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myélodysplasies. *Journal of Clinical Oncology* (2012) doi:10.1200/JCO.2012.44.3499.
107. Sekeres, M. A. *et al.* Randomized phase II study of azacitidine alone or in combination with lenalidomide or with vorinostat in higher-risk myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: north American intergroup study swog s1117. in *Journal of Clinical Oncology* (2017). doi:10.1200/JCO.2015.66.2510.
108. DiNardo, C. D. *et al.* Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies. *American Journal of Hematology* (2018) doi:10.1002/ajh.25000.
109. DiNardo, C. D. *et al.* Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* (2019) doi:10.1182/blood-2018-08-868752.
110. Swords, R. T. *et al.* Expanded safety analysis of pevonedistat, a first-in-class NEDD8-activating enzyme inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood Cancer Journal* (2017) doi:10.1038/bcj.2017.1.
111. Stein, E. M. *et al.* Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* (2017) doi:10.1182/blood-2017-04-779405.

112. Brunetti, C., Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G. & Albano, F. CPX-351 in acute myeloid leukemia: can a new formulation maximize the efficacy of old compounds? *Expert Review of Hematology* (2017) doi:10.1080/17474086.2017.1369400.
113. Wattel, E. *et al.* A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Français des Myélodysplasies and European CMML Group. *Blood* (1996).
114. Alfonso, A. *et al.* Natural history of chronic myelomonocytic leukemia treated with hypomethylating agents. *American Journal of Hematology* **92**, 599–606 (2017).
115. Silverman, L. R. *et al.* Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: A study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology* (2002) doi:10.1200/JCO.2002.04.117.
116. Costa, R. *et al.* Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* (2011) doi:10.1002/cncr.25759.
117. Wijermans, P. W. *et al.* Efficacy of decitabine in the treatment of patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia Research* (2008) doi:10.1016/j.leukres.2007.08.004.
118. De Witte, T. *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: Recommendations from an international expert panel. *Blood* (2017) doi:10.1182/blood-2016-06-724500.
119. Robin, M. & Fenaux, P. Hypomethylating Agents as Bridging Therapy before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia? *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2016) doi:10.1016/j.bbmt.2015.11.004.
120. Jaiswal, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine* **371**, 2488–98 (2014).
121. Lindsley, R. C. *et al.* Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *The New England journal of medicine* **376**, 536–547 (2017).
122. Biermer, A. Ein Fall von Leukämie. *Arch Pathol Anatomy* **20**, 552–554 (1861).
123. Churpek, J. E. *et al.* Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood* (2015) doi:10.1182/blood-2015-04-641100.
124. Wlodarski, M. W. *et al.* Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood* (2016) doi:10.1182/blood-2015-09-669937.

125. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
126. Frohling, S. *et al.* Acute Myeloid Leukemia with Deletion 9q Is Associated with CEBPA Loss-of-Function Mutations. *Blood* (2004) doi:10.1182/blood.v104.11.2896.2896.
127. Tawana, K. *et al.* Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood* (2015) doi:10.1182/blood-2015-05-647172.
128. Zhang, Z. *et al.* The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature Immunology* (2011) doi:10.1038/ni.2091.
129. Polprasert, C. *et al.* Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell* (2015) doi:10.1016/j.ccell.2015.03.017.
130. Lewinsohn, M. *et al.* Novel germ line DDX41 mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood* (2016) doi:10.1182/blood-2015-10-676098.
131. Kadono, M. *et al.* Biological implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology* (2016) doi:10.1016/j.exphem.2016.04.017.
132. Quesada, A. E. *et al.* DDX41 mutations in myeloid neoplasms are associated with male gender, TP53 mutations and high-risk disease. *American Journal of Hematology* (2019) doi:10.1002/ajh.25486.
133. Polprasert, C. *et al.* Novel DDX41 variants in Thai patients with myeloid neoplasms. *International Journal of Hematology* (2020) doi:10.1007/s12185-019-02770-3.
134. Gaidzik, V. I. *et al.* RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia* (2016) doi:10.1038/leu.2016.126.
135. Song, W. J. *et al.* Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature Genetics* (1999) doi:10.1038/13793.
136. Preudhomme, C. *et al.* High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* (2009) doi:10.1182/blood-2008-07-168260.

137. Brown, A. L. *et al.* RUNX1-mutated families show phenotype heterogeneity and a somatic mutation profile unique to germline predisposed AML. *Blood Advances* (2020) doi:10.1182/bloodadvances.2019000901.
138. Zhang, M. Y. *et al.* Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nature Genetics* (2015) doi:10.1038/ng.3177.
139. Noris, P. *et al.* ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood* (2013) doi:10.1182/blood-2013-04-499319.
140. Pasquet, M. *et al.* High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* (2013) doi:10.1182/blood-2012-08-447367.
141. Narumi, S. *et al.* SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nature Genetics* (2016) doi:10.1038/ng.3569.
142. Tesi, B. *et al.* Gain-of-function SAMD9L mutations cause a syndrome of cytopenia, immunodeficiency, MDS, and neurological symptoms. *Blood* (2017) doi:10.1182/blood-2016-10-743302.
143. Pastor, V. B. *et al.* Constitutional SAMD9L mutations cause familial myelodysplastic syndrome and transient monosomy 7. *Haematologica* (2018) doi:10.3324/haematol.2017.180778.
144. Schwartz, J. R. *et al.* Germline SAMD9 mutation in siblings with monosomy 7 and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* (2017) doi:10.1038/leu.2017.142.
145. Nagata, Y. *et al.* Germline loss-of-function SAMD9 and SAMD9L alterations in adult myelodysplastic syndromes. *Blood* (2018) doi:10.1182/blood-2017-05-787390.
146. Sivan, G., Ormanoglu, P. R., Buehler, E. C., Martin, S. E. & Moss, B. Identification of restriction factors by human genome-wide RNA interference screening of viral host range mutants exemplified by discovery of SAMD9 and WDR6 as inhibitors of the vaccinia virus k1L-C7L- mutant. *mBio* (2015) doi:10.1128/mBio.01122-15.
147. Mekhedov, S. L., Makarova, K. S. & Koonin, E. V. The complex domain architecture of SAMD9 family proteins, predicted STAND-like NTPases, suggests new links to inflammation and apoptosis. *Biology Direct* (2017) doi:10.1186/s13062-017-0185-2.

148. Wong, J. C. *et al.* Functional evidence implicating chromosome 7q22 haploinsufficiency in myelodysplastic syndrome pathogenesis. *eLife* (2015) doi:10.7554/elife.07839.
149. Buonocore, F. *et al.* Somatic mutations and progressive monosomy modify SAMD9-related phenotypes in humans. *Journal of Clinical Investigation* (2017) doi:10.1172/JCI91913.
150. Wong, J. C. *et al.* Germline SAMD9 and SAMD9L mutations are associated with extensive genetic evolution and diverse hematologic outcomes. *JCI insight* (2018) doi:10.1172/jci.insight.121086.
151. Mai, P. L. *et al.* Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer* (2016) doi:10.1002/cncr.30248.
152. Swaminathan, M. *et al.* Hematologic malignancies and Li-Fraumeni syndrome. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies* (2019) doi:10.1101/mcs.a003210.
153. Alter, B. P. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* (2014) doi:10.1016/j.beha.2014.10.002.
154. Giampietro, P. F., Verlander, P. C., Davis, J. G. & Auerbach, A. D. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. *American journal of medical genetics* **68**, 58–61 (1997).
155. Wagner, J. E. *et al.* Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood* **103**, 3226–9 (2004).
156. Sasaki, M. S. & Tonomura, A. A High Susceptibility of Fanconi's Anemia to Chromosome Breakage by DNA Cross-linking Agents. *Cancer Research* (1973).
157. Ebens, C. L., MacMillan, M. L. & Wagner, J. E. Hematopoietic cell transplantation in Fanconi anemia: current evidence, challenges and recommendations. *Expert Review of Hematology* (2017) doi:10.1080/17474086.2016.1268048.
158. Diamond LK, Blackfan, K. Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child* 464–467 (1938).
159. Vlachos, A., Rosenberg, P. S., Atsidaftos, E., Alter, B. P. & Lipton, J. M. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: A report from the Diamond Blackfan anemia registry. *Blood* (2012) doi:10.1182/blood-2011-08-375972.
160. Draptchinskaia, N. *et al.* The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature Genetics* (1999) doi:10.1038/5951.

161. Sankaran, V. G. *et al.* Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *Journal of Clinical Investigation* (2012) doi:10.1172/JCI63597.
162. Yang, Z. *et al.* Delayed globin synthesis leads to excess heme and the macrocytic anemia of Diamond Blackfan anemia and del(5q) myelodysplastic syndrome. *Science Translational Medicine* (2016) doi:10.1126/scitranslmed.aaf3006.
163. Ludwig, L. S. *et al.* Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nature Medicine* (2014) doi:10.1038/nm.3557.
164. Krönke, J. *et al.* Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 $\alpha$  in del(5q) MDS. *Nature* **523**, 183–188 (2015).
165. Savage, S. A. Beginning at the ends: telomeres and human disease. *F1000Research* (2018) doi:10.12688/f1000research.14068.1.
166. Alter, B. P. *et al.* Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *British Journal of Haematology* (2010) doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08212.x.
167. Armanios, M. Syndromes of Telomere Shortening. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (2009) doi:10.1146/annurev-genom-082908-150046.
168. Bertuch, A. A. The molecular genetics of the telomere biology disorders. *RNA Biology* (2016) doi:10.1080/15476286.2015.1094596.
169. Shwachman, H., Diamond, L. K., Oski, F. A. & Khaw, K. T. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *The Journal of Pediatrics* (1964) doi:10.1016/S0022-3476(64)80150-5.
170. Myers, K. C. *et al.* Variable clinical presentation of Shwachman-Diamond syndrome: update from the North American Shwachman-Diamond Syndrome Registry. *The Journal of pediatrics* **164**, 866–70 (2014).
171. Donadieu, J. *et al.* Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica* (2012) doi:10.3324/haematol.2011.057489.
172. Boocock, G. R. B. *et al.* Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nature Genetics* (2003) doi:10.1038/ng1062.
173. Tummala, H. *et al.* DNAJC21 Mutations Link a Cancer-Prone Bone Marrow Failure Syndrome to Corruption in 60S Ribosome Subunit Maturation. *American Journal of Human Genetics* (2016) doi:10.1016/j.ajhg.2016.05.002.

174. Carapito, R. *et al.* Mutations in signal recognition particle SRP54 cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond-like features. *Journal of Clinical Investigation* (2017) doi:10.1172/JCI92876.
175. Stepensky, P. *et al.* Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. *Journal of Medical Genetics* (2017) doi:10.1136/jmedgenet-2016-104366.
176. Ward, A. F., Braun, B. S. & Shannon, K. M. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood* (2012) doi:10.1182/blood-2012-05-378596.
177. Flotho, C. *et al.* Genotype-phenotype correlation in cases of juvenile myelomonocytic leukemia with clonal RAS mutations [5]. *Blood* (2008) doi:10.1182/blood-2007-09-111831.
178. Stiller, C. A., Chessells, J. M. & Fitchett, M. Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. *Br J Cancer* **70**, 969–972 (1994).
179. Shannon, K. M. *et al.* Loss of The Normal NF1 Allele from the Bone Marrow of Children with Type 1 Neurofibromatosis and Malignant Myeloid Disorders. *New England Journal of Medicine* (1994) doi:10.1056/nejm199403033300903.
180. Niemeyer, C. M. *et al.* Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic Leukemia. *Nature Genetics* (2010) doi:10.1038/ng.641.
181. Niemeyer, C. M. JMML genomics and decisions. *Hematology (United States)* (2018) doi:10.1182/asheducation-2018.1.307.
182. Strullu, M. *et al.* Juvenile myelomonocytic leukaemia and Noonan syndrome. *Journal of Medical Genetics* (2014) doi:10.1136/jmedgenet-2014-102611.
183. Cavé, H. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in the context of RASopathies. *European Journal of Medical Genetics* (2016) doi:10.1016/j.ejmg.2016.01.003.
184. Cavé, H. *et al.* Mutations in RIT1 cause Noonan syndrome with possible juvenile myelomonocytic leukemia but are not involved in acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Human Genetics* (2016) doi:10.1038/ejhg.2015.273.
185. Flex, E. *et al.* Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. *Human Molecular Genetics* (2014) doi:10.1093/hmg/ddu148.

186. Mangaonkar, A. A. & Patnaik, M. M. Hereditary Predisposition to Hematopoietic Neoplasms: When Bloodline Matters for Blood Cancers. *Mayo Clinic Proceedings* (2020) doi:10.1016/j.mayocp.2019.12.013.
187. Baliakas, P. *et al.* Nordic Guidelines for Germline Predisposition to Myeloid Neoplasms in Adults: Recommendations for Genetic Diagnosis, Clinical Management and Follow-up. *Hemasphere* **3**, e321 (2019).
188. Godley, L. A. & Shimamura, A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance. *Blood* **130**, 424–432 (2017).
189. Balmaña, J. *et al.* Conflicting interpretation of genetic variants and cancer risk by commercial laboratories as assessed by the prospective registry of multiplex testing. *Journal of Clinical Oncology* (2016) doi:10.1200/JCO.2016.68.4316.
190. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Research* (2016) doi:10.1093/nar/gkv1222.
191. Kennedy, A. L. & Shimamura, A. Genetic predisposition to MDS: clinical features and clonal evolution. *Blood* **133**, 1071–1085 (2019).
192. Inaba, T., Honda, H. & Matsui, H. The enigma of monosomy 7. *Blood* **131**, 2891–2898 (2018).
193. Maserati, E. *et al.* Shwachman syndrome as mutator phenotype responsible for myeloid dysplasia/neoplasia through karyotype instability and chromosomes 7 and 20 anomalies. *Genes, chromosomes & cancer* **45**, 375–82 (2006).
194. Cioc, A. M., Wagner, J. E., MacMillan, M. L., DeFor, T. & Hirsch, B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: Morphologic and cytogenetic characteristics. *American Journal of Clinical Pathology* (2010) doi:10.1309/AJCP7W9VMJENZOVG.
195. Villani, A. *et al.* Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: 11 year follow-up of a prospective observational study. *The Lancet Oncology* (2016) doi:10.1016/S1470-2045(16)30249-2.
196. Germeshausen, M., Ballmaier, M. & Welte, K. Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: Results of a long-term survey. *Blood* (2007) doi:10.1182/blood-2006-02-004275.
197. Churpek, J. E. *et al.* Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood* (2015) doi:10.1182/blood-2015-04-641100.

198. Wiseman, D. H. Donor cell leukemia: a review. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**, 771–789 (2011).
199. Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R. & Vakhlu, J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology* (2016) doi:10.1007/s12088-016-0606-4.
200. Check Hayden, E. Is the \$1,000 genome for real? *Nature* (2014) doi:10.1038/nature.2014.14530.
201. Muhammad, I. I., Munusamy, U., Kong, S. L. & Abdullah, S. N. A. RNA-seq and CHIP-seq as complementary approaches for comprehension of plant transcriptional regulatory mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* (2020) doi:10.3390/ijms21010167.
202. Andrews, S. FastQC. *Babraham Bioinformatics* (2010) doi:citeulike-article-id:11583827.
203. Wingett, S. FastQ Screen. *Babraham Bioinformatics* (2017).
204. Gordon, A., Hannon, G. J. & Gordon. FASTX-Toolkit. [Online] [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit) [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit) (2014).
205. Patel, R. K. & Jain, M. NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0030619.
206. Schmieder, R. & Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* (2011) doi:10.1093/bioinformatics/btr026.
207. Zhou, Q., Su, X., Wang, A., Xu, J. & Ning, K. QC-Chain: Fast and Holistic Quality Control Method for Next-Generation Sequencing Data. *PLoS ONE* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0060234.
208. Guo, Y. *et al.* Multi-perspective quality control of Illumina exome sequencing data using QC3. *Genomics* (2014) doi:10.1016/j.ygeno.2014.03.006.
209. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* (2011) doi:10.14806/ej.17.1.200.
210. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (2014) doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
211. Wu, T. D. & Nacu, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* (2010) doi:10.1093/bioinformatics/btq057.
212. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (2009) doi:10.1093/bioinformatics/btp352.

213. Zhou, W. *et al.* Bias from removing read duplication in ultra-deep sequencing experiments. *Bioinformatics* (2014) doi:10.1093/bioinformatics/btt771.
214. Homer, N. & Nelson, S. F. Improved variant discovery through local re-alignment of short-read next-generation sequencing data using SRMA. *Genome Biology* (2010) doi:10.1186/gb-2010-11-10-r99.
215. Wu, T. D. & Watanabe, C. K. GMAP: A genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics* (2005) doi:10.1093/bioinformatics/bti310.
216. McKenna, A. *et al.* The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* (2010) doi:10.1101/gr.107524.110.
217. Cai, L., Yuan, W., Zhang, Z., He, L. & Chou, K. C. In-depth comparison of somatic point mutation callers based on different tumor next-generation sequencing depth data. *Scientific Reports* (2016) doi:10.1038/srep36540.
218. Lai, Z. *et al.* VarDict: A novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Research* (2016) doi:10.1093/nar/gkw227.
219. Park, S., Koh, Y. & Yoon, S.-S. Effects of Somatic Mutations Are Associated with SNP in the Progression of Individual Acute Myeloid Leukemia Patient: The Two-Hit Theory Explains Inherited Predisposition to Pathogenesis. *Genomics & Informatics* (2013) doi:10.5808/gi.2013.11.1.34.
220. Bohnert, R., Vivas, S. & Jansen, G. Comprehensive benchmarking of SNV callers for highly admixed tumor data. *PLoS ONE* (2017) doi:10.1371/journal.pone.0186175.
221. Andrews, T. D., Jeelall, Y., Talaulikar, D., Goodnow, C. C. & Field, M. A. DeepSNVMiner: A sequence analysis tool to detect emergent, rare mutations in subsets of cell populations. *PeerJ* (2016) doi:10.7717/peerj.2074.
222. Xu, C. *et al.* Smcounter2: An accurate low-frequency variant caller for targeted sequencing data with unique molecular identifiers. *Bioinformatics* (2019) doi:10.1093/bioinformatics/bty790.
223. Boyle, A. P. *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research* (2012) doi:10.1101/gr.137323.112.
224. Ward, L. D. & Kellis, M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research* (2012) doi:10.1093/nar/gkr917.

225. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research* (2010) doi:10.1093/nar/gkq603.
226. Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: Mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Research* (2011) doi:10.1093/nar/gkq929.
227. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research* (2014) doi:10.1093/nar/gkt1113.
228. Kircher, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics* (2014) doi:10.1038/ng.2892.
229. Ioannidis, N. M. *et al.* REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet* **99**, 877–885 (2016).
230. Tian, Y. *et al.* REVEL and BayesDel outperform other in silico meta-predictors for clinical variant classification. *Sci Rep* **9**, 12752 (2019).
231. Li, H. & Wren, J. Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics* (2014) doi:10.1093/bioinformatics/btu356.
232. Li, B. *et al.* A Likelihood-Based Framework for Variant Calling and De Novo Mutation Detection in Families. *PLoS Genetics* (2012) doi:10.1371/journal.pgen.1002944.
233. Kamphans, T. *et al.* Filtering for Compound Heterozygous Sequence Variants in Non-Consanguineous Pedigrees. *PLoS ONE* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0070151.
234. Yamamoto, H. & Imai, K. Microsatellite instability: an update. *Archives of Toxicology* (2015) doi:10.1007/s00204-015-1474-0.
235. Kunkel, T. A. & Erie, D. A. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* (2005) doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243.
236. Chang, D. K., Metzgar, D., Wills, C. & Boland, C. R. Microsatellites in the eukaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. *Genome Research* (2001) doi:10.1101/gr.186301.
237. Arana, M. E. & Kunkel, T. A. Mutator phenotypes due to DNA replication infidelity. *Seminars in Cancer Biology* (2010) doi:10.1016/j.semcancer.2010.10.003.
238. Bebenek, K. & Kunkel, T. A. Functions of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry* (2004) doi:10.1016/S0065-3233(04)69005-X.
239. Li, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* (2008) doi:10.1038/cr.2007.115.

240. Genschel, J., Littman, S. J., Drummond, J. T. & Modrich, P. Isolation of MutS $\beta$  from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS $\beta$  and MutS $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* (1998) doi:10.1074/jbc.273.31.19895.
241. Hsieh, P. & Zhang, Y. The Devil is in the details for DNA mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3552–3554 (2017).
242. Eshleman, J. R. & Markowitz, S. D. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Human Molecular Genetics* (2017) doi:10.1093/hmg/5.supplement\_1.1489.
243. Li, F. *et al.* The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS $\alpha$ . *Cell* **153**, 590–600 (2013).
244. Silberman, R. *et al.* Complete and Prolonged Response to Immune Checkpoint Blockade in *POLE* -Mutated Colorectal Cancer. *JCO Precision Oncology* 1–5 (2019) doi:10.1200/PO.18.00214.
245. Tutlewska, K., Lubinski, J. & Kurzawski, G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. *Hered Cancer Clin Pract* **11**, 9 (2013).
246. Kolodner, R. D. *et al.* Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Research* (1999).
247. Ligtenberg, M. J. L. *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature Genetics* (2009) doi:10.1038/ng.283.
248. Adam, R. *et al.* Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *American Journal of Human Genetics* (2016) doi:10.1016/j.ajhg.2016.06.015.
249. Salovaara, R. *et al.* Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* (2000) doi:10.1200/JCO.2000.18.11.2193.
250. Stoffel, E. *et al.* Calculation of Risk of Colorectal and Endometrial Cancer Among Patients With Lynch Syndrome. *Gastroenterology* (2009) doi:10.1053/j.gastro.2009.07.039.
251. Hampel, H. *et al.* Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *New England Journal of Medicine* (2005) doi:10.1056/nejmoa043146.

252. Herman, J. G. *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2002) doi:10.1073/pnas.95.12.6870.
253. Nicolaides, N. C. *et al.* Mutations of two P/WS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* (1994) doi:10.1038/371075a0.
254. Palomaki, G. E., McClain, M. R., Melillo, S., Hampel, H. L. & Thibodeau, S. N. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genetics in Medicine* (2009) doi:10.1097/GIM.0b013e31818fa2db.
255. Kunitomi, H. *et al.* New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer (Review). *Oncology Letters* (2017) doi:10.3892/ol.2017.6640.
256. Hyung, M. S. *et al.* Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *Journal of Surgical Oncology* (2009) doi:10.1002/jso.21220.
257. Kuismanen, S. A. *et al.* Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability. *American Journal of Pathology* (2002) doi:10.1016/S0002-9440(10)61144-3.
258. Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 5248–5257 (1998).
259. Le, D. T. *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409–413 (2017).
260. Scarisbrick, J. J. *et al.* Microsatellite instability is associated with hypermethylation of the hMLH1 gene and reduced gene expression in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* **121**, 894–901 (2003).
261. Murphy, K. M. *et al.* Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn* **8**, 305–311 (2006).
262. Suraweera, N. *et al.* Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804–1811 (2002).

263. Zhang, L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn* **10**, 301–307 (2008).
264. Evrard, C., Tachon, G., Randrian, V., Karayan-Tapon, L. & Tougeron, D. Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **11**, E1567 (2019).
265. Dietz, A. C., DeFor, T. E., Brunstein, C. G. & Wagner, J. E. Donor-derived myelodysplastic syndrome and acute leukaemia after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: incidence, natural history and treatment response. *Br J Haematol* **166**, 209–212 (2014).
266. Wang, E. *et al.* Donor cell-derived leukemias/myelodysplastic neoplasms in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a clinicopathologic study of 10 cases and a comprehensive review of the literature. *Am J Clin Pathol* **135**, 525–540 (2011).
267. Fogarty, P. F. *et al.* Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet* **362**, 1628–1630 (2003).
268. Ayas, M. *et al.* Reduced intensity conditioning is effective for hematopoietic SCT in dyskeratosis congenita-related BM failure. *Bone Marrow Transplant* **48**, 1168–1172 (2013).
269. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
270. Richards, S. *et al.* 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* **17**, 405–424 (2015).
271. Ghemlas, I. *et al.* Improving diagnostic precision, care and syndrome definitions using comprehensive next-generation sequencing for the inherited bone marrow failure syndromes. *J Med Genet* **52**, 575–584 (2015).
272. Churpek, J. E. *et al.* Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood* **126**, 2484–2490 (2015).

273. Guidugli, L. *et al.* Clinical utility of gene panel-based testing for hereditary myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. *Leukemia* **31**, 1226–1229 (2017).
274. Keel, S. B. *et al.* Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients. *Haematologica* **101**, 1343–1350 (2016).
275. Bluteau, O. *et al.* A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood* **131**, 717–732 (2018).
276. Rio-Machin, A. *et al.* The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. *Nat Commun* **11**, 1044 (2020).
277. Li, S. T. *et al.* Rare germline variant contributions to myeloid malignancy susceptibility. *Leukemia* **34**, 1675–1678 (2020).
278. Rahman, N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature* **505**, 302–308 (2014).
279. Rahman, N. & Scott, R. H. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. *Hum Mol Genet* **16 Spec No 1**, R60-66 (2007).
280. Scott, R. H., Stiller, C. A., Walker, L. & Rahman, N. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. *J Med Genet* **43**, 705–715 (2006).
281. Bernard, E. *et al.* Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med* **26**, 1549–1556 (2020).
282. Liu, S. *et al.* Functional consequence of the MET-T1010I polymorphism in breast cancer. *Oncotarget* **6**, 2604–2614 (2015).
283. Bowman-Colin, C. *et al.* Palb2 synergizes with Trp53 to suppress mammary tumor formation in a model of inherited breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8632–8637 (2013).
284. Hinds, D. A. *et al.* Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood* **128**, 1121–1128 (2016).
285. Elbracht, M. *et al.* Germline variants in DNA repair genes, including BRCA1/2, may cause familial myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv* **5**, 3373–3376 (2021).
286. Feurstein, S. *et al.* Germline variants drive myelodysplastic syndrome in young adults. *Leukemia* **35**, 2439–2444 (2021).

287. Ducamp, S. & Fleming, M. D. The molecular genetics of sideroblastic anemia. *Blood* **133**, 59–69 (2019).
288. Belmont, J. W. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Hum Genet* **58**, 1101–1108 (1996).
289. Shoolingin-Jordan, P. M. *et al.* 5-Aminolevulinic acid synthase: mechanism, mutations and medicine. *Biochim Biophys Acta* **1647**, 361–366 (2003).
290. Aivado, M. *et al.* X-linked sideroblastic anemia associated with a novel ALAS2 mutation and unfortunate skewed X-chromosome inactivation patterns. *Blood Cells Mol Dis* **37**, 40–45 (2006).
291. Aivado, M., Gattermann, N. & Bottomley, S. X chromosome inactivation ratios in female carriers of X-linked sideroblastic anemia. *Blood* **97**, 4000–4002 (2001).
292. Patnaik, M. M. & Tefferi, A. Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) and RARS with thrombocytosis: ‘2019 Update on Diagnosis, Risk-stratification, and Management’. *Am J Hematol* **94**, 475–488 (2019).
293. Camaschella, C. *et al.* The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* **110**, 1353–1358 (2007).
294. Liu, G. *et al.* Heterozygous missense mutations in the GLRX5 gene cause sideroblastic anemia in a Chinese patient. *Blood* **124**, 2750–2751 (2014).
295. Abu-Zeinah, G. & DeSancho, M. T. Understanding Sideroblastic Anemia: An Overview of Genetics, Epidemiology, Pathophysiology and Current Therapeutic Options. *J Blood Med* **11**, 305–318 (2020).
296. Tummala, H. *et al.* Genome instability is a consequence of transcription deficiency in patients with bone marrow failure harboring biallelic ERCC6L2 variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 7777–7782 (2018).
297. Shabanova, I. *et al.* ERCC6L2-associated inherited bone marrow failure syndrome. *Mol Genet Genomic Med* **6**, 463–468 (2018).
298. Järviaho, T. *et al.* Bone marrow failure syndrome caused by homozygous frameshift mutation in the ERCC6L2 gene. *Clin Genet* **93**, 392–395 (2018).
299. Douglas, S. P. M. *et al.* ERCC6L2 defines a novel entity within inherited acute myeloid leukemia. *Blood* **133**, 2724–2728 (2019).
300. Hause, R. J., Pritchard, C. C., Shendure, J. & Salipante, S. J. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* **22**, 1342–1350 (2016).

301. de la Chapelle, A. & Hampel, H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol* **28**, 3380–3387 (2010).
302. McMeekin, D. S. *et al.* Clinicopathologic Significance of Mismatch Repair Defects in Endometrial Cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **34**, 3062–3068 (2016).
303. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* **372**, 2509–2520 (2015).
304. Bacher, J. W. *et al.* Development of a Fluorescent Multiplex Assay for Detection of MSI-High Tumors. *Disease Markers* (2013) doi:10.1155/2004/136734.
305. Xicola, R. M. *et al.* Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* **99**, 244–252 (2007).
306. Graham, T., Halford, S., Page, K. M. & Tomlinson, I. P. M. Most low-level microsatellite instability in colorectal cancers can be explained without an elevated slippage rate. *J Pathol* **215**, 204–210 (2008).
307. Halford, S. *et al.* Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* **62**, 53–57 (2002).
308. Tomlinson, I., Halford, S., Aaltonen, L., Hawkins, N. & Ward, R. Does MSI-low exist? *J Pathol* **197**, 6–13 (2002).
309. Bapat, B. *et al.* The association of tumor microsatellite instability phenotype with family history of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 967–975 (2009).
310. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546–1558 (2013).
311. Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 2209–2221 (2016).
312. Das-Gupta, E. P., Seedhouse, C. H. & Russell, N. H. Microsatellite instability occurs in defined subsets of patients with acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* **114**, 307–312 (2001).
313. Rimsza, L. M. *et al.* Microsatellite instability is not a defining genetic feature of acute myeloid leukemogenesis in adults: results of a retrospective study of 132 patients and review of the literature. *Leukemia* **14**, 1044–1051 (2000).
314. Nomdedéu, J. F. *et al.* Microsatellite instability is not an uncommon finding in adult de novo acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* **84**, 368–375 (2005).

315. Tothova, Z. *et al.* Cohesin mutations alter DNA damage repair and chromatin structure and create therapeutic vulnerabilities in MDS/AML. *JCI Insight* **6**, 142149 (2021).
316. Seedhouse, C. H., Das-Gupta, E. P. & Russell, N. H. Methylation of the hMLH1 promoter and its association with microsatellite instability in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **17**, 83–88 (2003).
317. Sheikhha, M. H., Tobal, K. & Liu Yin, J. A. High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* **117**, 359–365 (2002).
318. Zhang, J. *et al.* Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N Engl J Med* **373**, 2336–2346 (2015).
319. Richter-Pechańska, P. *et al.* Identification of a genetically defined ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J* **7**, e523 (2017).
320. Germani, A. *et al.* Beyond BRCA1 and BRCA2: Deleterious Variants in DNA Repair Pathway Genes in Italian Families with Breast/Ovarian and Pancreatic Cancers. *J Clin Med* **9**, E3003 (2020).
321. Yurgelun, M. B. *et al.* Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology* **149**, 604-613.e20 (2015).
322. Kage, H. *et al.* Spontaneous Transformation from EGFR and ALK Wild-Type Lung Adenocarcinoma to Neuroendocrine Carcinoma. *J Thorac Oncol* **13**, e126–e128 (2018).
323. Ohyashiki, J. H. *et al.* Replication errors in hematological neoplasias: genomic instability in progression of disease is different among different types of leukemia. *Clin Cancer Res* **2**, 1583–1589 (1996).
324. Kaneko, H., Horiike, S., Taniwaki, M. & Misawa, S. Microsatellite instability is an early genetic event in myelodysplastic syndrome but is infrequent and not associated with TGF-beta receptor type II gene mutation. *Leukemia* **10**, 1696–1699 (1996).
325. Walker, C. J. *et al.* No evidence for microsatellite instability in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **31**, 1474–1476 (2017).
326. Casorelli, I., Bossa, C. & Bignami, M. DNA damage and repair in human cancer: molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *Int J Environ Res Public Health* **9**, 2636–2657 (2012).

327. Offman, J. *et al.* Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood* **104**, 822–828 (2004).
328. Maletzki, C., Stier, S. & Linnebacher, M. Microsatellite instability in hematological malignancies: Hypermutation vs. immune control-who is challenging who? *Oncoimmunology* **2**, e25419 (2013).
329. Buckowitz, A. *et al.* Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer* **92**, 1746–1753 (2005).
330. Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 5248–5257 (1998).
331. Herzog, G. *et al.* Microsatellite instability and p53 mutations are characteristic of subgroups of acute myeloid leukemia but independent events. *Haematologica* **90**, 693–695 (2005).
332. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* **372**, 2509–2520 (2015).
333. Penter, L. *et al.* Molecular and cellular features of CTLA-4 blockade for relapsed myeloid malignancies after transplantation. *Blood* **137**, 3212–3217 (2021).



# **Apéndice I: Producción científica en relación al trabajo de tesis**



### ***Comunicaciones y ponencia a congresos nacionales***

a) **Título:** Predisposición Germinal en Síndromes Mielodisplásicos en Adulto Joven sin Disfunción Orgánica Previa: Nuevo Hallazgo de Variantes Deletéreas en Genes Responsables de la Inestabilidad de Microsatélites

**Autores:** *Chen-Liang TH, Hurtado AM , Zurdo M, Such E, Palomo L, Jimenez-Lorenzo MJ, del Orbe R, Navarro B, López-Cadenas F, Salido E, Benet C, Muiña B, Oña R, de Haro N, Ramos F, Hernandez F, Ortuño FJ, Senent L, Vicente A, Diez-Campelo M, Hermosín L, Bernal T, Tormo M, Arrizabalaga B, Xicoy B, Solé F, Sanz G, Jerez A en representación del GESMD*

**Congreso:** LXI CONGRESO NACIONAL DE LA SEHH Y XXXV CONGRESO NACIONAL DE LA SETH. Valencia, 2019

b) **Título:** "Síndromes Mielodisplásicos en Adulto Joven sin Disfunción Orgánica Previa: Predominio de Variantes en Genes de Reparación de ADN e Impacto Clínico"

**Autores:** *Chen-Lian TH, Hurtado AM , Zurdo M, Such E, Palomo L, Jimenez-Lorenzo MJ, del Orbe R, Navarro B, López-Cadenas F, Salido E, Benet C, Muiña B, Oña R, de Haro N , Ramos F, Hernandez F, Ortuño FJ, Senent L, Vicente A, Diez-Campelo M, Hermosín L, Bernal T, Tormo M, Arrizabalaga B, Xicoy B, Solé F, Sanz G, Jerez A en representación del GESMD.*

**Congreso:** LXII CONGRESO NACIONAL DE LA SEHH Y XXXVI CONGRESO NACIONAL DE LA SETH. Navarra, 2020.

c) **Título:** "Síndromes Mielodisplásicos en Adulto Joven sin Disfunción Orgánica Previa: Predominio de Variantes en Genes de Reparación de ADN e Impacto Clínico"

**Autores:** *TH Chen-Liang, M Santiago, L Palomo, MJ Jiménez, R del Orbe, M Tormo, F López-Cadenas, L Hermosín, T Bernal, E Salido, C Benet, B Muiña, R Oña, F Ramos, F Hernandez, E Tuset, H Pomares, A Martínez-Francés, T Arquero, A Jerez, I en representación del GESMD.*

**Congreso:** V JORNADAS DE INSTITUTO MURCIANO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA (IMIB), MURCIA, 2020.

d) **Título:** "Perfiles de Co-Ocurrencia de Variantes Germinales y Adquiridas en Síndromes Mielodisplásicos en Adultos Jóvenes sin Disfunción Orgánica Previa"

Autores: *Tzu Hua Chen-Liang, Salvador Carrillo-Tornel, Ana María Hurtado, Bernardo López-Andrade, Ángeles Medina, María Julia Montoro, Paloma García-Martín, Esperanza Tuset, Rafael del Orbe, Lourdes Herмосín, Teresa Bernal, Fernando Ramos, Mar Tormo, Montserrat Arnan, Blanca Xicoy, María Diez-Campelo, Francesc Solé, Francisca Hernandez, Guillermo Sanz, Andrés Jerez en representación del GESMD.*

Congreso: LXIII CONGRESO NACIONAL DE LA SEHH Y EL XXXVII CONGRESO NACIONAL DE LA SETH, PAMPLONA, 2021.

e) Simposio 18: SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Título: “Predisposición genética para el desarrollo de síndromes mielodisplásicos”

Autores: *Andrés Jerez, Tzu Hua Chen-Liang, Salvador Carrillo-Tornel.*

Congreso: LXIII CONGRESO NACIONAL DE LA SEHH Y EL XXXVII CONGRESO NACIONAL DE LA SETH, PAMPLONA, 2021.

*En prensa.*

***Comunicaciones a congresos internacionales***

a) Título: “Germline and Acquired Genetic Features of Myelodysplastic Syndrome in Young Adult without Previously Diagnosed Congenital Syndrome”

Autores: *Tzu Hua Chen-Liang, Ana María Hurtado, Laura Palomo, Teresa Bernal, Mar Tormo, Lourdes Herмосín, María José Jimenez, Blanca Navarro, Esperanza Such, Rafael del Orbe, Nuria de Haro, Félix López-Cadenas, Begoña Muiña, Raquel Oña, Carmen Benet, Eduardo Salido, Raúl Teruel-Montoya, Fernando Ramos, Leonor Senent, María Diez-Campelo, Beatriz Arrizabalaga, Blanca Xicoy, Francisco José Ortuño, Francesc Solé, Guillermo Sanz, Andrés Jerez on Behalf of Spanish Group of MDS.*

Congreso: 60<sup>th</sup> ASH ANNUAL MEETING. SAN DIEGO, 2018

b) Título: Germinal Predisposition in Myelodysplastic Syndromes in Young Adults without a Preexisting Disorders or Organ Dysfunction: Identification of Deleterious Variants in Microsatellite Instability Genes.

Autores: Tzu-Hua Chen-Liang, Ana María Hurtado, María Zurdo, Esperanza Such, Raúl Teruel- Montoya, Laura Palomo, María José Jimenez-Lorenzo, Rafael del Orbe, Blanca Navarro, Félix López-Cadenas, Eduardo Salido, Carmen Benet, Begoña Muiña, Raquel Oña, Nuria de Haro, Fernando Ramos, Francisca, Hernandez, Francisco José Ortuño, Leonor Senent, Ana Vicente, María Diez-Campelo, Lourdes Herмосín, Teresa Bernal, Mar Tormo, Beatriz Arrizabalaga, Blanca Xicoy, José Cervera, Francesc Solé, Guillermo Sanz, Andrés Jerez on Behalf of Spanish Group of MDS.

Congreso: 61<sup>st</sup> ASH ANNUAL MEETING. ORLANDO, 2019.

c) **Título:** Myelodysplastic Syndrome in Young Adult without Previous Organic Dysfunction: Predominance of Germline Variants in Genes of DNA Repair Pathway and their Clinical Impact

Autores: Tzu Hua Chen-Liang, Salvador Carrillo-Tornel, Ana María Hurtado, Marta Santiago, Esperanza Such, Laura Palomo, Miguel Ángel Rodríguez-Gil, María José Jiménez, Rafael del Orbe, Félix López-Cadenas, Mar Tormo, Lourdes Herмосín, Teresa Bernal, Eduardo Salido, Carmen Benet, Begoña Muiña, Raquel Oña, Nuria de Haro, Fernando Ramos, Francisco José Ortuño, Leonor Senent, Esperanza Tuset, Helena Pomares, Antonio Martínez-Francés, Teresa Arquero, Julia Montoro, Raúl Teruel-Montoya, José Cervera, David Valcárcel, Montserrat Arnán, Beatriz Arrizabalaga, María Diez-Campelo, Blanca Xicoy, Francisca Hernández, Francesc Solé, Guillermo Sanz, Andrés Jerez, en representación del GESMD

Congreso: CONGRESS OF EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION, 2021 (Virtual Modality).

d) **Título:** “Germline and Somatic Variants Co-Occurrence Profile in Early Onset Adult Myelodysplastic Syndromes without a Preexisting Disorder”

Autores: Tzu Hua Chen-Liang, Salvador Carrillo-Tornel, Marta Santiago, Bernardo López Andrade, Francisca María Hernández, Paloma García-Martín, Félix López Cadenas, Mar Tormo, María Lourdes Herмосín, Teresa Bernal del Castillo, Esperanza Tuset, Ángeles Medina Pérez, Helena Pomares, Teresa Arquero, María Julia Montoro, Blanca Xicoy, Francesc Solé, Guillermo Sanz, David Valcárcel, María Diez Campelo, Andrés Jerez.

Congreso: 63<sup>rd</sup> ASH ANNUAL MEETING, PHILADELPHIA, 2021.



# **Apéndice II: Financiación del trabajo de tesis**



Proyecto: “Síndromes mielodisplásicos en adultos menores de 50 años: implicaciones clínicas y estudio integral de modelo híbrido congénito-adquirido de malignidad.”

Financiador: Fondos FEDER INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

Expediente: PI16/01302

Período: 2017-2019

1. Proyecto: “Predisposición genética a síndromes mielodisplásicos en adultos jóvenes: identificación de nuevas lesiones crípticas y caracterización funcional de variantes”

Financiador: Fondos FEDER INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

Expediente: PI19/00374

Período: 2020-2022

2. CONTRATOS RÍO HORTEGA. AES 2016

Financiador: Fondos FEDER INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

Periodo: 2017-2018

3. Beca de investigación FEHH

- Período: 2019-2020
- Período: 2021-2022



# **Anexo I: Tablas suplementarias**

**Tabla suplementaria 1.** Herramientas *in silico* utilizadas para determinar el perfil deletéreo de las variantes germinales

<b>HERRAMIENTA</b>	<b>NOMBRE COMPLETO</b>	<b>Dirección de la página web</b>
<b>PolyPhen-2</b>	<i>Polymorphism Phenotyping v2</i>	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
<b>SIFT</b>	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>	<a href="https://sift.bii.a-star.edu.sg/">https://sift.bii.a-star.edu.sg/</a>
<b>PROVEAN</b>	<i>Protein Variation Effect Analyzer</i>	<a href="http://provean.jcvi.org/index.php">http://provean.jcvi.org/index.php</a>
<b>CADD</b>	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>	<a href="http://cadd.gs.washington.edu">http://cadd.gs.washington.edu</a>
<b>VEST3/4</b>	<i>Variant Effect Scoring Tool</i>	<a href="https://karchinlab.org/apps/appVest.html">https://karchinlab.org/apps/appVest.html</a>
<b>FATHMM</b>	<i>Functional Analysis through Hidden Markov Models</i>	<a href="http://fathmm.biocompute.org.uk/index.html">http://fathmm.biocompute.org.uk/index.html</a>
<b>GERP++</b>	<i>Genomic Evolutionary Rate Profiling</i>	<a href="http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/index.html">http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/index.html</a>
<b>CONDEL</b>	<i>CONsensus DELeteriousness score of non-synonymous single nucleotide variants</i>	<a href="https://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdb/help/condel.html">https://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdb/help/condel.html</a>
<b>GAVIN/ CAPICE</b>	<i>Consequence-Agnostic Pathogenicity Interpretation of Clinical Exome variations</i>	<a href="https://capice.molgeniscloud.org/">https://capice.molgeniscloud.org/</a>
<b>Mutation Assessor</b>	---	<a href="http://mutationassessor.org">http://mutationassessor.org</a>
<b>Mutation Taster</b>	---	<a href="http://www.mutationtaster.org">http://www.mutationtaster.org</a>
<b>LoFtool</b>	<i>Loss of Function Tool</i>	VEP plugin: <a href="https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP">https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP</a>
<b>REVEL</b>	<i>Rare Exome Variant Ensembl Leaner</i>	<a href="https://sites.google.com/site/revelgenomics/about">https://sites.google.com/site/revelgenomics/about</a>
<b>MMR-PON</b>	---	<a href="http://structure.bmc.lu.se/PON-MMR2/">http://structure.bmc.lu.se/PON-MMR2/</a>

**Nota:** todas estas herramientas, excepto GAVIN/CAPRICE y PON-MMR2, pueden accederse mediante la herramienta VEP (*variant effect prediction*) de Ensembl.org.

**Tabla suplementaria 2.** Distribución según vía o función de los genes de variantes germinales

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
FANCA	DKC1	GATA2	RPS19	PRF1	TET2	TGFB1	COL5A1	ALAS2	NRAS	ADCY5
FANCB	TERC	GATA1	RPS24	STIM1	KMT2D	STK11	ITGB3	SLC25A38	JAK2	LRP2
FANCC	TERT	RUNX1	RPS17	DDX41	IDH1	TP53	HYDIN	SLC19A2	MET	COL4A1
BRCA2	TINF2	MECOM	RPL5	MYSM1	NCOR2	BCL2L10	VWDE	G6PC3	RAF1	PCLO
FANCD2	NOPI0	ETV6	RPL11	ASXL1	ABL1	GP9	VPS13C	VPS13C	PIEZO1	CLTCL1
FANCE	NHP2	MPO	RPL35A	ATG2B	ABL2	GP1BA	PIEZO1	PIEZO1	LMAA1	U2AF2
FANCF	WRAP53	TAL1	RPS7	IL17RA	SP140L	BCR	ANCRD26	SLC4A1	SETBP1	DNAH11
FANCG	USB1	IKZF5	RPS10	ELANE	HOXB13	RARA	MYH9	HBB	NF1	HMCN1
FANCI	CTC1	MPL	RPS29	RNF213		NEK4	ITGA2B	SEC23B	PTK2	MYOM3
BRIP1	RTEL1	CSF1R	RPS26	LYST		APC	DOCK6	CDANI	PRUNE2	MYO15A
FANCL	ACD	WT1	RPL26	ADA		RBBP6	MASTL		SHOC2	RYR1
FANCM	NAF1	VPS13B	RPL15	RAC2		TBC1D8	AP3B1		SMO	ACAD9
PALB2	PARN	IKZF1	GATA1	IL17RA		PML	GP6		BRAF	FH
RAD51C	POT1		RPL18	HCLS1		SAMD9	NBEAL2		SEMA4F	CLCN7
SLX4	STN1		RPL27	NR2F6		SAMD9L			PKD1L2	SLC38A8
ERCC4	TERF1		RPL31	CTSC		PDCD4			ARAP2	TXNDC11
BRCA1	TERF2		RPL35			BCOR			TAS1R1	ZRSR2
UBE2T			RPS27			CEBPA			PRAG1	ECHDC2
XRCC2			RPS28			TCHP			AMER2	GLG1
MAD2L2			TSR2			CASP10			FRAS1	APOB
ERCC6L2			RPS20			ADA2			RGS7	CDH1
LIG4			SBDS			NPAT			SOS1	CAPN12
BLM			DNAJC21			CLPB			AMER1	KIAA0556
MSH2			/HSP40			CACNA1G			HRAS	(KATNIP)
MLH1			EFL1						ST14	TCIRG1
EPCAM			GARI						KRAS	DNAH9
MSH6			DHX34						DNAJB1	SLC46A1
PMS2			NPM1						CBL	UTP20
ATR			SRP68							DGCR2
ATM										CILP2
MSH3										WDR46
PMS1										SRSF1
MBD4										HKDC1
SLC19A1										CCDC33
PCNA										PMEPA1
EXO1										TSPAN3
RPA4										PPP1R3A
POLB										CPEB2
POLD1										ATP10B
PMS2P3										NMUR2
RFC1										TCN2
HELQ										TNRC6C
BARD1										EML6
MUTYH										HNRNPA3
RAD50										SLC37A4
TONSL										PXDN
RECQL4										CACNA2D4
CI5orf41										TRERF1
CHEK2										NOVA2
RECQ4										PRR23B
NBN										TPI1
WRN										CALR
POLE										TNC
										SEC24B

**Abreviaturas:** G1, relacionada con la respuesta al daño del ADN; G2, relacionada con la función y/o mantenimiento de los telómeros; G3, factores de transcripción/hematopoyesis; G4, relacionado con el ensamblaje y funcionamiento de los ribosomas; G5, respuesta inmune; G6, modificadores de la cromatina, G7, proliferación, apoptosis y ciclo celular; G8, función plaquetaria y relacionado con la trombosis; G9, biosíntesis eritroide; G10, señales de activación; G11, otras.

**Tabla suplementaria 3.** Distribución según vía o función de los genes de variantes somáticas

<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>
<i>TET2</i>	<i>STAG2</i>	<i>SF3B1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TP53</i>	<i>JAK2</i>	<i>BRCC3</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CTCF</i>	<i>SRSF2</i>	<i>CUX1</i>	<i>PPM1D</i>	<i>NF1</i>	<i>ATM</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>SMC3</i>	<i>U2AF1</i>	<i>ETV6</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>NRAS</i>	<i>FANCL</i>
<i>EZH2</i>	<i>SMC1A</i>	<i>U2AF2</i>	<i>NPM1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>KRAS</i>	<i>ATR</i>
<i>BCOR</i>	<i>RAD21</i>	<i>ZRSR2</i>	<i>GATA2</i>	<i>CARD11</i>	<i>CBL</i>	<i>SLC19A1</i>
<i>IDH2</i>	<i>PDS5B</i>	<i>LUC7L2</i>	<i>WT1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>MPL</i>	<i>PMS2</i>
<i>IDH1</i>	<i>NIPBL</i>	<i>PRPF8</i>	<i>CEBPA</i>		<i>FLT3</i>	
<i>BCORL1</i>	<i>ESCO2</i>	<i>SF1</i>	<i>IRF1</i>		<i>GNAS</i>	
<i>ATRX</i>	<i>STAG1</i>		<i>NCOR2</i>		<i>KIT</i>	
<i>SUZ12</i>			<i>CREBBP</i>		<i>PTPN11</i>	
<i>EED</i>					<i>GNB1</i>	
<i>JARID2</i>					<i>PTEN</i>	
<i>KMT2</i>					<i>FBWX7</i>	
<i>KDM6A</i>					<i>CALR</i>	
<i>ARID2</i>					<i>CSF3R</i>	
<i>PHF6</i>					<i>RIT1</i>	
<i>IKZF1</i>					<i>BRAF</i>	
<i>SETBP1</i>					<i>JAK3</i>	
					<i>AMER1</i>	
					<i>MAP3K7</i>	
					<i>SMO</i>	
					<i>SH2B3</i>	
					<i>MYD88</i>	

**Abreviaturas:** **S1**, modificadores de la cromatina; **S2**, complejo de la cohesina; **S3**, ARN *splicing*; **S4**, factores de la transcripción; **S5**, ciclo celular; **S6**, señales de activación; **S7**, respuesta al daño del ADN.

**Tabla suplementaria 4.** Análisis univariante de Cox en relación con la SLP.

VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Univariante			
			p	OR	IC 95	
GERM LP/P	Si/No	---	0,435	1,444	0,575	3,627
DDR <sup>GERM</sup> LP/P	Si/No	---	<b>0,013</b>	2,016	1,159	3,507
DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup>	Si/No	---	<b>&lt;0,001</b>	19,893	6,153	64,310
ERCC6L2 <sup>GERM</sup>	Si/No	---	<b>0,048</b>	4,370	1,010	18,906
MMR <sup>GERM</sup> VUS/LP/P	Si/No	---	0,417	0,435	0,058	3,248
MMR <sup>GERM</sup> REVEL $\geq$ 0,6	Si/No	---	0,557	0,047	<0,001	1286,1
Edad al diagnóstico, años (mediana, RIQ)	AUC=0,468 (S=0,737 ;1-E=0,730)	40	0,716	1,207	0,438	3,331
Género (F/M), %	F/M	---	0,262	0,577	0,221	1,507
Leucocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	AUC=0,386 (S=0,368; 1-E=0,649)	3	<b>0,040</b>	0,392	0,160	0,959
Neutrófilos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	1,0	<b>0,007</b>	0,289	0,118	0,707
Monocitos, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	AUC=0,391 (S=0,278; 1-E=0,550)	0,3	<b>0,129</b>	0,472	0,179	1,243
Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,314 (S=0,474; 1-E=0,681)	9,5	<b>0,016</b>	0,336	0,139	0,812
VCM, fl, mediana (RIQ)	AUC=0,520 (S=0,529; 1-E=0,507)	99	0,950	0,971	0,385	2,446
Plaquetas, x10 <sup>9</sup> /L, mediana (RIQ)	AUC=0,458 (S=0,579; 1-E=0,627)	80	<b>0,045</b>	0,403	0,166	0,979
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	AUC=0,599 (S=0,625; 1-E=0,508)	290	0,574	1,320	0,501	3,476
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	340	<b>0,130</b>	2,084	0,806	5,384
sEPO, UI/L, mediana (RIQ)	AUC=0,690 (S=0,750; 1-E=0,522)	60	0,275	2,438	0,491	12,099
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	Si/No	---	0,425	0,550	0,127	2,384
Antecedentes familiares de neoplasia hematológica, %	Si/No	---	0,505	0,504	0,067	3,776
Antecedentes familiares SMD y/o LMA, %, %	Si/No	---	0,555	0,545	0,073	4,083
Antecedentes familiares de neoplasia oncológicas, %	Si/No	---	0,251	1,823	0,654	5,079
Fibrosis en MO*, %	Si/No	---	0,512	1,733	0,335	8,978
Celularidad de MO (hipo vs. normo/hiper), %	Si/No	---	0,935	0,962	0,379	2,242
Blastos en MO, %, mediana (RIQ)	AUC=0,619 (S=0,500; 1-E=0,358)	4	<b>0,007</b>	3,595	1,411	9,160
Líneas de displasia, 1 vs. 2/3, %	Si/No	---	0,156	30,516	0,272	3420,960
Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)	Si/No	---	<b>&lt;0,001</b>	5,926	2,413	14,555

Notas: \* porcentaje calculados sobre los casos que se realizó biopsia ósea. En negrita, p<0,05.

Abreviaturas: GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisado.

**Tabla suplementaria 5.** Análisis univariante de Cox en relación con la SG.

VARIABLE	Dicotomización	Punto de corte	Univariante			
			p	OR	IC95	
GERM LP/P	Si/No	---	0,244	1,680	0,702	4,020
DDRGERM LP/P	Si/No	---	<b>0,027</b>	3,094	1,138	8,416
DDR <sup>GERM</sup> LP/P +TP53 <sup>SOM</sup>	Si/No	---	<b>&lt;0,001</b>	34,056	9,589	120,949
ERCC6L2 <sup>GERM</sup>	Si/No	---	<b>0,034</b>	4,882	1,125	21,188
MMR <sup>GERM</sup> VUS/LP/P	Si/No	---	0,676	1,297	0,383	4,393
MMR <sup>GERM</sup> REVEL $\geq$ 0,6	Si/No	---	0,551	0,047	<0,001	1092,9
Edad al diagnóstico, años (mediana, RIQ)	F/M	40	0,214	2,024	0,665	6,158
Género (F/M), %	AUC=0,386 (S=0,368; 1-E=0,649)	---	0,986	1,008	0,427	2,376
Leucocitos, x109/L, mediana (RIQ)	AUC=0,365 (S=0,368; 1-E=0,703)	3	<b>0,010</b>	0,301	0,121	0,747
Neutrófilos, x109/L, mediana (RIQ)	AUC=0,391 (S=0,278; 1-E=0,550)	1,0	<b>0,003</b>	0,258	0,107	0,623
Monocitos, x109/L, mediana (RIQ)	AUC=0,314 (S=0,474; 1-E=0,681)	0,3	0,151	0,495	0,189	1,293
Hemoglobina, g/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,520 (S=0,529; 1-E=0,507)	9,5	<b>0,010</b>	0,320	0,134	0,763
VCM, fl, mediana (RIQ)	AUC=0,458 (S=0,579; 1-E=0,627)	99	0,956	0,976	0,406	2,346
Plaquetas, x109/L, mediana (RIQ)	AUC=0,701 (S=0,800; 1-E=0,536)	80	0,365	0,657	0,264	1,632
LDH, UI/L, mediana (RIQ)	AUC=0,656 (S=0,588; 1-E=0,411)	290	<b>0,105</b>	2,355	0,835	6,641
Ferritina, ug/dl, mediana (RIQ)	AUC=0,690 (S=0,750; 1-E=0,522)	340	<b>0,022</b>	3,339	1,190	9,370
sEPO, UI/L, mediana (RIQ)	Si/No	60	0,282	2,105	0,542	8,177
Hepatomegalia y/o esplenomegalia, %	Si/No	---	0,143	0,222	0,030	1,665
Antecedentes familiares de neoplasia hematológica, %	Si/No	---	0,362	0,043	<0,001	37,321
Antecedentes familiares SMD y/o LMA, %, %	Si/No	---	0,370	0,043	<0,001	41,826
Antecedentes familiares de neoplasia oncológicas, %	Si/No	---	0,702	1,277	0,365	4,468
Fibrosis en MO*, %	Si/No	---	0,674	0,637	0,078	5,195
Celularidad de MO (hipo vs. normo/hiper), %	AUC=0,619 (S=0,500; 1-E=0,358)	---	0,682	1,216	0,477	3,101
Blastos in MO, %, mediana (RIQ)	Si/No	4	<b>&lt;0,001</b>	6,539	2,601	16,440
Líneas de displasia, 1 vs. 2/3, %	Si/No	---	0,185	2,695	0,621	11,693
Riesgo citogenético según IPSS-R, % (pobre/muy pobre)	Si/No	---	<b>0,001</b>	4,059	1,718	9,588

Notas: \*porcentaje calculados sobre los casos que se realizó biopsia ósea. En negrita, p<0,05.

Abreviaturas: GERM, germinal; DDR, vía de la respuesta al daño del ADN; RIQ, rango intercuartílico; VCM, volumen corpuscular medio; LDH, lactato deshidrogenasa; sEPO, eritropoyetina sérica; MO, médula ósea; FISH, siglas en inglés de hibridación fluorescente *in situ*; IPSS-R, Índice Pronóstico Internacional revisado.

# **Anexo II: Información suplementaria**



## LISTADO DE GENES PARA EL FILTRADO GERMINAL

<i>FANCA</i>	<i>TERC</i>	<i>RAP2A</i>	<i>KRAS</i>	<i>SPRED1</i>	<i>BARD1</i>
<i>FANCB</i>	<i>TERT</i>	<i>STAT3</i>	<i>LIG4</i>	<i>MYSM1</i>	<i>BUB1B</i>
<i>FANCC</i>	<i>TINF2</i>	<i>CDC25C</i>	<i>MAD2L2</i>	<i>APC</i>	<i>CDK4</i>
<i>BRCA2</i>	<i>NOP10</i>	<i>AP3B1</i>	<i>MASTL</i>	<i>BARD1</i>	<i>CDKN2A</i>
<i>FANCD2</i>	<i>NHP2</i>	<i>LMATOR2</i>	<i>MET</i>	<i>BUB1B</i>	<i>CDH1</i>
<i>FANCE</i>	<i>WRAP53</i>	<i>LYST</i>	<i>KMT2A</i>	<i>CDK4</i>	<i>GLG1</i>
<i>FANCF</i>	<i>USB1</i>	<i>VPS13B</i>	<i>MYH9</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CHEK2</i>
<i>FANCG</i>	<i>CTC1</i>	<i>RAC2</i>	<i>NBEAL2</i>	<i>CDH1</i>	<i>FH</i>
<i>FANCI</i>	<i>RTEL1</i>	<i>RAB27A</i>	<i>NBN</i>	<i>GLG1</i>	<i>GAR1</i>
<i>BRIP1</i>	<i>ACD</i>	<i>YARS2</i>	<i>NRAS</i>	<i>CHEK2</i>	<i>HOXB13</i>
<i>FANCL</i>	<i>NAF1</i>	<i>RECQL4</i>	<i>PFKL</i>	<i>FH</i>	<i>KIF1</i>
<i>FANCM</i>	<i>PARN</i>	<i>WRN</i>	<i>PIEZO1</i>	<i>GAR1</i>	<i>MUTYH</i>
<i>PALB2</i>	<i>POT1</i>	<i>LAPTM5</i>	<i>PIGA</i>	<i>HOXB13</i>	<i>PRSS1</i>
<i>RAD51C</i>	<i>STN1</i>	<i>HCLS1</i>	<i>PML</i>	<i>KIF1</i>	<i>RAD50</i>
<i>SLX4</i>	<i>TERF1</i>	<i>ABCB7</i>	<i>PRF1</i>	<i>MUTYH</i>	<i>STK11</i>
<i>ERCC4</i>	<i>TERF2</i>	<i>ABCD4</i>	<i>PSTPIP1</i>	<i>PRSS1</i>	<i>VHL</i>
<i>RAD51</i>	<i>CDAN1</i>	<i>ABL1</i>	<i>PUS1</i>	<i>RAD50</i>	<i>XRCC3</i>
<i>BRCA1</i>	<i>C15orf41</i>	<i>ADA</i>	<i>RAB27A</i>	<i>STK11</i>	<i>FLI1</i>
<i>UBE2T</i>	<i>SEC23B</i>	<i>AK2</i>	<i>RAD51B</i>	<i>VHL</i>	<i>ETS1</i>
<i>XRCC2</i>	<i>KIF23</i>	<i>ALAS2</i>	<i>RAD51D</i>	<i>XRCC3</i>	<i>ACBD5</i>
<i>MAD2L2</i>	<i>KLF1</i>	<i>ALDH2</i>	<i>RARA</i>	<i>FLI1</i>	<i>STIM1</i>
<i>RBM8A</i>	<i>SBDS</i>	<i>ASXL1</i>	<i>RMRP</i>	<i>ETS1</i>	<i>GP9</i>
<i>RPS19</i>	<i>DNAJC21 / HSP40</i>	<i>ATM</i>	<i>RPS14</i>	<i>ACBD5</i>	<i>DGCR2</i>
<i>RPS24</i>	<i>EFL1</i>	<i>ATR</i>	<i>SF1</i>	<i>GPIIbβ</i>	<i>ITGB3</i>
<i>RPS17</i>	<i>BLM</i>	<i>BCL2L10</i>	<i>SF3A1</i>	<i>GP9</i>	<i>RYR1</i>
<i>RPL5</i>	<i>TP53</i>	<i>BCL2L11</i>	<i>SF3B1</i>	<i>DGCR2</i>	<i>VWDE</i>
<i>RPL11</i>	<i>NF1</i>	<i>BCOR</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>ITGB3</i>	<i>CASP4</i>
<i>RPL35A</i>	<i>RUNX1</i>	<i>BCR</i>	<i>SLC19A2</i>	<i>RYR1</i>	<i>CSNK1A1L</i>
<i>RPS7</i>	<i>RBM8A</i>	<i>BRAF</i>	<i>SLC25A38</i>	<i>VWDE</i>	<i>DNAH11</i>
<i>RPS10</i>	<i>GATA2</i>	<i>CBL</i>	<i>SLC37A4</i>	<i>CASP4</i>	<i>PPM1J</i>
<i>RPS29</i>	<i>SRP72</i>	<i>CFHR1</i>	<i>SLC46A1</i>	<i>CSNK1A1L</i>	<i>PRR23B</i>
<i>RPS26</i>	<i>CEBPA</i>	<i>CFHR3</i>	<i>SLC4A1</i>	<i>DNAH11</i>	<i>PCLO</i>
<i>RPL26</i>	<i>ANKRD26</i>	<i>CLCN7</i>	<i>SMARCAL1</i>	<i>PPM1J</i>	<i>PDCD4</i>
<i>RPL15</i>	<i>SETBP1</i>	<i>CXCR4</i>	<i>SRSF1</i>	<i>PRR23B</i>	<i>RGS7</i>
<i>GATA1</i>	<i>NPM1</i>	<i>DHFR</i>	<i>SRSF2</i>	<i>PCLO</i>	<i>RNF144A</i>
<i>RPL18</i>	<i>DDX41</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>TAZ</i>	<i>PDCD4</i>	<i>UTP20</i>
<i>RPL27</i>	<i>ETV6</i>	<i>ENG</i>	<i>TBXAS1</i>	<i>TGFB1</i>	<i>EML6</i>
<i>RPL31</i>	<i>ATG2B</i>	<i>FECH</i>	<i>TCIRG1</i>	<i>TPI1</i>	<i>AACS</i>
<i>RPL35</i>	<i>GSKIP</i>	<i>FLT3</i>	<i>TET2</i>	<i>U2AF1</i>	<i>C7orf66</i>
<i>RPS27</i>	<i>PAX5</i>	<i>GBA</i>	<i>TGFB1</i>	<i>U2AF2</i>	<i>CILP2</i>
<i>RPS28</i>	<i>SH2B3</i>	<i>GF11B</i>	<i>TPI1</i>	<i>WT1</i>	<i>TNRC6C</i>
<i>TSR2</i>	<i>MSH2</i>	<i>GLRX5</i>	<i>U2AF1</i>	<i>XRCC4</i>	<i>MYO15A</i>
<i>RPS20</i>	<i>MLH1</i>	<i>GP1BA</i>	<i>U2AF2</i>	<i>ZRSR2</i>	<i>AMER2</i>
<i>ELANE</i>	<i>EPCAM</i>	<i>GP6</i>	<i>WT1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>CPEB2</i>
<i>GF11</i>	<i>MSH6</i>	<i>HBB</i>	<i>XRCC4</i>	<i>SOS1</i>	<i>RFWD3</i>
<i>HAX1</i>	<i>PMS2</i>	<i>IDH1</i>	<i>ZRSR2</i>	<i>RAF1</i>	<i>SEPT6</i>
<i>G6PC3</i>	<i>SAMD9L</i>	<i>IDH2</i>	<i>PTPN11</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>TENT4B</i>
<i>VPS45</i>	<i>SAMD9</i>	<i>IFNG</i>	<i>SOS1</i>	<i>HRAS</i>	<i>CTLA4</i>
<i>CSF3R</i>	<i>MECOM</i>	<i>ITGA2B</i>	<i>RAF1</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>ADA2</i>
<i>WAS</i>	<i>HOXA11</i>	<i>IVD</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>SHOC2</i>	<i>CD40LG</i>
<i>JAGN1</i>	<i>ERCC6L2</i>	<i>JAK2</i>	<i>HRAS</i>	<i>SPRED1</i>	<i>CXCR4</i>
<i>MPL</i>	<i>RBBP6</i>	<i>KIT</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>MYSM1</i>	<i>AK2</i>

<i>DKC1</i>	<i>RAP1A</i>	<i>KMT2D</i>			
<i>MSH3</i>	<i>HYDIN</i>	<i>IKZF1</i>			
<i>PMS1</i>	<i>MUC16</i>	<i>FASLG</i>			
<i>MBD4</i>	<i>MUC5B</i>	<i>CASP10</i>			
<i>SLC19A1</i>	<i>MYOM3</i>	<i>KLHDC8B</i>			
<i>PCNA</i>	<i>NMUR2</i>	<i>BDKRB1</i>			
<i>EXO1</i>	<i>PKD1L2</i>	<i>BDKRB2</i>			
<i>RPA4</i>	<i>PPP1R3A</i>	<i>HBS1L</i>			
<i>POLB</i>	<i>RNF213</i>	<i>MYB</i>			
<i>POLD1</i>	<i>TNC</i>	<i>LINC-PINT</i>			
<i>PMS2P3</i>	<i>MDM4</i>	<i>EIF6</i>			
<i>RFC1</i>	<i>TAL1</i>	<i>TCOF1</i>			
<i>FOXN2</i>	<i>TP53BP2</i>	<i>CXCR2</i>			
<i>DIDO1</i>	<i>ACAD9</i>	<i>STK4</i>			
<i>IKZF5</i>	<i>AFMID</i>	<i>CLPB</i>			
<i>MPO</i>	<i>AICDA</i>	<i>TCN2</i>			
<i>DHX34</i>	<i>AURKA</i>	<i>EIF2AK3</i>			
<i>IL17RA</i>	<i>BRSK1</i>	<i>DNM2</i>			
<i>NAPRT1</i>	<i>CACNA2D4</i>	<i>CTSC</i>			
<i>DNAH9</i>	<i>CAPN12</i>	<i>CSF2RB</i>			
<i>SRP9</i>	<i>CCDC33</i>	<i>DDIT3</i>			
<i>SRP14</i>	<i>COL4A1</i>	<i>SPDL1</i>			
<i>SRP19</i>	<i>DNAJB1</i>	<i>CENPU</i>			
<i>SRP54</i>	<i>ECHDC2</i>	<i>CENPN</i>			
<i>SRP68</i>	<i>FBXL6</i>	<i>MAD2L1</i>			
<i>COL5A1</i>	<i>FRAS1</i>	<i>PMF1</i>			
<i>LRP2</i>	<i>GOLIM4</i>	<i>NPAT</i>			
<i>MYH13</i>	<i>HNRNPA3</i>	<i>BCL2</i>			
<i>NEK4</i>	<i>LMAA1</i>	<i>BAX</i>			
<i>NPHS1</i>	<i>MGAM</i>	<i>KPNA4</i>			
<i>PRAG1</i>	<i>NOVA2</i>	<i>RIM59</i>			
<i>SLC13A2</i>	<i>PLEKHA7</i>	<i>FRA10B</i>			
<i>TBC1D8</i>	<i>PTK2</i>	<i>NEDD8</i>			
<i>TRERF1</i>	<i>PTPN22</i>	<i>CTU2</i>			
<i>VPS13C</i>	<i>SCLT1</i>	<i>MRE11</i>			
<i>CLTCL1</i>	<i>SEMA4F</i>	<i>SP140</i>			
<i>PMEP1</i>	<i>SETD5</i>	<i>SP140L</i>			
<i>PXDN</i>	<i>SLA2</i>	<i>POLE</i>			
<i>ZNF354A</i>	<i>SLC38A8</i>	<i>SHOC2</i>			
<i>ABL2</i>	<i>SRRM3</i>	<i>APC</i>			
<i>APOB</i>	<i>ST14</i>	<i>NR2F6</i>			
<i>ATP10B</i>	<i>STOX2</i>	<i>HMCN1</i>			
<i>DOCK6</i>	<i>TNRC6B</i>	<i>TCL1A</i>			
<i>HELQ</i>	<i>TONSL</i>				
<i>HKDC1</i>	<i>TSPAN3</i>				
<i>KIAA0556</i>	<i>TULP3</i>				
<i>NCOR2</i>	<i>ULK2</i>				
<i>PRUNE2</i>	<i>WDR46</i>				
<i>TAS1R1</i>	<i>YRDC</i>				
<i>TCHP</i>	<i>ZFYVE21</i>				
<i>TMEM139</i>	<i>ZCCHC8</i>				
<i>TXNDC11</i>	<i>SMO</i>				
<i>ADCY5</i>	<i>KDM1A</i>				
<i>ARAP2</i>	<i>DIS3</i>				
<i>CACNA1G</i>	<i>XPC</i>				

## LISTADO DE GENES PARA EL FILTRADO SOMÁTICO

<i>TAP2</i>	<i>CTCF</i>	<i>IL7R</i>	<i>PPM1D</i>	<i>U2AF35</i>
<i>ABCC3</i>	<i>CUX1</i>	<i>JAK1</i>	<i>PRPF40B</i>	<i>U2AF65</i>
<i>ABL1</i>	<i>CXCR4</i>	<i>JAK2</i>	<i>PRPF8</i>	<i>WT1</i>
<i>AKT2</i>	<i>CYP3A4</i>	<i>JAK3</i>	<i>PTEN</i>	<i>WHSC1</i>
<i>AMER1</i>	<i>DIS3</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PTPN11</i>	<i>XPO1</i>
<i>APC</i>	<i>DNMT1</i>	<i>KIT</i>	<i>RAD21</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>ARID2</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>KMT2A</i>	<i>RB1</i>	<i>MSH3</i>
<i>ASXL1</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>KRAS</i>	<i>RET</i>	<i>PMS1</i>
<i>ATM</i>	<i>EED</i>	<i>LMAB4</i>	<i>RIT1</i>	<i>MBD4</i>
<i>ATRX</i>	<i>EGFR</i>	<i>LUC7L2</i>	<i>RPS14</i>	<i>SLC19A1</i>
<i>BCOR</i>	<i>EP300</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>PCNA</i>
<i>BCORL1</i>	<i>ERG</i>	<i>MAP3K7</i>	<i>SETBP1</i>	<i>EXO1</i>
<i>BCL11B</i>	<i>ETNK1</i>	<i>MEF2B</i>	<i>SETD2</i>	<i>RPA4</i>
<i>BRAF</i>	<i>ETV6</i>	<i>KMT2A</i>	<i>SF1</i>	<i>POLB</i>
<i>BRCC3</i>	<i>EZH2</i>	<i>MPL</i>	<i>SF3A1</i>	<i>POLD1</i>
<i>CALR</i>	<i>FANCL</i>	<i>MYD88</i>	<i>SF3B1</i>	<i>PMS2P3</i>
<i>CARD11</i>	<i>FBXW7</i>	<i>NF1</i>	<i>SH2B3</i>	<i>RFC1</i>
<i>CBL</i>	<i>FLT3</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMC1A</i>	<i>MSH2</i>
<i>CBLB</i>	<i>GATA1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>SMC3</i>	<i>MLH1</i>
<i>CBLC</i>	<i>GATA2</i>	<i>NOTCH3</i>	<i>SRSF2</i>	<i>EPCAM</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>GATA3</i>	<i>NPM1</i>	<i>STAG1</i>	<i>MSH6</i>
<i>CEBPA</i>	<i>GF11</i>	<i>NRAS</i>	<i>STAG2</i>	<i>PMS2</i>
<i>CD79B</i>	<i>GNAS</i>	<i>NT5C2</i>	<i>STAT5A</i>	<i>SAMD9</i>
<i>CNOT3</i>	<i>GNB1</i>	<i>PAX5</i>	<i>STAT3</i>	<i>SAMD9L</i>
<i>CRLF2</i>	<i>ID3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SUZ12</i>	<i>SMO</i>
<i>CREBBP</i>	<i>IDH1</i>	<i>PDS5B</i>	<i>TET2</i>	<i>RPL</i>
<i>CSF1R</i>	<i>IDH2</i>	<i>PHF6</i>	<i>TLR2</i>	
<i>CSF3R</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PIGA</i>	<i>TP53</i>	
<i>CSNK1A1</i>	<i>IKZF2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>U2AF1</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>IKZF3</i>	<i>PIM1</i>	<i>U2AF2</i>	

**HOJA DE RECOGIDA DE DATOS (CRD)**

**A) DATOS DE FILIACIÓN**

**CENTRO:**                      **NHC o NIP:**                      **Fecha Nacimiento:**                      **Sexo:** 1) Mujer 2) Hombre

**B) DATOS AL DIAGNÓSTICO**

1. **Fecha diagnóstico:** ..... 2. **Hepatomegalia:** No (0) Si (1). 3. **Esplenomegalia:** No (0) Si (1).
  4. **Hemograma:** Leucocitos( $\times 10^9/l$ ):.....N( $\times 10^9/l$ ):..... Mo ( $\times 10^9/l$ ):..... Hb(g/dl)..... VCM(fl).....  
Plaquetas:(  $10^9/$  )..... VSG:.....(mm/1<sup>o</sup>h)
  5. **Bioquímica:** LDH(UI/L)..... Ferritina(mg/dl):..... Eritropoyetina(U/L).....
  6. **Dx de Neoplasia previa o sincrónica:** No (0) Si (1). **Tipo de neo previo o sincrónica:**.....
  7. **Presencia de malformación física/retardo de crecimiento:** No (0) Si (1). Cuales:.....
  8. **Enfermedad neurológica/miopatía en infancia:** No (0) Si (1).
  9. **Enfermedad endocrino en infancia:** No (0) Si (1).
  10. **Antecedentes familiares de neoplasia hematológica:** No (0) Si (1). Tipo de neoplasia: .....  
Relación con el paciente del familiar con el antecedente.....
  11. **Antecedentes familiares de neoplasia oncológica:** No (0) Si (1).  
Tipo de neoplasia oncológica en familiar: .....  
Relación con el paciente del familiar con el antecedente: .....
- Otros comentarios de antecedentes familiares oncológicos o hematológicos:**  
.....

**C. ASPIRADO MEDULAR AL DIAGNÓSTICO:**

1. **Celularidad:** HIPER (1) NORMO (2) HIPO (3). 2. **Blastos (%)**..... 3. **Sideroblasto en anillo(%)**:.....
4. **Nº líneas con displasia:**..... 5. **CITOGENÉTICA:**.....**FISH:** .....

**D. BIOPSIA MEDULAR AL DIAGNÓSTICO**

**Fibrosis:** No (0) Si (1). 2. **Grado:** .....

**E. CLASIFICACIÓN DIAGNÓSTICA**

**WHO (2017):**..... **FAB:**.....

**F) Dependencia trasfusional**

**De Hematíes al diagnóstico:** No (0) Si (1). **De Plaquetas al diagnóstico:** No (0) Si (1).  
**Desarrollo de requerimientos tx tras el dx:** Hematíes: No (0) Si (1). Plaquetas: No (0) Si (1).

**G) Tratamientos con factores estimulantes**

1. **Eritropoyetina:** No (0) Si (1). Fecha de inicio:..... **Respuesta:**  
\*Incremento de 1,5 g/dl a las 8 semanas o disminución de 50% de hematíes (1)  
\*Independencia trasfusional(2) \*No evaluable o estable (3) \* No respuesta(4)
2. **G-CSF:** No (0) Si (1). Fecha de inicio:.....

Respuesta: aumento >500/ul de Neutrófilos en 8 semanas Si (1) No (2) No evaluable (3)

3. Eltrombopag: No (0) Si (1). Fecha de inicio:.....

Respuesta: RC (>100.000 plt sin sangrados)(1) RP (>30.000 plt sin sangrados mperomenos de 100.000 (2) Sin respuesta (3)

**H) Tratamientos Modificador específico (ej: 5-Aza, lenalidomida)**

- No (0) Si (1). Tipo:.....Nº de ciclos:.....

Respuesta: RC (1) RP (2) Mejoría hematológica (3) Enfermedad Estable (4) ) Progresión (5)

**I) Otros Tratamientos Modificador específico**

1. Quimioterapia: No (0) Si (1). Fecha de inicio:..... Esquema:.....

Respuesta: RC (1) RP (2) Mejoría hematológica (3) Enfermedad Estable (4) ) Progresión (5)

2. Corticoides: No (0) Si (1). Respuesta: .....

3. Hidroxiurea (Hydrea): No (0) Si (1).

**J) ALO-TPH**

1. No (0) Si (1). 2. Fecha:..... 3. Situación al TPH: RC (1) RP (2) EE (3) Progresión (4)

4. Fallo de movilización en potencial donante familiar: No (0) Si (1).

5. Citopenias inexplicadas en potencial donante familiar: No (0) Si (1).

6. Tipo de donante definitivo: Emparentado (1) No emparentado (2). Tipo Relación:.....

7. Donante: Edad..... Sexo Mujer (1) Varón (2)

8. Acondicionamiento: Intensidad reducida (1). Mieloablativo (2) Esquema: .....

9. Irradiación corporal total: No (0) Si (1). 10. Timoglobulina: No (0) Si (1).

11. HLA: Idéntico (1) No idéntico (2) Haploidentico (3). 12. Fuente: SP (1) MO (2) Cordón (3)

12. CD34x10<sup>6</sup> total infundido:.....

13. Profilaxis de EICH: MTX+csa (1) MMF+csa+otros (2) Mtx+csa+atg (3) Csa+pdn+atg (4)

14. Fallo de injerto: No (0) Si (1).

15. Fecha del injerto de neut(RAN>500):.....16.Fecha del injerto de plt (>20,000 sin transfusiones):.....

17. EICH aguda: No (0) GI (1) GII (2) GIII (3) GIV (4) 18. EICH crónica: No (0) Leve (1) Moderado (2) Severa (3)

19. Síndrome sinusoidal hepático o EVO: No (0) Si (1).

20. Complicaciones pulmonares (fibrosis, BONO, enfisema...): No (0) Si (1).

21. Desarrollo de una leucemia o SMD en las células del donante (Donor Cell Leukemia): No (0) Si (1).

22. Mejor respuesta al TPH: .....

**K) Progresión a Leucemia aguda**

Leucemia aguda: No (0) Si (1). Fecha de progresión:.....

CITOGENÉTICA:.....FISH: .....

**L) Datos de evolución**

1. Exitus: No (0) Si (1). Causa de exitus: .....Fecha de exitus o última visita: .....

Situación de la enfermedad en última visita o exitus:.....