

# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Facultat de Medicina i Odontologia**

Departament de Medicina



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS NEOPLASIAS  
MIELOIDES RELACIONADAS CON LA TERAPIA**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**M<sup>a</sup> de la Encarnación López Pavía**

Dirigida por:

**Prof. Miguel A. Sanz Alonso**

**Dra. Esperanza Such Taboada**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Departament de Medicina

**MIGUEL A. SANZ ALONSO**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia,

**ESPERANZA SUCH TABOADA**, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS NEOPLASIAS MIELODIES RELACIONADAS CON LA TERAPIA", ha sido realizada bajo nuestra dirección por **M<sup>a</sup> de la Encarnación López Pavía**, Licenciado en Medicina, y reúne a nuestro juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

Fdo.: Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Dra. Esperanza Such Taboada

*Valencia,*

## **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

Dado que no soy una persona parca en palabras, he decidido organizar mis agradecimientos para no extenderme más allá de lo necesario. Siguiendo la línea de lo aprendido estos años, voy a empezar intentando ser “*focus and short*”, como debería ser toda introducción, agradeciendo a Miguel sus enseñanzas, y especialmente su paciencia con mi redacción y mis conocimientos de Word. Pero sobre todo, gracias por los “lunes con el jefe”, fundamentales para terminar este proyecto. Ha sido un placer y un orgullo haber desarrollado mis primeros años de carrera profesional bajo tus enseñanzas. Podría extenderme más pero se trata de concretar, así que voy a concluir aquí.

Una vez introducido el tema, pasaré a comentar el material y métodos de mi presente escrito. El material ha sido sin duda, el maravilloso tema que me “regaló” el Dr. Jose Cervera. Gracias por confiar en mí, a pesar de que no queráis gente “que hablara tanto”. Me quedaron muchas cosas pendientes cuando me fui hace tres años, pero algún día prometo encontrar la muestra de SB, al menos ya me manejo con las impresoras.

En cuanto a los “métodos” aplicados para desarrollar esta tesis quiero agradecer en primer lugar a Mariam su recibimiento en el “Labo”, por sus enseñanzas del manejo de las pipetas, las comidas calentadas en el microondas, y por las innumerables veces que se enfrentó a las cuquis del sótano. Ha sido estupendo compartir estos años contigo. A M. Ángeles Silla, por su cariño y su paciencia a la hora de enseñarme a diferenciar los cromosomas, agradezco todos los esfuerzos realizados, pero sigo pensando que “algo hay” por ahí que no queréis confesar que os da “superpoderes” para interpretar los cariotipos. A todo el resto de compañeros del laboratorio con los que he compartido estos años: M<sup>a</sup> Carmen, Ana (incluso con sus tablas de Excel), Desi y como no a Iván, por su trabajo, esfuerzo y dedicación. A María Montalt, por las charradas en la hora de lactancia y como no, a mi querida estudiante Pilar, así da gusto enseñar. Me gustaría también mandarle un beso muy grande a Úrsula, espero que te llegue allí donde estés.

Los resultados de esta tesis han sido posibles, gracias a mucha gente, a la que me es imposible nombrar aquí porque no acabaría jamás, lo resumiré dando las gracias a todos mis compañeros durante mis años en La Fe: médicos, enfermeras, auxiliares, administrativos, data manager. Gracias por vuestro trabajo diario y vuestra preocupación constante por los pacientes. Quiero hacer mención especial a mis “padres” hematológicos, Guillermo Martín y Mariluz Pérez, gracias por ser como sois y por ser el reflejo del hematólogo que algún día me gustaría llegar a ser. A Malé, Fede y Amparo por los años compartidos en diagnóstico y todo lo que me han enseñado. A Lourdes por su amistad. A Trini y M<sup>a</sup> Jesús por los miles de viajes en taxi. A Ignacio por su ayuda en esta tesis. A Chusa y Paqui por esos maravillosos tres meses en la sala y a Guillermo Sanz por la confianza depositada en mi durante todo este tiempo. Como no, a todos mis resis, mayores, pequeños y muy especialmente a mi coR Adri y mi coR de espíritu David. A la primera gracias por rescatar mis gafas de la arena y al segundo, gracias por “nuestro año” de sala, lo recuerdo como una de las mejores épocas de mi vida laboral. No

puedo dejar de agradecer a mis pacientes todo lo que me han enseñado. Un beso enorme allí donde estén para Estefanía, Jose Vicente, Juan, las Susanas y Ana, siempre os llevaré en mi corazón. Quiero también agradecer a todos mis compañeros durante los últimos tres años en el Hospital General por su acogida a mi llegada. Especialmente a Alicia por su amistad, confianza y cariño y a Elena por su amor al trabajo, su saber hacer y facilitarme la vida tanto. Gracias.

Como conclusión de todo este proceso saco que no hay nada mejor que tener a gente que te quiera a tu alrededor, y yo en eso he tenido mucha suerte. Así que solo puedo concluir agradeciendo a los que están ahí siempre: amigos y familia.

Gracias a Inés por todo, me podría la vida entera agradeciéndote tantas cosas, aunque no sepas quien es Yoko Ono, yo te quiero igual.

Gracias infinitas a Irene, mi compañera de batallas, mi pirómana en potencia, mi conspiranoica favorita, la vida contigo a mi lado es mejor, y aunque ahora me has abandonado, a ti te lo perdono todo. Seguiré llamándote a diario. Te quiero (aunque no te gusten las sensiblerías).

GRACIAS y en mayúsculas a la codirectora de esta tesis, Espe, por su confianza, su amistad, su cariño, sus consejos, por todo lo que me ha aportado estos años. Eres un ejemplo de fortaleza, de saber estar, de buscar siempre la excelencia en lo que haces. Sin ti esta tesis no hubiera visto nunca la luz. Gracias por apoyarme, darme tan buenos consejos y estar siempre ahí. Te quiero.

Gracias a todos mis amigos, a los de toda la vida (Marta, Patri y el resto de Gestalgar). A mis amigas de la universidad: Roci, Bego, Bárbara, Marta y Rake por haber aguantado el abandono del último año, especialmente a Roci por nuestras mil conversaciones sobre el tema y como no a Rake, por quererme tal cual soy. A mi prima María por tantas cosas compartidas. A los amigos nuevos que he ido haciendo estos años (Teresa, Luisfer, Yolanda, Cintia..) que han vivido la tesis como suya, a todos y cada uno de ellos gracias.

Al resto de mi familia, especialmente a mi tía Paquita, mi tía Alberta, mi tío Pepe y mi abuelita Alberta, por haberse ocupado de mí cuando más lo necesitaba.

A mi familia política, por tratarme como una más desde el principio, especialmente a mis suegros, Pepita y Paco por quererme como una hija.

Al motor de mi vida, Joan y Emma, por alegrarme los días y alterarme las noches.

Al amor de mi vida, Santi, por quererme como me quieres, por hacerme tan feliz y haberme aguantado todas las quejas del mundo desde hace casi 14 años (podría escribir mil hojas sobre ti, pero me he puesto como límite dos folios). Te quiero.

A mis PADRES, Ángel y Manoli, por dárme todo. Por sacrificar todo por mi educación y mi felicidad. Jamás podré demostraros lo mucho que os quiero.







## ÍNDICE



<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>I</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 CONCEPTO DE NEOPLASIA MIELOIDE RELACIONADA CON LA TERAPIA .....	3
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	3
1.2.1 Frecuencia.....	3
1.2.2 Enfermedades previas.....	4
1.3 ETIOLOGÍA.....	4
1.3.1 Carcinógenos ocupacionales o ambientales.....	4
1.3.2 Radiaciones ionizantes.....	5
1.3.3 Agentes quimioterápicos.....	5
1.3.4 Susceptibilidad individual.....	6
1.4 PATOGENIA.....	7
1.4.1 NMRT producidas por inducción de inestabilidad genómica .....	8
1.4.2 NMRT producidas por inducción directa de un oncogén de fusión .....	8
1.4.3 Selección clonal .....	9
1.4.4 Susceptibilidad individual hereditaria .....	10
1.5 CLASIFICACIÓN DE LAS NMRT .....	11
1.6 DIAGNÓSTICO DE LAS NMRT .....	12
1.6.1 Citomorfología .....	12
1.6.2 Inmunofenotipo.....	13
1.6.3 Citogenética .....	13
1.6.4 Biología molecular.....	17
1.7 FACTORES PRONÓSTICO DE LAS NMRT.....	28
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 PACIENTES .....	45
4.2 ESTUDIO CITOGÉNÉTICO .....	46
4.2.1 Preparación e incubación del cultivo.....	46
4.2.2 Sacrificio del cultivo.....	46
4.2.3 Preparación de extensiones.....	47
4.2.4 Tinción de bandas G.....	48
4.2.5 Análisis del cariotipo .....	48
4.3 ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES .....	48
4.3.1 Extracción de ácidos nucleicos .....	48
4.3.2 Caracterización molecular de los pacientes .....	48

4.3.3	<i>Procesamiento de las muestras para la secuenciación masiva</i> .....	49
4.3.3.1	Preparación de la librería.....	50
4.3.3.2	Digestión enzimática .....	51
4.3.3.3	Ligación de los adaptadores a los amplicones.....	52
4.3.3.4	Purificación de la librería .....	53
4.3.3.5	Amplificación de la librería previo a la cuantificación .....	54
4.3.3.6	Segunda purificación de la librería amplificada .....	54
4.3.3.7	Cuantificación de la librería y cálculo del factor de dilución.....	55
4.3.3.8	Procesado de los amplicones en el secuenciador Ion ProtonTM .....	55
4.3.4	<i>Análisis bioinformático</i> .....	56
4.3.4.1	Criterios de secuenciación .....	57
4.3.4.2	Criterios de filtrado de variantes .....	57
4.3.4.3	Criterios de visualización en el IGV (Integrative Genomic Viewer).....	57
4.3.5	<i>Bases de datos</i> .....	58
4.4	DETECCIÓN DE MUTACIONES EN <i>NPM1</i> Y <i>FLT3</i> .....	58
4.5	DEFINICIONES .....	59
4.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SERIE .....	65
5.2	CLASIFICACIÓN.....	67
5.3	CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA DE LAS NMRT .....	69
5.4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS NMRT .....	71
5.5	RELACIÓN ENTRE CITOGENÉTICA Y PERFIL MUTACIONAL .....	75
5.5.1	<i>Pacientes con cariotipo normal</i> .....	75
5.5.2	<i>Pacientes con cariotipo complejo</i> .....	76
5.5.3	<i>Pacientes con cariotipo monosómico</i> .....	76
5.5.4	<i>Pacientes con alteraciones de los cromosomas 5 y/o 7</i> .....	76
5.5.5	<i>Pacientes con traslocaciones balanceadas</i> .....	77
5.6	FACTORES CON IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL, SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTO E INCIDENCIA ACUMULADA DE RECAÍDA .....	77
5.6.1	<i>Análisis univariante de las características clínico-biológicas</i> .....	77
5.6.2	<i>Análisis univariante de las características moleculares</i> .....	85
5.6.3	<i>Análisis multivariante</i> .....	91
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>107</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>120</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**AMLSG** = *German-Austrian AML Study Group*  
**ATSP** = *Autotrasplante de Sangre Periférica*  
**ARN** = *Ácido ribonucleico*  
**CALGB** = *Cancer and Leukemia Group B*  
**CBF** = *Core-binding factor*  
**CHIP** = *Clonal hematopoiesis of intermediate potencial*  
**CIR** = *Cumulative incidence of relapse*  
**CNA** = *Copy number alterations*  
**DNA** = *Ácido desoxirribonucleico*  
**DMSO** = *Dimetilsulfóxido*  
**dNTP** = *Desoxirribonucleótidos trifosforilados*  
**EH** = *Enfermedad de Hodgkin*  
**EMR** = *Enfermedad Mínima Residual*  
**FAB** = *Franco-Americano-Británica*  
**FISH** = *Fluorescence in situ Hybridization*  
**IGV** = *Integrative Genomic Viewer*  
**INDEL** = *Insertion Deletion*  
**ISCN** = *Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica*  
**Kb** = *Kilobases*  
**LMA** = *Leucemia Mieloblástica Aguda*  
**LMA-t** = *Leucemia Mieloblástica Aguda secundaria a terapia*  
**LMC** = *Leucemia Mieloide Crónica*  
**LMMC** = *Leucemia Mielomonocítica Crónica*  
**LNH** = *Linfoma No Hodgkin*  
**LPA** = *Leucemia Promielocítica Aguda*  
**MO** = *Médula Ósea*  
**MRC** = *Medical Research Council*  
**NGS** = *Next-generation Sequencing*  
**NMRT** = *Neoplasia Mieloide Relacionada con la Terapia*  
**OMS** = *Organización Mundial de la Salud*  
**pb** = *pares de bases*  
**PCR** = *Polymerase Chain Reaction*  
**pM** = *picomolar*  
**QT** = *Quimioterapia*  
**RC** = *Remisión completa*  
**RCA** = *Riesgo Citogenético Adverso*  
**RCI** = *Riesgo Citogenético Intermedio*

**RT** = Radioterapia

**SLE** = Supervivencia Libre de Enfermedad

**SLR** = Supervivencia Libre de Recaída

**SG** = Supervivencia Global

**SMD** = Síndrome Mielodisplásico

**SMD/SMPC** = Síndrome Mielodisplásico

**SMD-t** = Síndrome Mielodisplásico secundario a terapia

**SMPC** = Síndrome Mieloproliferativo Crónico

**SNP** = *Single Nucleotide Polimorphism*

**SNV** = *Single Nucleotide Variation*

**SP** = Sangre Periférica

**SWOG/ECOG** = *Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group*

**TPH** = Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

**VAF** = *Variant allele frequency*

# **1 .INTRODUCCIÓN**





## 1.1 Concepto de neoplasia mieloide relacionada con la terapia

Las neoplasias mieloides relacionadas con la terapia (NMRT) son las leucemias mieloides agudas (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD) o síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/SMPC) que ocurren tras la exposición previa del paciente a agentes citotóxicos como quimioterapia (QT), radioterapia (RT) o la combinación de ambas para el tratamiento de una enfermedad primaria (Arber *et al.*, 2008). Bajo el término NMRT se agrupan numerosas entidades con una amplia variedad de agentes causantes, lo que condiciona su gran heterogeneidad clínica y biológica pero que se postula que constituyen un único síndrome clínico. (Vardiman *et al.*, 2009).

## 1.2 Epidemiología

Las NMRT suponen una de las complicaciones más graves de los pacientes largos supervivientes a otras formas de cáncer, con una incidencia en aumento debido a varios factores como: mayor incidencia de neoplasias, diagnóstico de las mismas en edades más tempranas, esquemas de tratamiento más agresivos, mejor respuesta y, por tanto, mayor número de supervivientes. Además, ésta creciente incidencia también se ve influida por el aumento del uso de fármacos quimioterápicos en pacientes con enfermedades autoinmunes. (Kayser *et al.*, 2011; Vallespi *et al.*, 2011).

### 1.2.1 Frecuencia

La frecuencia de las NMRT se estima en torno a un 10-20% de todos los casos de LMA, SMD y SMD/SMPC. Las frecuencias descritas han ido variando a lo largo del tiempo, en primera instancia representaban en torno a un 27% de todas las LMA, aunque en la mayoría de los casos se incluían también las LMA secundarias a SMD (Leone *et al.*, 1999). En estudios posteriores se estimaba la frecuencia de las LMA secundarias a terapia (LMA-t) en un 14% y de los SMD secundarios a terapia (SMD-t) en un 15% (Mauritzson *et al.*, 2002). Una revisión realizada más recientemente por el grupo germano-austríaco estimaba la frecuencia de las LMA-t en torno a un 7%, tras estudiar un total de 2853 pacientes con diagnóstico de LMA (Kayser *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Enfermedades previas

La distribución de las diversas enfermedades cuyo tratamiento puede acabar desembocando en una NMRT muestra diferencias en la literatura. La mayor parte de los autores coinciden en que la mayoría de los pacientes presentarían inicialmente un tumor sólido, la segunda causa sería otra enfermedad hematológica y, por último, las enfermedades de naturaleza autoinmune (Leone *et al.*, 1999; Schoch *et al.*, 2004; Cervera *et al.*, 2007; Kayser *et al.*, 2011,).

Entre los tumores sólidos, destaca el antecedente de cáncer de mama (52%), seguido de otros tipos de cáncer como el de tiroides (12%), gastrointestinal (10%) y urogenital (9%) (Kayser *et al.*, 2011). En cuanto a los pacientes con diagnóstico previo de enfermedad hematológica, la mayor parte de las series refieren una mayor frecuencia de linfomas no Hodgkin (LNH) (46%), seguido de enfermedad de Hodgkin (EH) (36%) y otros síndromes linfoproliferativos (SLP), aunque las frecuencias varían entre las diversas series (Kayser *et al.*, 2011; Bueso-Ramos *et al.*, 2015).

En el caso concreto de los pacientes con EH, estudios más recientes sugieren que su frecuencia como enfermedad previa no es tan destacada como se pensaba anteriormente. El grupo alemán para el estudio de esta enfermedad, tras analizar una serie de 11.952 pacientes con diagnóstico de EH, encontró que sólo un 0,9% de los mismos había desarrollado una NMRT, tras una media de 72 meses de seguimiento, lo que lo convertiría en un evento raro a diferencia de lo publicado previamente en la literatura (Eichenauer *et al.*, 2014).

## 1.3 Etiología

Los tratamientos con RT, QT o ambos siempre se han considerado ser la causa de una lesión en el material genético de las células progenitoras mieloides. Este daño, si escapa de los mecanismos de reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA), favorecería el desarrollo de una NMRT en estos pacientes. Los daños variarían en función del tratamiento empleado y con ello la presentación clínica de la NMRT.

### 1.3.1 Carcinógenos ocupacionales o ambientales

Diversos tóxicos ambientales, como el benceno y sus derivados, se han relacionado con el desarrollo de leucemias. Otro tipo de sustancias como los pesticidas, empleados en agricultura, o la exposición a otros contaminantes

ambientales como los metales pesados y su relación con estas enfermedades es más controvertida. (Lan *et al.*, 2004; Larson *et al.*, 2007).

### **1.3.2 Radiaciones ionizantes**

Las radiaciones ionizantes pueden dañar la doble hebra de DNA, bien por acción directa sobre la misma, o bien por lesión indirecta inducida por los radicales libres generados durante la exposición. La aparición de las roturas de la doble hebra potencialmente favorece la aparición de alteraciones cromosómicas que conllevaría a la aparición de reordenamientos (Sill H, *et al.*, 2011). Por otro lado, también se pueden producir alteraciones mediante el cambio de la secuencia de nucleótidos o por alteraciones epigenéticas (Stuart *et al.*, 2007).

Estudios realizados en los supervivientes de Hiroshima y Nagasaki establecieron la relación causal entre la aparición de enfermedades hematológicas malignas y la exposición a radiaciones (Little *et al.*, 1993; Preston *et al.*, 1994; Descatha *et al.*, 2005). Estos resultados se confirmaron en estudios posteriores en pacientes tratados con radioterapia (Travis *et al.*, 2000; Haddy *et al.*, 2006; Le Deley *et al.*, 2007; Ojha *et al.*, 2010). La incidencia relativa de aparición de una neoplasia mielóide secundaria a la radiación, principalmente LMA-t, dependería de factores como la dosis acumulada, el área medular expuesta, así como, la duración de la exposición (Smith *et al.*, 2002).

### **1.3.3 Agentes quimioterápicos**

Clásicamente se han reconocido dos grandes grupos de agentes quimioterápicos con potencial para desarrollar una NMRT, cada uno de ellos relacionados con características clínico-biológicas propias en función de los mismos (Tabla 1). Esto llevó incluso a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificara las NMRT en función del tipo de tratamiento previo administrado (Harris NL, *et al.*, 1999). Por un lado, encontraríamos las NMRT desarrolladas en pacientes previamente expuestos a agentes alquilantes, entre los que encontramos fármacos como procarbina, clorambucil, melfalán, ciclofosfamida, carmustina o busulfán, entre otros, cuyo potencial leucemógeno es bien conocido (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2002). Su efecto lesivo parece relacionarse con diversos factores como la dosis acumulada y potenciarse con la edad del paciente. La exposición a agentes alquilantes parece inducir con mayor facilidad roturas centroméricas o pericentroméricas, lo que facilitaría

la aparición de delaciones o pérdidas completas de los cromosomas 5 y 7, que son características de las NMRT relacionadas con estos fármacos. (Andersen *et al.*, 2000). Por otro lado, estarían las NMRT relacionadas con la exposición a inhibidores de la topoisomerasa II, como el etopósido o el tenipósido, cuyo papel en el desarrollo de NMRT es ampliamente conocido y se ha asociado con la aparición de traslocaciones balanceadas en las que se implican genes tales como *MLL* (11q23), *RUNX1* (21q22) y *RARA* (17q21) (Andersen *et al.*, 1998; Sill *et al.*, 2011).

**Tabla 1. Relación entre agentes específicos y características clínico-biológicas de las NMRT**

Agente	Tiempo de latencia	Fase SMD previa	Alteración cromosómica
Alquilantes/radioterapia	2-10 años	Frecuente (50%)	Cariotipos complejos -5/del5q -7/del7q
Inhibidores topoisomerasa II	1-5 años	Infrecuente (<10%)	Translocaciones balanceadas

Dado que actualmente muchos pacientes reciben tratamientos combinados que incluyen numerosos agentes quimioterápicos, la OMS ha abandonado la clasificación tradicional entre NMRT asociada a agentes alquilantes y/o radioterapia y las NMRT relacionadas con inhibidores de topoisomerasas II (Arber *et al.*, 2008). Otros fármacos como los antimetabolitos tales como fludarabina o azatioprina se han descrito también como inductores de este tipo de alteraciones (Smith *et al.*, 2003).

### 1.3.4 Susceptibilidad individual

La gran mayoría de pacientes que reciben tratamiento con QT, sin embargo, no desarrollan una NMRT, por lo que se ha sugerido que deben existir diferencias en la metabolización de los fármacos que predispondrían al desarrollo de estas neoplasias secundarias. Existe gran variabilidad genética en los genes implicados en la eliminación de fármacos, por lo que polimorfismos en los mismos podrían predisponer, probablemente junto con otros factores de tipo ambiental, al desarrollo de NMRT.

Han sido numerosos los genes estudiados por su relación con el metabolismo y depuración de tóxicos aunque con funciones diversas: genes que codifican para los citocromos P450 (*CYPs*) implicados en la primera fase del metabolismo o genes como *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* (Glutation S-metiltransferasa), que participan en la segunda

fase del mismo; genes que están implicados en los procesos de reparación del DNA (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *RAD51*, *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB*, *XPG*, *CHEK2* y *ATM*) así como genes relacionados con el metabolismo de los radicales libres, como la NAD (P) H: quinona oxoreductasa 1 (*NQO1*) o con el metabolismo del ácido fólico (*MTHFR*, *TYMS*, *SHMT1*, *MTRR*) (Bolufer *et al.*, 2006).

Parece ser que polimorfismos en tres genes implicados en la reparación del DNA y en el estrés oxidativo (*CYP1A1\*2A*, *del{GSTT1}* y *NQO1\*2*) podrían también asociarse a una mayor predisposición a presentar NMRT, mientras que la ausencia de los mismos disminuiría considerablemente el riesgo (Bolufer *et al.*, 2007).

#### **1.4 Patogenia**

El conocimiento de la patogenia de las NMRT, al igual que el del resto de neoplasias hematológicas, se ha ido modificando durante los últimos años en función de los sucesivos hallazgos en el campo de la genética y la biología molecular, en paralelo con el desarrollo de nuevas tecnologías.

En el estudio de la patogénesis de las NMRT, cabe destacar al grupo danés, liderado por Pedersen-Bjergaard, quienes han publicado a lo largo de los años diversas revisiones sobre este asunto proponiendo finalmente un modelo de leucemogénesis en función de las alteraciones citogenéticas y genes afectados (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1995; 2000; 2002; 2006; 2008). El modelo cuenta con hasta 8 mecanismos diferentes de producción de las NMRT, en función del agente citotóxico empleado previamente, las alteraciones citogenéticas encontradas, la presencia de alteraciones epigenéticas y el tipo de mutación detectada. Así, las mutaciones clase I conferirían una ventaja proliferativa y/o de supervivencia a la célula, y las mutaciones de clase II dificultarían una correcta maduración de la misma (Tabla 2).

Tabla 2. Rutas en la patogenia de las NMRT (Modificado de Pedersen-Bjergaard et al., 2008)

Ruta	Alteraciones cromosómicas	Genes implicados	Enf.	Tratamiento	Mutaciones		
					I	II	Otras
I	-7/7q-		SMD	Alquilantes	<i>AML1</i>		<i>p15</i>
II	-5/5q-		SMD	Alquilantes		<i>TP53</i>	
III	11q23	<i>MLL</i>	LMA	Inhibidores topoisomerasa II (epipodofilotoxinas)		<i>RAS</i> <i>BRAF</i>	
IV	t(8;21) inv(16)	<i>AML1</i> <i>CBFB</i>	LMA	Inhibidores topoisomerasa II (antraciclinas)		<i>c-KIT</i> <i>PTPN 11</i>	
V	t(15;17)	<i>PML/RARA</i>	LMA	Inhibidores topoisomerasa II (antraciclinas)		<i>FLT3</i>	
VI	11p15	<i>NUP98</i>	LMA/SMD	Inhibidores topoisomerasa II			
VII	Cariotipo normal		LMA		<i>RAS</i> <i>FLT3</i>	<i>MLL</i> <i>AML1</i>	
VIII	Varias		SMD				

Posteriormente se han ido desarrollando nuevos modelos más generales para explicar la patogenia de las NMRT entre los que se incluyen: inducción de inestabilidad genómica, inducción directa de la formación de oncogenes de fusión, selección de clones patológicos preexistentes y susceptibilidad individual hereditaria al desarrollo de neoplasias. Estos modelos se detallan a continuación.

#### 1.4.1 NMRT producidas por inducción de inestabilidad genómica

Los tratamientos previos con potencial citotóxico ocasionarían alteraciones que llevarían a una inestabilidad genética y a una posterior adquisición de alteraciones leucemogénicas. En este grupo se incluirían los casos de NMRT que se desarrollan tras la exposición a agentes alquilantes y/o RT. Esto estaría en consonancia con las características descritas en este subgrupo de pacientes, con períodos de latencia largos, entre 2 y 10 años, una fase previa como SMD-t, así como una frecuente presencia de alteraciones genéticas que afectan a los cromosomas 5 y 7.

#### 1.4.2 NMRT producidas por inducción directa de un oncogén de fusión

En esta categoría típicamente se incluirían las NMRT desarrolladas tras la exposición a inhibidores de la topoisomerasa II, lo que favorecería la aparición de

oncogenes de fusión mediante el desarrollo de traslocaciones balanceadas y sus correspondientes genes de fusión, siendo especialmente frecuentes las que implican a genes como *MLL* (11q23) o *RUNX1* (21q22).

Las enzimas del grupo de las topoisomerasas actúan sobre el grado de compactación de la cromatina, favoreciendo los cambios necesarios para la replicación del material genético. La inhibición de las mismas mediante la acción de estos fármacos retrasa la ligación de los extremos del DNA favoreciendo la recombinación del mismo con otro cromosoma (Andersen *et al.*, 1998).

Este grupo de pacientes suele debutar directamente en forma de LMA-t, con períodos de latencia menor (1-5 años) y presentan con alta frecuencia traslocaciones balanceadas similares a las de la LMA *de novo* como la *inv(16)(p13.1;q22)/CBFB/MYH11* o la *t(15;17)(q22;q12-21)/PML/RARA*.

### 1.4.3 Selección clonal

En los últimos años, se ha postulado otra posible forma de explicar el desarrollo de las NMRT. Esta teoría se basaría en la existencia previa de mutaciones en genes como *TP53*, que ya existirían en la célula precursora en el momento en que se diagnostica la enfermedad primera por la que el paciente va a recibir tratamiento con QT y/o RT. Sería este tratamiento el que realizaría una selección clonal, quedando de forma quiescente en la médula ósea las células progenitoras con dichas mutaciones. Estos pacientes serían los que, con períodos de latencia variables, en función del tratamiento recibido, los que finalmente desarrollarían una NMRT (Wong *et al.*, 2015).

Esta teoría vendría apoyada por estudios recientes que han determinado la presencia de células clonales hematopoyéticas en pacientes sanos con potencial intermedio que se acumularía con la edad y que presentarían mutaciones en genes asociados a LMA como *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *JAK2*, *PPM1D*, *TP53*, *SF3B1* o *BCOR* entre otros, denominadas con su acrónimo en inglés (*CHIPs*) (Jaiswal *et al.*, 2014; Genovese *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014; Steensma *et al.*, 2015). Los pacientes portadores de estas células clonales hematopoyéticas tendrían un riesgo incrementado hasta 13 veces superior de desarrollar una enfermedad hematológica maligna que el resto de la población sana, y este riesgo aumentaría todavía más en el contexto de exposición a terapia como sugieren especialmente los portadores de células clonales hematopoyéticas con mutaciones en *TP53* (Wong *et al.*, 2015). Existen ya estudios comparando la frecuencia de *CHIPs* entre pacientes con cáncer

que desarrollan NMRT y los que no la desarrollan. Recientemente se ha publicado una comparación entre estos dos grupos de pacientes, observando que en los pacientes con NMRT, la presencia de *CHIPs* previas se daba hasta en un 62% de los casos (8 de 13 pacientes), comparado con un 27% en pacientes con cáncer que no desarrollan la NMRT (15 de 56 pacientes) con una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0,024$ ). (Gillis *et al.*, 2017)

#### **1.4.4 Susceptibilidad individual hereditaria**

En 2011, se publicó un estudio basado en 2.853 pacientes con LMA. Las LMA-t suponían un 7% del total (200 pacientes) con un periodo de latencia de 4 años desde la exposición a QT y/o RT. Pero en este estudio también detectó que un 3% de los pacientes que habían desarrollado una LMA-t, no habían sido tratados a pesar de padecer una neoplasia previa (especialmente próstata, vejiga y carcinoma renal). Sin embargo, habían desarrollado la LMA-t con un período de latencia en torno a los 5 años. (Kayser *et al.*, 2011) Esto les hizo suponer que estas leucemias deberían estar causadas por una susceptibilidad heredada al desarrollo de neoplasias y sugerían que variantes germinales en las vías de reparación del DNA (genes como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RAD21*, *HLX1*, genes asociados a la anemia de Fanconi o genes con efecto antiapoptótico como *BCL2L10*) podrían aumentar el riesgo de desarrollar una LMA. En la Figura 1 se recogen las propuestas actuales sobre la patogenia de las NMRT (Heuseer *et al.*, 2016).



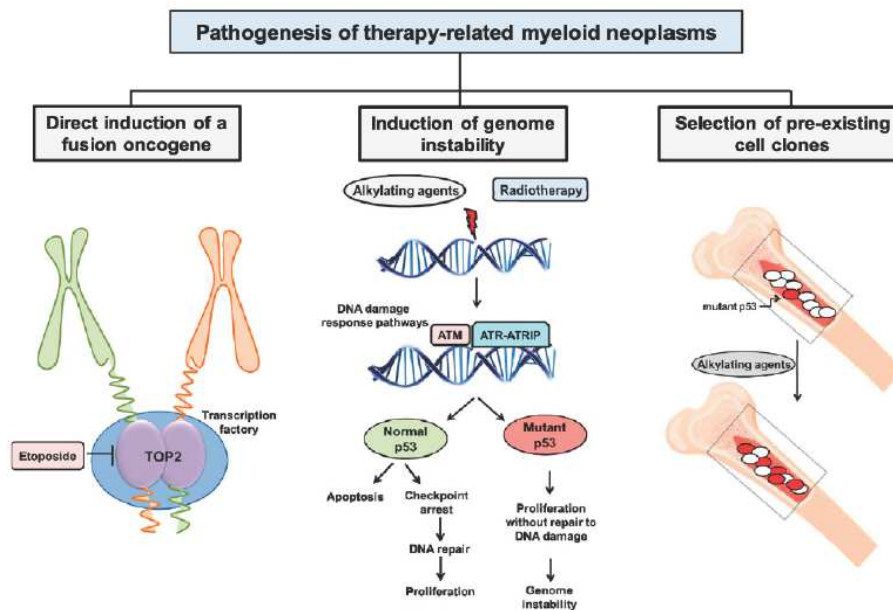


Figura 1. Mecanismos de patogénea de las NMRT (Heuseer *et al.*, 2016).

## 1.5 Clasificación de las NMRT

En la clasificación de la OMS de las neoplasias hematológicas, las NMRT aparecen como categoría independiente por primera vez en el año 1999 (Harris *et al.*, 1999). Previamente los casos secundarios a tratamiento se describían simplemente como LMA, generalmente difíciles de clasificar de acuerdo a las normas del grupo franco-americano-británico (FAB) por la asociación frecuente de displasia trilineal y variabilidad en el porcentaje de blastos (Bennett *et al.*, 1976; Bennett *et al.*, 1985; Michels *et al.*, 1985). Se englobaban dentro de las formas especiales de leucemias agudas no linfoides (LANL), con el añadido de LANL secundarias. Además, varios autores apuntaban también no solo a la dificultad en la clasificación de este subtipo de LMA, si no que algo similar ocurría con los SMD-t, ya que no parecían presentar características comunes a los *de novo*. Presentaban una intensa dishemopoyesis que abarcaba varias líneas celulares pero que no se acompañaba de un alto porcentaje de blastos, siendo clasificados finalmente como SMD de "bajo riesgo", a pesar de las alteraciones morfológicas, citogenéticas y la pobre respuesta al tratamiento de la mayor parte de los pacientes (Le Beau *et al.*, 1986; Kantarjian *et al.*, 1986).

Hasta la clasificación de la OMS de 2001, tanto en la primera como en la posterior revisión de 2008 (Jaffe *et al.*, 2001), las NMRT se subdividían en dos categorías en función de la exposición o bien a agentes alquilantes y/o RT o bien a tratamiento con inhibidores de topoisomerasa II, con las características asociadas previamente descritas. Sin embargo, en la actualidad, los pacientes en muchas ocasiones reciben tratamientos combinados haciendo difícil realizar esta diferenciación. Es más, en la clasificación de la OMS de 2008 así como en la última versión publicada en 2016 se engloban dentro de la misma categoría, sin diferenciarse por el agente empleado previamente (Arber *et al.*, 2008 y Arber *et al.*, 2016). Además, en esta última también se incluyen las NMRT desarrolladas después de la exposición a otro tipo de tratamientos como antimetabolitos que han sido descritas recientemente (Casorelli *et al.*, 2012).

## **1.6 Diagnóstico de las NMRT**

El diagnóstico de NMRT se basa en una historia clínica que revele el antecedente de una exposición a una terapia con QT y/o RT. Aun así, como en el resto de las neoplasias mieloides, debe realizarse un diagnóstico integrado con las técnicas disponibles de citomorfología, citometría de flujo, citogenética y biología molecular.

### **1.6.1 Citomorfología**

Las alteraciones descritas son muy variables y numerosas, no existiendo ninguna característica morfológica específica para las NMRT. Es frecuente la existencia de displasia multilinea, tanto en sangre periférica (SP) como en médula ósea (MO), más asociada a los casos relacionados con la exposición a alquilantes y/o RT pero también se ha descrito tras exposición a otros fármacos (Arber *et al.*, 2002).

En SP suelen observarse una o más citopenias, siendo la anemia la más frecuentemente, aunque también puede haber neutropenia y/o trombocitopenia. En cuanto a los cambios displásicos descritos, en la serie roja, el aumento del volumen corpuscular medio (VCM) es un hallazgo frecuente como signo inicial de alteración morfológica. La displasia observada en neutrófilos suele afectar a la segmentación nuclear, mientras que en la serie plaquetar puede observarse la presencia de micromegacariocitos circulantes.

En cuanto a la MO, la celularidad descrita es variable y hasta en un 15% de los casos se ha descrito mielofibrosis acompañante. La displasia de las tres series es

variable, pero generalmente de grado moderado o grave. El porcentaje de blastos es variable, pero en los pacientes con diagnóstico de SMD-t es frecuente un porcentaje bajo (<5%) hasta casi en la mitad de los pacientes (Czader *et al.*, 2009).

### **1.6.2 Inmunofenotipo**

No existen a día de hoy recomendaciones específicas para el estudio mediante citometría de flujo (CMF) de las NMRT. No las hay para los SMD-t y en el caso de las LMA-t se recomienda la aplicación de los paneles de rutina de la LMA, recordando que se han descrito casos de leucemia secundarias a terapia de línea linfóide B (Andersen *et al.*, 2001).

### **1.6.3 Citogenética**

Se han descrito alteraciones citogenéticas hasta en un 97% de los pacientes con diagnóstico de NMRT, con frecuencias que varían en función de las distintas series entre un 75 - 97% de los casos (Smith *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2011). Los estudios iniciales, llevados a cabo en 67 pacientes mostraron que hasta un 97% de los mismos con NMRT presentaban alteraciones cromosómicas, siendo las más frecuentes las que afectaban a los cromosomas 5 y 7 (Rowley *et al.*, 1977). La mayoría de los estudios posteriores confirmaron estos resultados (Rowley *et al.*, 1981; Le Beau *et al.*, 1986; Mauritzson *et al.*, 2002).

En relación con la citogenética, estudios más amplios, que revisaron un total de 5.098 pacientes, comparando la citogenética de 581 pacientes con LMA-t de un total de 4.230 casos LMA y de 252 pacientes con diagnóstico de SMD-t de un total de 1.629 casos de SMD. En el grupo de las NMRT fueron más frecuentes los cariotipos complejos y las alteraciones de los cromosomas 5 y 7 entre otras. La distribución de las alteraciones y su comparativa con los casos *de novo* se muestra en la Figura 2 (Mauritzson *et al.*, 2002).

<i>Abnormality</i>	<i>MDS de novo (n=1377)</i>	<i>t-MDS (n=252)</i>	<i>p-value</i>
-5	6.7	16.0	<0.001
-7	12.0	35.0	<0.001
sole -7	5.7	12.0	<0.001
7q-	5.0	9.9	0.005
loss of 5 and/or 7	45.0	70.0	<0.001
13q-	1.7	4.0	0.03
der(17p)	4	7	0.02
complex	24	39	<0.001

<i>Abnormality</i>	<i>AML de novo (n=3649)</i>	<i>t-AML (n=581)</i>	<i>p-value</i>
3p-	0.9	2.9	<0.001
-5	4.2	13.0	<0.001
5q-	6.8	13.0	<0.001
-7	9.3	29.0	<0.001
sole -7	3.1	8.8	<0.001
7q-	4.0	6.2	0.02
der(1;7)	0.2	2.1	<0.001
loss of 5 and/or 7	20.0	49.0	<0.001
der(12p)	4.2	6.4	0.02
-17	4.7	9.1	<0.001
der(17p)	2.9	6.2	<0.001
-18	3.5	6.9	<0.001
-21	2.5	7.1	<0.001
t(1;3)(p36;q21)	0.1	0.5	0.02
t(9;11)(p22;q23)	1.8	6.0	<0.001
t(11;19)(q23;p13)	0.4	2.4	<0.001
t(11q23)	3.9	12.0	<0.001
complex	23.0	40.0	<0.001

**Figura 2. Incidencia de alteraciones cromosómicas en NMRT comparado con casos de novo (Mautitzson *et al.*, 2002).**

Posteriormente, de nuevo el grupo de Chicago, publicó una revisión sobre las alteraciones citogenéticas en pacientes con NMRT tras analizar las principales características clínica y biológicas de 306 pacientes con este diagnóstico (Smith *et al.*, 2003). El 56% de los pacientes (n = 171) habían sido tratados por una neoplasia hematológica previa (EH, LNH y MM principalmente), el 38% de los casos (n = 117)

por un tumor sólido (mama, próstata y ovario mayoritariamente) y finalmente un 6% de los enfermos (n = 18) habían recibido la terapia por otras enfermedades, principalmente de naturaleza autoinmune. Un 40% de los casos (n = 121) recibieron únicamente QT como tratamiento previo, un 14% de los pacientes habían sido tratados solo con RT (n = 43) mientras que un 46% de los casos (n = 139) habían recibido tratamientos combinados. La forma de presentación más frecuente fue como SMD-t en un 73% de los pacientes (n = 220), aunque 96 de los mismos evolucionaron a LMA-t, con una mediana de tiempo de latencia de 65 meses (rango, 39 - 110); el 27% restante (n = 74) debutaron directamente como LMA-t con una mediana de tiempo de latencia de 54 meses (28-88). El análisis de las anomalías citogenéticas mostró que hasta un 92% de los pacientes presentaba algún tipo de alteración clonal (n = 282) mientras que un 8% de los casos (n = 24) presentaba una dotación cromosómica normal. Las principales alteraciones encontradas fueron las que afectaban a los cromosomas 5 y 7 detectada hasta en un 70% de los casos. La alteración estructural más frecuente fue la pérdida del brazo largo del cromosoma 5 que se presentó hasta en un 19% de los pacientes (n = 59) y la monosomía más frecuente fue la pérdida completa del cromosoma 7 detectado hasta en un 33% de los casos (n = 102). Hasta un 10% de los pacientes (n = 31) presentó una traslocación balanceada, siendo las más frecuentes las que afectaban a las regiones 11q23 y 21q22 así como la t(15;17) y la *inv*(16). La distribución de las alteraciones se muestra en la Figura 3.

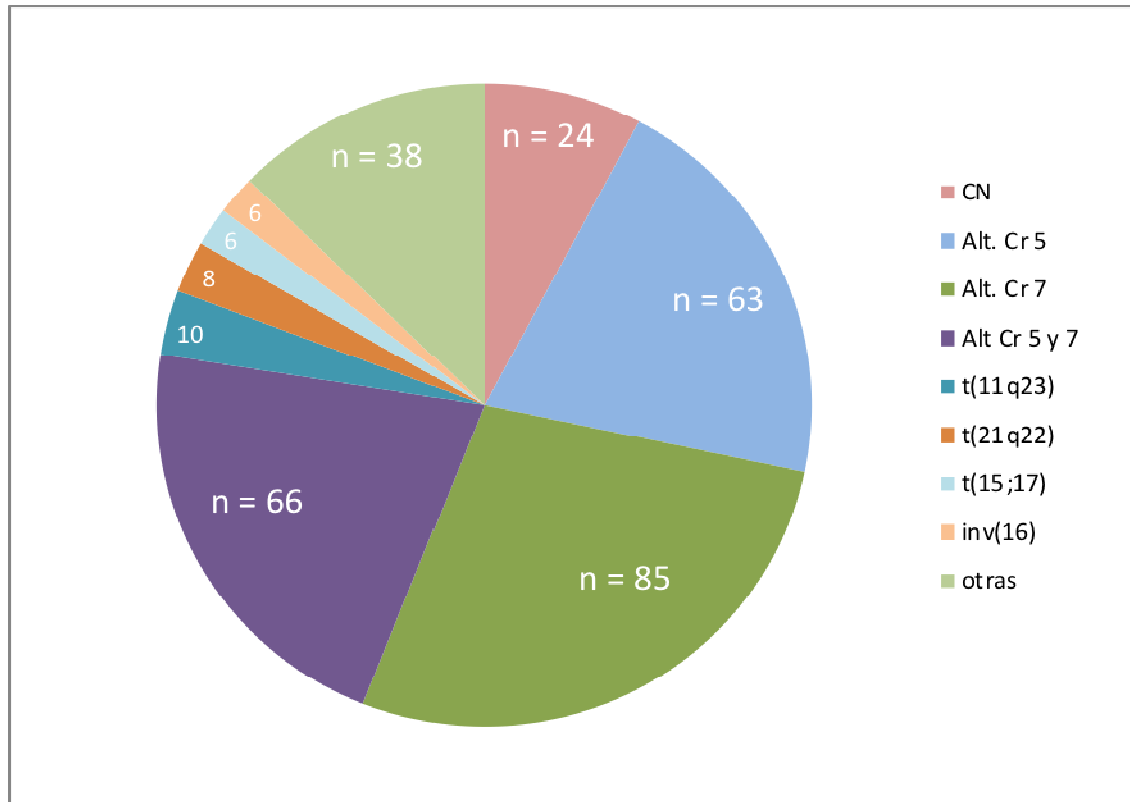


Figura 3. Alteraciones citogenéticas en 306 casos de NMRT. Modificado de Smith *et al.*, 2003.

En el año 2011, se realizó una comparativa entre pacientes con diagnóstico de LMA-t y pacientes con LMA *de novo*, pertenecientes al grupo germano-austriaco para el estudio de la LMA. Se analizaron un total de 2.853 pacientes, de los cuales, un 7% (n = 200) presentaban una LMA-t con hallazgos citogenéticos en consonancia con lo publicado previamente. Estos pacientes también presentaban un aumento de cariotipos alterados respecto al grupo de LMA *de novo* (75% vs. 51%; P< 0,001), con un alta prevalencia de alteraciones citogenéticas consideradas de alto riesgo como las alteraciones de los cromosomas 5 y 7 (-5/5q-, -7/7q-), t(9;11), alteraciones de 17p, cariotipos complejos y cariotipo monosómico comparado con las LMA *de novo* (39% vs. 19%; P<0,001). Sin embargo, las alteraciones consideradas de buen pronóstico tuvieron una representación similar en ambos grupos (16% vs. 16%; P= 0,999), y las clasificadas dentro del grupo de riesgo intermedio estaban infrarrepresentadas en el grupo de las LMA-t (46% vs. 65%; P< 0,001). La distribución de las alteraciones citogenéticas de la serie y su comparación con el grupo de LMA *de novo* se muestran en la Figura 4 (Kayser *et al.*, 2011).

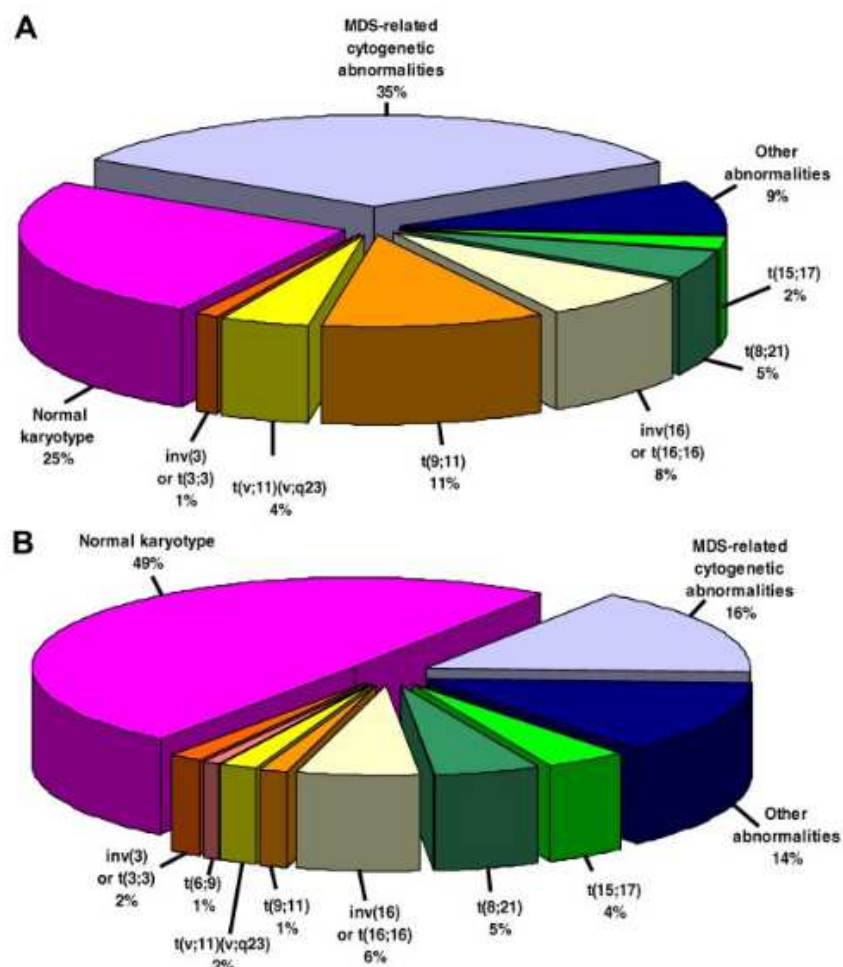


Figura 4. Distribución de alteraciones citogenéticas. A) LMA-t; B) LMA *de novo* (Kayser *et al.*, 2011).

### 1.6.4 Biología molecular

Desde hace años el estudio de mutaciones en determinados genes es parte de la rutina habitual en el diagnóstico de las neoplasias mieloides, dada su implicación en el desarrollo de estas enfermedades malignas. La información sobre el perfil mutacional de los pacientes es necesaria para establecer un pronóstico, además de constituir un elemento fundamental para el seguimiento de las diversas entidades como biomarcador de enfermedad residual. De ello deriva su uso en los modernos algoritmos de decisión terapéutica, en la selección de pacientes candidatos a trasplante hematopoyético (TPH), así como en el progresivo desarrollo de tratamientos dirigidos a dianas moleculares.

El número de genes con potencial implicación en la patogénesis de estas enfermedades no ha parado de crecer en los últimos años, especialmente debido al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación (NGS), que dada su capacidad para analizar el estado de múltiples genes en un único experimento y su mayor sensibilidad, está desplazando a la clásica secuenciación por Sanger en el abordaje del estudio de estos pacientes.

Inicialmente se postulaba la existencia de diferentes tipos de mutaciones implicadas en la leucemogénesis que cooperaban entre sí para el desarrollo de la enfermedad; las mutaciones de clase I, que afectaban a genes implicados en la proliferación celular y consideradas de aparición tardía en el proceso de la leucemogénesis como los pertenecientes a la vía tirosín kinasa-RAS-BRAF como *FLT3-ITD (internal tandem duplication)*, *cKIT*, *JAK2*, *NRAS*, *KRAS*, *BRAF* o *PTPN11*, y las mutaciones de clase II, que afectaban a genes relacionados con la diferenciación celular, esencialmente factores de transcripción como *RUNX1*, *CBPB*, *KMT2A*, *RARA*, *EVI1*, *NPMP1* o *CEBPA*. Se incluyó como una tercera clase las mutaciones en gen supresor de tumores *TP53* (Deguchi *et al.*, 2002). Recientemente, se han descrito 8 categorías funcionales de genes frecuentemente alterados en LMA y por tanto implicados en su desarrollo (Döhner *et al.*, 2015) (Figura 5).



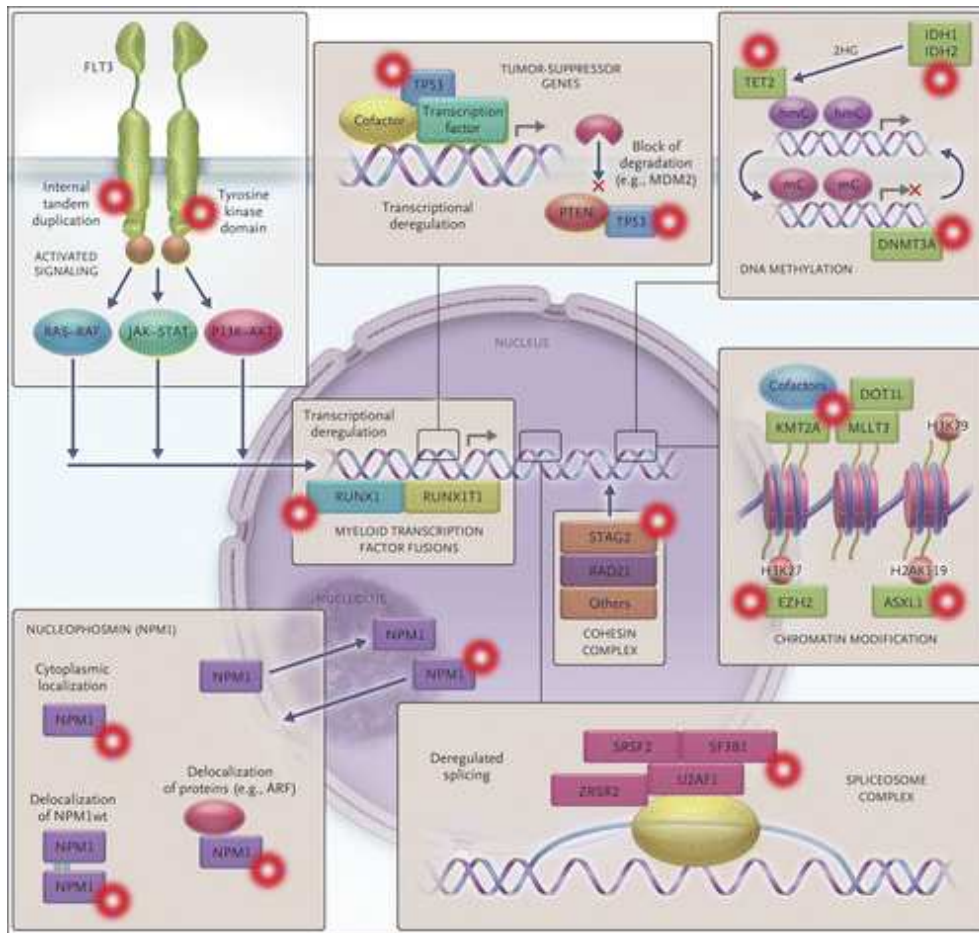


Figura 5. Categorías funcionales de genes con potencial leucemógeno (Döhner *et al.*, 2015).

En el caso de las NMRT, el grupo incluyó el estudio de alteraciones moleculares relacionándolos con la vía de producción de la NMRT como se ha expuesto previamente, abordando el papel de alteraciones en genes supresores de tumores como *TP53*, genes con acción tirosín-kinasa como *FLT3* o *JAK2*, genes implicados en la vía de transmisión de señales *RAS/BRAF*, así como las alteraciones relacionadas con factores de transcripción, valorando su frecuencia en pacientes con NMRT y su comparación con las enfermedad mieloide *de novo* (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2002; Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2007; Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2008). En general, destacaba la alta frecuencia de mutaciones en *TP53* tanto en los SMD-t como en las LMA-t, así como una mayor frecuencia de mutaciones puntuales en *AML1* en los pacientes con SMD-t. Los resultados se obtuvieron tras analizar a 140 pacientes con diagnóstico de NMRT (51 pacientes LMA-t y 89 SMD-t), detectándose alteraciones en el 72% de los casos (102 alteraciones en 129 pacientes). Los datos más relevantes pueden observarse en las Tablas 3 y 4. En la primera se realiza una comparativa entre

las diferentes alteraciones tanto mutaciones puntuales como reordenamientos quiméricos entre los pacientes con enfermedad mieloide *de novo* y los pacientes con NMRT mientras que en la segunda se muestran los datos más relevantes sobre las mutaciones puntuales detectadas en este grupo de pacientes. (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2008).

**Tabla 3. Frecuencia de alteraciones en pacientes con SMD y LMA *de novo* respecto a los pacientes con diagnóstico de NMRT (Modificado de Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2007)**

Función génica	Gen	SMD <i>de novo</i> (%)	SMD-t (%)	LMA <i>de novo</i> (%)	LMA-t (%)
Supresor tumoral	<i>TP53</i> <sup>1</sup>	5 - 10	28	10 - 15	18
Tirosín-Kinasa	<i>FLT3-ITD</i>	raro	raro	35 - 50	10
	<i>JAK2</i> <sup>1</sup>	2 - 5	2 - 5	raro	raro
Vía RAS/BRAF	<i>KRAS/NRAS</i> <sup>1</sup>	10	10	10	10
	<i>PTPN11</i> <sup>1</sup>	3 - 5	3 - 5	3 - 5	3 - 5
F. Transcripción	<i>CEBPA</i> <sup>1</sup>	raro	raro	15 - 20	Raro

<sup>1</sup> Mutaciones puntuales <sup>2</sup> Reordenamiento quimérico

**Tabla 4. Frecuencia de mutaciones en 140 pacientes con NMRT . (Modificado de Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2008).**

Gen	LMA-t (51)	SMD-t (89)	NMRT (140)
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>TP53</i>	9 (18)	25 (28)	34 (24)
<i>FLT3</i> <sup>1</sup>	10 (20)	1 (1)	11 (8)
<i>NPM1</i>	7 (14)	3 (4)	10 (7)
<i>NRAS/KRAS</i>	7 (14)	7 (8)	14 (10)
<i>PTPN11</i>	2 (4)	2 (2)	4 (3)
<i>AML1</i> <sup>2</sup>	2 (4)	20 (22)	22 (16)
<i>JAK2</i>	0	2 (2)	2 (1)
<i>BRAF</i>	3 (6)	0	3 (2)
<i>MLL</i>	1 (2)	1 (1)	2 (1)

<sup>1</sup> Duplicaciones internas en tándem y mutaciones puntuales <sup>2</sup> *RUNX1*

Estudios posteriores abordaron también la frecuencia de alteraciones génicas en pacientes con LMA-t comparado con LMA *de novo* pero centrándose en los genes con implicación directa en la estrategia terapéutica de este tipo de enfermedades como son *FLT3* y *NPM1*. Estudiaron a 200 pacientes con diagnóstico de LMA-t y los

compararon con 2.653 pacientes con LMA *de novo*. En los pacientes con muestra disponible para estudios moleculares, determinaron una menor frecuencia de mutaciones en *FLT3-ITD* y *NPM1* en los pacientes con LMA-t comparado con el grupo LMA *de novo* (12% vs. 24%, P= 0,005; 16% vs. 30%, respectivamente; P<0,001) (Tabla 5). Sin embargo, cuando seleccionaban únicamente los casos con cariotipo normal, esta diferencia desaparecía. Además, estudiaron las mutaciones en *CEBPA* y duplicaciones parciales en tándem en *MLL* en los pacientes con cariotipo normal, sin tampoco encontrar diferencias entre las LMA-t y LMA *de novo* (7% vs. 11%; 7% vs. 7%, respectivamente)(Kayser *et al.*, 2011).

**Tabla 5. Frecuencia de mutaciones de FLT3 y NPM1 en pacientes con LMA-t. (Modificado de Kayser *et al.*, 2011).**

Gen	N (%)
<i>FLT3-ITD</i>	17 (12)
<i>FLT3-TKD</i>	12 (9)
<i>NPM1</i>	24 (16)

Un reciente estudio realizado en un grupo de 38 pacientes con diagnóstico de NMRT, 6 pacientes con diagnóstico de LMA-t y 32 con diagnóstico de SMD-t, analizó mediante secuenciación por Sanger la presencia de mutaciones en *TP53*, *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *EED*, *SUZ12*, *RBBP4*, *SRSF2*, *U2AF35* y *SF3B1*. Los genes fueron seleccionados por los autores por su frecuencia y papel en las neoplasias mieloides *de novo*. Se encontraron mutaciones en 8 de los 13 genes analizados en el 42% de los casos (16 de los 38 pacientes), presentando 4 de ellos más de una mutación somática concomitante. Las mutaciones más frecuentes se dieron en *TP53* y *TET2* con unas frecuencias de un 21% (8 de 38 pacientes) y un 11% (4 de 38 pacientes), respectivamente. En el resto de los genes la frecuencia fue menor al 10%. No se encontraron mutaciones en *SF3B1*, lo que según los autores podría estar justificado por la ausencia de pacientes con sideroblastos anillados. La frecuencia de alteraciones de los distintos genes se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Frecuencia de mutaciones en 38 pacientes con NMRT. (Modificado de Shih *et al.*, 2013).

Gen	LMA-t (6)	SMD-t (32)	NMRT (38)
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>TP53</i>	2 (33)	6 (19)	8 (21)
<i>TET2</i>	1 (17)	3 (9)	4 (11)
<i>DNMT3A</i>	1 (17)	2 (6)	3 (8)
<i>SRSF2</i>	2 (33)	1 (3)	3 (8)
<i>EZH2</i>	1 (17)	0	1 (3)
<i>IDH1</i>	1 (17)	0	1 (3)
<i>ASXL1</i>	0	1 (3)	1 (3)
<i>U2AF35</i>	0	1 (3)	1 (3)

Dada la baja frecuencia de mutaciones en el resto de genes, el estudio únicamente fue capaz de encontrar asociaciones con significación estadística en los pacientes con mutaciones en *TP53*, donde se observó una mayor frecuencia de cariotipos complejos, definidos como los cariotipos con 3 o más alteraciones (91% de los casos;  $P < 0,01$ ) y con alteraciones en el cromosoma 5, tanto monosomías como deleciones del brazo largo (83% de los casos;  $P < 0,01$ ). En cuanto a los estudios de supervivencia, el grupo de pacientes con alteración en *TP53* presento una mediana de supervivencia menor que el grupo no mutado (9 meses vs. 37 meses;  $P = 0,004$ ). (Shih *et al.*, 2013).

Otro grupo, en este mismo año, abordó también el estudio de mutaciones en 77 pacientes con diagnóstico de LMA-t mediante el empleo de secuenciación por Sanger, centrándose en el análisis de las regiones *hot spot* de genes implicados en la regulación epigenética como *IDH1*, *IDH2* y *DNMT3A* y genes relacionados con los procesos de *splicing*, como *U2AF1*, *SF3B1* y *SRSF2*. Esto se justificaba por la búsqueda de marcadores que pudieran ayudar a comprender mejor este subgrupo de patología dada la baja frecuencia de mutaciones de los genes normalmente afectados en pacientes con LMA *de novo*. Entre los genes implicados en la regulación epigenética, la frecuencia de mutaciones osciló entre un 3% a un 5%, presentando un paciente de manera concomitante mutaciones en *IDH2* y *DNMT3A*. En cuanto a los genes implicados en el *splicing*, se detectaron mutaciones en *SF3B1* y *SRSF2* en el 4% y 10% de los pacientes, respectivamente. Sin embargo, no se encontraron mutaciones en *U2AF1* (Tabla 7) (Voso *et al.*, 2013).

Tabla 7. Frecuencia de mutaciones en 77 pacientes con LMA-t (Modificado de Voso *et al.*, 2013).

Gen	LMA-t (77) N (%)
<i>IDH1</i>	3 (4)
<i>IDH2</i>	2 (3)
<i>DNMT3A</i>	4 (5)
<i>SF3B1</i>	3 (4)
<i>SRSF2</i>	8 (10)
<i>U2AF1</i>	0

Con el desarrollo de las nuevas tecnologías, especialmente gracias al desarrollo de las técnicas de NGS, se ha podido avanzar notablemente en el conocimiento del perfil molecular de las NMRT. Entre los primeros estudios realizados mediante el empleo de estas técnicas, encontramos un grupo que realizó la secuenciación genómica completa de 23 pacientes con LMA-t y los comparó con los resultados publicados del genoma de 24 casos de LMA *de novo*. En el grupo de las LMA-t se identificaron alteraciones en al menos 20 genes, muchas de las cuales también se encontraban en el otro grupo. Destacó la frecuencia de mutaciones en genes como *TET2*, alterado en un 35% de los casos de LMA-t, siendo el gen con mayor frecuencia de alteraciones, a diferencia de lo publicado previamente por otro grupo, quienes tras analizar la frecuencia de mutaciones de este gen en 46 pacientes con LMA-t únicamente lo detectaron alterado en un 8% de los casos. (Kosminder *et al.*, 2011). Por otro lado, los autores destacaron el hallazgo de alteraciones en el gen *ABCG2* (2/23 pacientes, 9%), a diferencia del grupo de LMA *de novo* donde no se detectaron alteraciones (P=0,01). Este hallazgo es relevante por su papel como gen implicado en la resistencia a determinados agentes quimioterápicos. (Ramsingh *et al.*, 2012).

Posteriormente, empleando también tecnología de NGS, otro grupo analizó el perfil mutacional de 70 pacientes con NMRT (42 LMA-t y 28 SMD-t) y los compararon con 428 pacientes con diagnóstico de SMD y LMA *de novo* (281 LMA y 147 SMD) mediante el empleo de un panel comercial diseñado para cubrir las regiones *hotspot* de 53 genes empleando la tecnología de NGS de Miseq de Illumina. Los genes

analizados fueron *ABL1*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *DNMT3A*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *EZH2*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *JAK3*, *KDR*, *KIT*, *KLHL6*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MPL*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53*, *VHL* y *XPO1*. En el grupo de los pacientes con NMRT, se encontraron alteraciones en un 59% de los casos, que afectaban a 13 de los 53 genes estudiados, sin encontrar diferencias con el grupo de patología *de novo*. En este último grupo, un 57% de los pacientes presentaron alguna alteración afectando a 17 de los genes analizados ( $P=0,08$ ). Entre los pacientes con NMRT, los pacientes con diagnóstico de LMA-t presentaron una mayor frecuencia de mutaciones que los pacientes con SMD-t (71% vs. 39%;  $P=0,013$ ). En el caso de los pacientes con LMA-t se detectaron mutaciones en un 71% de los pacientes (30 pacientes de los 42) afectando a 13 genes, siendo el más frecuente *TP53* en un 36% de los casos. El resto de genes alterados fueron *PTPN11* en un 12%, *IDH1*, *IDH2* y *NRAS* en un 10%, *FLT3* y *DNMT3A* en un 7%, *KRAS* en un 5%; el resto de genes presentaron porcentajes inferiores al 3% como *KIT*, *NPM2* o *APC*. Los pacientes con SMD-t presentaron un 39% de mutaciones (11 pacientes de los 28 diagnosticados), que afectaron únicamente a dos genes, *TP53*, en un 36% de los casos, e *IDH1*, en un 4% de los pacientes. En la Tabla 8 se muestran los porcentajes respecto a la serie global de las 70 NMRT analizadas (Ok *et al.*, 2015).

**Tabla 8. Frecuencia de mutaciones en 70 pacientes con NMRT. (Modificado de Ok *et al.*, 2015)**

Gen	LMA-t (42)	SMD-t (28)	NMRT (70)
	N (%)	N (%)	N (%)
<b><i>TP53</i></b>	15 (36)	10 (36)	25 (36)
<b><i>PTPN11</i></b>	5 (12)	0	5 (7)
<b><i>IDH1</i></b>	4 (10)	1 (4)	5 (7)
<b><i>IDH2</i></b>	4 (10)	0	4 (6)
<b><i>NRAS</i></b>	4 (10)	0	4 (6)
<b><i>FLT3</i></b>	3 (7)	0	3 (4)
<b><i>DNMT3A</i></b>	3 (7)	0	3 (4)
<b><i>KRAS</i></b>	2 (5)	0	2 (3)

Comparando estos datos con la contrapartida de NMRT *de novo*, en el caso de los SMD-t la frecuencia de mutaciones fue similar, aunque se detectaron menos genes alterados que en los casos *naïve*, 2 vs. 15 ( $P=0,002$ ), aunque la frecuencia de mutaciones en el caso de *TP53* fue mayor en los SMD-t (36% vs. 18%;  $P=0,042$ ). En el caso de las LMA-t, la frecuencia de mutaciones fue similar en ambos grupos (71% vs. 66%), aunque destacaba la mayor frecuencia de mutaciones de *TP53* en las LMA-t (36% vs. 13%;  $P=0,002$ ) y *PTPN11* (12% vs. 2%;  $P=0,008$ ), así como una menor frecuencia de alteraciones en *FLT3* (7% vs. 22%;  $P=0,04$ ) y de *NPM1* (3% vs. 16%;  $P=0,017$ ). En cuanto al estudio del cariotipo tanto los pacientes con SMD-t como con LMA-t presentaron cariotipos de alto riesgo comparado con los pacientes *de novo* ( $P<0,001$ ). En el estudio no se analizaron parámetros de supervivencia. Los autores concluyeron que el perfil mutacional de los pacientes con NMRT era diferente de los pacientes *naïve* dada la mayor frecuencia de mutaciones en *TP53* y *PTPN11* y una menor frecuencia de alteraciones en *FLT3* y *NPM1*. (Ok *et al.*, 2015)

En este mismo año, otro grupo abordó el estudio del perfil mutacional de un grupo de pacientes con diagnóstico de NMRT mediante tecnología de NGS, empleando un Illumina HiSeq 2000, con el que analizaron 82 genes seleccionados por su potencial implicación en la patogénesis de las neoplasias mieloides, como genes implicados en el control del *splicing* (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1* o *ZRSR2*), modificadores de cromatina (*ASXL1*, *EZH2* o *BCOR*), genes del sistema de cohesina (*STAG2*, *SMC3* o *RAD21*, entre otros), factores de transcripción (*RUNX1* o *CEBPA*), activadores de señales (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *NF1* o *FLT3*, entre otros), así como genes implicados en la metilación del DNA (*DNMT3A*, *TET2* o *IDH1/2*). Además de los genes pertenecientes a estos grupos funcionales, también se incluyeron en el estudio genes como *TP53*, *SETBP1*, *WT1* y *NPM1*. Se analizó la frecuencia de mutaciones en 101 pacientes con diagnóstico de LMA-t y 93 casos de LMA secundaria a síndrome mielodisplásico y se comparó con 105 pacientes con diagnóstico de LMA *de novo* con el objetivo de determinar un perfil mutacional propio de estos pacientes. (Lindsley *et al.*, 2015). En primer lugar, analizaron los pacientes con LMA secundaria a SMD y tras compararlos con los casos *de novo* fueron capaces de distribuirlos en varios grupos en función de su perfil mutacional. En un primer grupo, agruparon aquellos casos que ellos denominaron portadores de mutaciones secundarias o *secondary-type*, definidas como las mutaciones que afectaban a 8 genes frecuentemente alterados en pacientes con SMD como *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* y *STAG2* y que en el caso de estas LMA secundarias a SMD eran mucho más frecuentes que en los pacientes con LMA *de novo* de forma estadísticamente significativa. En segundo

lugar, agruparon a los pacientes que presentaban lo que los autores denominaron alteraciones *de novo* por presentarse de forma más frecuente en estos pacientes, como fueron alteraciones en *NPM1* ( $P < 0,001$ ), reordenamientos de *MLL/11q23* ( $P < 0,001$ ) y reordenamientos CBF (*core binding factor*) ( $P < 0,001$ ). Un tercer grupo lo formaron los pacientes con alteraciones en *TP53* por su asociación con cariotipos complejos ( $P < 0,001$ ) y una menor supervivencia global (SG) ( $P = 0,044$ ). Finalmente, el resto de mutaciones se englobaron en un grupo denominado pan-LMA. Tras este estudio inicial los autores proponen la distribución de los pacientes en tres grandes en grupos en función de la presencia de mutaciones *secondary-type*, mutaciones en *TP53* o bien presencia de mutaciones *de novo*/pan-LMA. Posteriormente, aplicaron esta clasificación a los pacientes con LMA-t, basándose en que se podría definir a los pacientes por su perfil mutacional, más que por el hecho tan heterogéneo de haber sido expuestos a tratamiento previo. Se detectaron mutaciones en un 97% de los casos (98 de los 101 pacientes) que, de acuerdo a la clasificación mencionada anteriormente, los pacientes con LMA-t presentaban mutaciones *secondary-type* en un 33% de los casos (34 de 101 pacientes), un 23% presentaban alteraciones en *TP53* (23 de 101 pacientes), mientras que un 47% presentaban alteraciones de las incluidas en el grupo *de novo*/pan-LMA (47 de 101 pacientes). En la Tabla 9 se muestra en número de mutaciones encontradas por gen, algunos pacientes presentaron mutaciones concomitantes aunque sin poder establecer asociaciones con potencia estadística entre ellas (Lindsley *et al.*, 2015).

**Tabla 9. Mutaciones detectadas por NGS en 101 pacientes con LMA-t. (Modificado de Lindsley *et al.*, 2015).**

Subtipo genético		LMA-t (101) N (%)
<b>Splicing</b>	<b><i>SRSF2</i></b>	11 (11)
	<b><i>U2AF1</i></b>	5 (5)
	<b><i>SF3B1</i></b>	3 (3)
	<b><i>ZRZR2</i></b>	1 (1)
<b>Modificadores de la Cromatina</b>	<b><i>ASXL1</i></b>	17 (17)
	<b><i>EZH2</i></b>	3 (3)
	<b><i>BCOR</i></b>	1 (1)
<b>Complejo de la Cohesina</b>	<b><i>STAG2</i></b>	6 (6)
	<b><i>SMC3</i></b>	2 (2)
	<b><i>RAD21</i></b>	4 (4)
<b>Factor de transcripción</b>	<b><i>RUNX1</i></b>	11 (11)
	<b><i>CEBPA</i></b>	5 (5)



Subtipo genético		LMA-t (101) N (%)
<b>mieloide</b>		
	<i>NRAS</i>	13 (13)
	<i>KRAS</i>	11 (11)
	<i>PTPN11</i>	9 (9)
	<i>NF1</i>	4 (4)
<b>Activadores vía señalización</b>	<i>CBL</i>	4 (4)
	<i>KIT</i>	2 (2)
	<i>FLT3</i>	16 (16)
	<i>DNMT3A</i>	27 (27)
<b>Metilación DNA</b>	<i>TET2</i>	14 (14)
	<i>IDH1/2*</i>	17 (17)
	<i>WT1</i>	3 (3)
	<i>PHF6</i>	1 (1)
<b>Genes supresores tumores</b>	<i>TP53</i>	23 (23)
	<i>SETBP1</i>	3 (3)
	<i>NPM1</i>	16 (16)

El análisis del resto de parámetros clínicos en los pacientes con LMA-t mostró una mayor concordancia entre los pacientes con un perfil de mutaciones similar según la distribución realizada por los autores. En los pacientes con mutaciones de tipo *secondary-type*, fue más frecuente la existencia de un período previo como SMD-t comparado con el grupo *de novo/pan-LMA* (29% vs. 9%; P= 0,019), además eran pacientes de mayor edad (63 vs. 53 años; P= 0,002), y por tanto, una mayor similitud clínica al grupo de LMA secundaria a SMD. Además, había un predominio de pacientes de sexo masculino y presentaban un mayor número de mutaciones conductoras (“*drivers*”) por paciente, así como mayor número de alteraciones de los cromosomas 5 y 7. En cambio, los pacientes con LMA-t encuadrados en el grupo de mutaciones *de novo/pan-LMA* eran más semejantes al grupo control de LMA *de novo*, siendo más común en pacientes más jóvenes. Finalmente, los pacientes con mutaciones en *TP53* parecían presentar mayor frecuencia de cariotipos complejos con alteraciones de los cromosomas 5 y 7 asociándose además a una menor supervivencia global. Los autores concluyeron con estos hallazgos que la exposición a un tratamiento previo no definiría un grupo genéticamente diferente y que sería más apropiada la clasificación de los pacientes en función de su perfil mutacional en lugar de sus antecedentes médicos. Además, salvo la relación entre el uso de inhibidores de

topoisomerasa II y los reordenamientos de *MLL* tampoco fueron capaces de asociar alteraciones moleculares concretas a tratamientos definidos.

## 1.7 Factores pronóstico de las NMRT

Los algoritmos destinados a establecer el pronóstico de los pacientes con LMA o SMD *de novo* incluyen variables diferentes, entre las que la citogenética y el perfil mutacional tienen un impacto relevante. En el caso de los pacientes con LMA *de novo*, pueden definirse factores de riesgo pre-tratamiento vinculados al paciente (edad, comorbilidades, enfermedades hematológicas o tratamientos previos entre otros), así como factores de riesgo relacionados con las alteraciones citogenéticas y moleculares de las células malignas. Por otro lado, se encuentran factores de riesgo post-tratamiento, que hacen referencia a calidad de la respuesta al tratamiento determinada mediante la valoración de la enfermedad residual mínima mediante técnicas basadas en la citometría de flujo o en técnicas moleculares como la PCR en tiempo real (Dohner *et al.*, 2017).

En la LMA, los algoritmos para la toma de decisiones terapéuticas se han basado principalmente en las alteraciones citogenéticas presentes en las células leucémicas. En este sentido, han sido varias las clasificaciones basadas en estos hallazgos que distribuyen a los pacientes en diversos grupos de riesgo. Distintos grupos cooperativos han propuesto diferentes sistemas de clasificación pronóstica [Southwest Oncology Group (SWOG), Medical Research Council (MRC) y Cancer and Leukemia Group B (CALGB)] en los últimos 15 años, basándose en la supervivencia de pacientes incluidos en grandes ensayos clínicos prospectivos (Byrd *et al.*, 2002; Grimwade *et al.*, 1998; Grimwade *et al.*, 2010, Slovak *et al.*, 2000). El hecho de incluir poblaciones diferentes que además recibieron tratamientos variados podría justificar las diferencias existentes en cuanto a estratificación pronóstica. No obstante, todos ellos parecen coincidir en agrupar a los pacientes en tres grandes grupos de riesgo citogenético: favorable, intermedio y desfavorable, con distinta probabilidad de recaída y de supervivencia (Tabla 10).

Tabla 10. Sistemas de estratificación del riesgo citogenético en LMA.

Grupo de riesgo	SWOG/ECOG	CALGB	MRC (2010)
<b>Favorable</b>	t(15;17), t(8;21), inv(16)/t(16;16)/del(16q)	t(8;21), inv(16)/t(16;16)	t(15;17)(q22;q21), t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/ t(16;16)(p13;q22)
<b>Intermedio</b>	Normal, +8, +6, -Y, del(12p)	Normal, -Y, del(5q), t(6;9), t(6;11), - 7/del(7q), +8 aislada o con otra anomalía, del(9q), t(9;11), +11, del(11q), t(11;19)(q23;p13), +13, del(20q), +21	Anomalías no clasificadas como favorable o desfavorable
<b>Desfavorable</b>	abn(3q), -5/del(5q), - 7/del(7q), t(6;9), t(9;22), 9q, 11q, 20q, 21q, 17p, complejo (≥ 3 anomalías no relacionadas)	inv(3)/t(3;3), abn(12p), complejo (≥ 3 anomalías no relacionadas)	abn(3q)[excepto t(3;5)(q21- 25;q31-35)], inv(3)(q21q26)/t(3;3), add(5q)/del(5q)/-5, add(7q)/del(7q)/-7, t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p11- 13;q23), t(11q23)[excepto t(9;11)(p21-22;q23) y t(11;19)(q23;p13), t(9;22)(q34;q11), - 17/abn(17p), complejo (≥ 4 anomalías no relacionadas)
<b>Desconocido</b>	Cualquier otra anomalía	No aplicable	No aplicable

MRC: *Medical Research Council* (Grimwade *et al.*, 1998; Grimwade *et al.*, 2010); SWOG/ECOG: *Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group* (Slovak *et al.*, 2000); CALGB: *Cancer and Leukemia Group B* (Byrd *et al.*, 2002).

Recientemente, la European Leukemia Net (ELN) ha propuesto una clasificación pronóstica en la que se integran las alteraciones citogenéticas y moleculares más relevantes (Tabla 11) (Döhner *et al.*, 2017).

Tabla 11. Clasificación pronóstica de la ELN (Döhner *et al.*, 2017)

GRUPO PRONÓSTICO	ALTERACIONES CITOGENÉTICO/MOLECULARES
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> <sup>bajo*</sup> (cariotipo normal) <i>CEBPA</i> mutación bialélica (cariotipo normal)
<b>Intermedio</b>	<i>NPMP1</i> mutado con <i>FLT3-ITD</i> <sup>alto**</sup> <i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> <sup>bajo*</sup> (sin alteraciones citogenéticas de riesgo adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Otras alteraciones citogenéticas no reportadas como favorables o adversas
<b>Adverso</b>	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> reordenado t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> Monosomía 5 o del(5q); monosomía 7; monosomía 17/alteraciones(17p) Cariotipo complejo <sup>§</sup> ; Cariotipo monosómico <sup>  </sup> <i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> <sup>alto**</sup> <i>RUNX1</i> mutado <sup>1</sup> <i>ASXL1</i> mutado <sup>1</sup> <i>TP53</i> mutado

\* ratio alélico de FLT3-ITD bajo (<0,5) ratio alélico de FLT3-ITD alto (≥0,5).

§ Tres o más alteraciones cromosómicas no relacionadas en ausencia de las alteraciones citogenéticas recurrentes o inversiones descritas por la OMS tales como, t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3); AML con *BCR-ABL1*.

|| Definido por la presencia de una única monosomía (excluyendo la pérdida de los cromosomas X e Y) asociada con al menos una monosomía adicional o una alteración cromosómica estructural, excluyendo las LMA *core-binding factor* (Breems *et al.*, 2008).

1 No emplearse como marcador aislado si van asociadas a alteraciones de buen pronóstico.

En el caso de los SMD de novo, también son varios los índices pronósticos utilizados habitualmente para establecer el potencial riesgo de estos pacientes. De ellos, el más utilizado es el índice pronóstico internacional revisado conocido como R-IPSS (revised-international prognostic scoring system), que distribuye a los pacientes en cinco grupos de riesgo en función de variables como el nivel de hemoglobina, el recuento de plaquetas y polimorfonucleares neutrófilos, el porcentaje de blastos en MO y el cariotipo, como se muestra en la Tabla 12 (Greenberg *et al.*, 2012). El cariotipo se divide a su vez también en cinco grupos de riesgo citogenético con puntuación variable como se indica en la Tabla 13. (Schanz *et al.*, 2012).

Tabla 12. Clasificación pronóstica de los SMD. R-IPSS (Greenberg *et al.*, 2012).

Factor Pronóstico	Puntos						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
<b>Grupo de Riesgo Citogenético</b>	Muy bueno		Bueno		Intermedio	Malo	Muy malo
<b>Blastos en MO %</b>	≤2		>2 - <5		5 -10	>10	
<b>Hb (g/dL)</b>	≥10		8 - <10	<8			
<b>Plaquetas (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	≥100	50 - <100	<50				
<b>PMN (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	≥0,8	<0,8					

\* Adaptado de Schanz *et al.*, 2012.

Tabla 13. Grupo de riesgo citogenético de los SMD (Schanz *et al.*, 2012).

GRUPO PRONÓSTICO	Alteraciones Citogenéticas
<b>Muy bueno</b>	del(11q) y pérdida aislada del cromosoma Y
<b>Bueno</b>	Cariotipo normal, del(5q), del(12p), del(20q) aisladas y anomalías dobles que incluyen del(5q)
<b>Intermedio</b>	del(7q), trisomía 8, trisomía 19, i(17q) aislada y cualquier otra anomalía única o doble independiente
<b>Pobre</b>	Monosomía 7 e <i>inv</i> (3)/ <i>t</i> (3q)/ <i>del</i> (3q) aisladas, anomalías dobles que incluyan monosomía 7/ <i>del</i> (7q) y anomalías complejas con 3 anomalías
<b>Muy pobre</b>	Anomalías complejas con >3 anomalías

En función de los factores presentes, los pacientes se dividen en cinco grupos de riesgo (muy bajo ≤1,5, bajo >1,5 – 3, intermedio >3 – 4,5, alto >4,5 – 6 y muy alto >6), con medianas de supervivencia global en años que van de los casi 9 años para los pacientes de muy bajo riesgo, a menos de un año para los clasificados como muy alto riesgo (Greenberg *et al.*, 2012). Actualmente, se está desarrollando una revisión del R-IPSS que incluya información sobre el perfil mutacional de los pacientes.

En el caso de los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos, contamos con algún índice pronóstico como por ejemplo el sistema de estratificación pronóstica de la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) CPSS (*CMML-prognostic scoring system*), que estratifica el pronóstico de los pacientes basado en la clasificación de la OMS y de la FAB para dicha enfermedad, la existencia de dependencia transfusional y los grupos de riesgos citogenéticos descritos específicamente para esta enfermedad, permitiendo

la clasificación de los pacientes en cuatro grupos de riesgo. (Such *et al.*, 2011; Such *et al.*, 2013).

A diferencia de los pacientes con neoplasias mieloides *de novo*, los pacientes con NMRT no cuentan con índices pronósticos específicos. En el caso de las LMA-t, diversos estudios han analizado el valor del cariotipo como factor pronóstico independiente (Schoch *et al.*, 2004; Antoniejevic *et al.*, 2011, Kayser *et al.*, 2011). Sin embargo, no se han desarrollado modelos que tengan en cuenta otros parámetros. Un grupo analizó los posibles factores de riesgo en un grupo de 48 pacientes con LMA-t. Se valoró la influencia de la edad, la presencia de mutaciones de *FLT3-ITD*, el porcentaje de blastos en MO, el tipo de tratamiento previo de la neoplasia primitiva, así como la citogenética para evaluar el pronóstico de estos pacientes. El análisis multivariante finalmente mostró como elemento predictor de buen pronóstico el presentar citogenética compatible con una leucemia promielocítica aguda (LPA), mientras que la existencia de cariotipo complejo fue la única variante citogenética que se relacionó con un peor pronóstico en dicho análisis (Park *et al.*, 2013).

En otro estudio se revisó el papel de diversas variables clínico-biológicas en pacientes con NMRT y el papel de las mismas en la supervivencia global de los pacientes. Para ello analizaron 508 pacientes (253 casos de LMA-t y 255 casos de SMD-t) tratados con esquemas similares para los pacientes con LMA y tratamientos ajustados al riesgo individual de los pacientes con SMD. En cuanto a las características clínicas, encontraron diferencias en el recuento leucocitario, hemoglobina y plaquetas de forma estadísticamente significativa entre ambos grupos, así como una mayor tendencia a presentar cariotipos aberrantes en el grupo de los pacientes con diagnóstico de LMA-t. En cuanto al estudio de alteraciones citogenéticas, no se pudo establecer diferencias entre el perfil mutacional de LMA-t y SMD-t, tras comparar alteraciones en varios genes como *FLT3*, *NPM1*, *MLL*, *RUNX1* y *NRAS*. El estudio también valoraba la aplicación del índice MRC para realizar comparativa entre las alteraciones citogenéticas, y aunque fue capaz de establecer diferencias entre el bajo, intermedio y alto riesgo, no fue capaz de discriminar entre estos dos últimos (Baucher *et al.*, 2013).

Finalmente otro estudio abordó el análisis de la SG en pacientes con NMRT I en el que analizaron 160 pacientes con diagnóstico de NMRT secundarias exclusivamente a cáncer de mama. Las pacientes presentaron una peor SG que las pacientes que no desarrollaron la neoplasia mieloide pero no se encontraron diferencias en SG entre LMA-t y SMD-t (Sevcikova *et al.*, 2016).

En un estudio reciente, basado en 411 pacientes con NMRT, 32 pacientes con LMA-t oligoblástica (20-29% de blastos) y 379 pacientes con SMD-t, analizaron si parámetros como las citopenias, porcentaje de blastos y citogenética tenían valor pronóstico, aunque con modificaciones en los puntos de corte comparado con el R-IPSS original, y planteaban la necesidad de analizar el valor de las alteraciones moleculares en futuros estudios (Ok *et al.*, 2013).





## **2. HIPÓTESIS**



Las NMRT constituyen un grupo de entidades nosológicas dentro de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, teniendo en común el antecedente necesario de una exposición a uno o varios agentes citotóxicos potencialmente leucemogénicos. Sin embargo, a pesar de esta característica común, es un grupo de entidades heterogéneo con una aparente variabilidad clínica y biológica entre ellas y en comparación con las neoplasias mieloides *de novo*. La reciente disponibilidad de técnicas de estudios genéticos de alta eficiencia, como la NGS, nos ha movido a profundizar en el conocimiento de las alteraciones citogenéticas y moleculares y su relación con otras características clínico-biológicas, así como su comportamiento clínico, por otro lado, no bien establecidos.



### **3 . OBJETIVOS**



El objetivo general del presente proyecto de Tesis Doctoral es la caracterización clínico-biológica de las NMRT, incluyendo el perfil mutacional mediante el empleo de tecnología de NGS. Además de este objetivo general, concebimos los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar clínicamente las NMRT, con particular énfasis en la información referente a los antecedentes sobre la enfermedad de base, tratamientos potencialmente leucemógenos empleados y periodo de latencia hasta el desarrollo de la NMRT.
2. Caracterizar citogenéticamente las NMRT mediante el uso de técnicas de cariotipado convencional y FISH.
3. Analizar el perfil mutacional de los pacientes con NMRT mediante métodos de NGS usando un panel con cobertura de los exones de una selección de 40 genes potencialmente involucrados en la LMA y en otras enfermedades mieloides.
4. Analizar la relación entre las alteraciones genéticas (citogenéticas y moleculares) con las características clínicas propias de los pacientes con NMRT.
5. Analizar el valor pronóstico de las alteraciones genéticas (citogenéticas y moleculares) en los pacientes con NMRT.





## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



#### 4.1 Pacientes

Se incluyeron 74 pacientes diagnosticados de NMRT entre los años 1999 y 2013 en diversos centros y cuyas muestras se encontraban almacenadas en el Biobanco del Hospital La Fe y del Biobanco del Hospital Clínico de Valencia. Las muestras de médula ósea se obtuvieron tras la realización de punción esternal o en cresta ilíaca postero-superior en el momento del diagnóstico. El único criterio limitante de inclusión fue la disponibilidad e integridad de DNA al diagnóstico. Los pacientes fueron diagnosticados y clasificados de acuerdo a los criterios morfológicos y citoquímicos de la clasificación FAB (*French-American-British criteria*) (Bennet *et al.*, 1985) y de la clasificación de la OMS (Arber *et al.*, 2008).

Los pacientes subsidiarios de tratamiento recibieron el que se ajustaba al protocolo vigente en el momento del diagnóstico. En los pacientes candidatos a tratamiento (55/74) se usaron esquemas de quimioterapia de inducción con combinaciones de idarubicina o daunorubicina más citarabina, con o sin etopósido; combinaciones de idarubicina con ácido transretinoico (ATRA) para los casos de LPA-t. Los pacientes, una vez alcanzada la remisión, recibían 1 o 2 ciclos con dosis intermedias/altas de citarabina, seguido de trasplante autólogo (n=6) o trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (n=11). Los 19 pacientes que no recibieron tratamiento intensivo no fueron considerados para los estudios de supervivencia.

Todas las muestras empleadas en el estudio fueron proporcionadas por el Biobanco del Hospital La Fe y el Biobanco del Hospital Clínico de Valencia. El estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, y se ajustó a las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales.

## 4.2 Estudio citogenético

Se realizó un estudio sistemático de las alteraciones numéricas y estructurales del cariotipo tras el sacrificio celular en metafase de las células de médula ósea cultivadas *in vitro* durante 24 horas.

### 4.2.1 Preparación e incubación del cultivo

Tras la realización de un aspirado de médula ósea, las muestras fueron cultivadas durante 24 horas en un medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos (estreptomomicina y penicilina).

Todo el proceso de preparación del cultivo se realizó en una cámara de flujo laminar, para posteriormente proceder a la incubación de los cultivos durante toda la noche a 37°C con 5% de presión de CO<sub>2</sub> y una humedad del 90%.

### 4.2.2 Sacrificio del cultivo

La mañana siguiente, se añadieron 100µL de colchicina, continuando la incubación durante 30 minutos a 37°C para impedir la formación del huso acromático y con ello la migración de los cromosomas a los polos celulares. Se transfirió el producto obtenido del cultivo a un tubo cónico y tras centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos se decanta el sobrenadante y resuspende el sedimento con 10 ml de cloruro potásico (CIK) Posteriormente tras añadir 10 mL de CIK (atemperado a 37°C) y se incubó durante 30 minutos a 37°C para obtener un aumento del volumen celular (choque hipotónico). Luego se vertió gota a gota el fijador Carnoy (metanol y ácido acético en proporción 3:1), hasta completar un volumen final de 5 ml. Finalmente se centrifugó, decantó y resuspendió el botón celular, repitiendo el proceso hasta en tres ocasiones para obtener un botón celular limpio.

Desde 2011, este procedimiento se realiza empleando un equipo denominado HANABI PI, que desarrolla la técnica de una forma semiautomática y facilita la obtención de metafases y la calidad de las mismas, gracias al control de las condiciones de humedad y temperatura. El sistema se representa en la Figura 6.

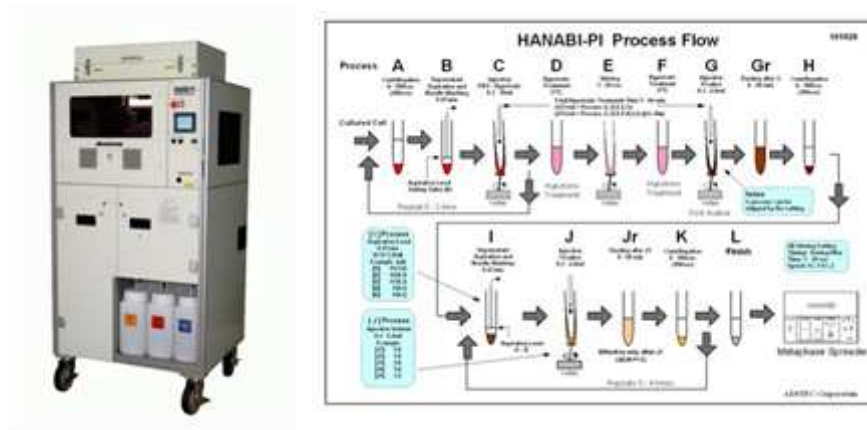


Figura 6. Sistema de procesamiento de muestras para estudio citogenético HANABI PI.

#### 4.2.3 Preparación de extensiones

Tras etiquetar los portaobjetos que se van a utilizar, se introdujeron en el Hanabbi Spreader. Este equipo semiautomático de preparación de extensiones para análisis citogenético permite el control de las condiciones de humedad y temperatura y facilita la obtención de metafases de calidad óptima y uniforme (Figura 7).

Posteriormente, se vertió una gota de suspensión celular sobre cada portaobjetos. Los portaobjetos con metafases aptas se dejaron envejecer durante 1 hora a 90°C.



Figura 7. Imagen del equipo HANABI Spreader.

#### 4.2.4 Tinción de bandas G

Se realizó una tinción con Giemsa (47,5 mL fosfato monopotásico + 47,5 mL fosfato bisódico + 5 mL de Giemsa) tras llevar a cabo una digestión con tripsina. El proceso de tinción se realizó durante 5 minutos, posteriormente se dejó secar durante toda la noche.

#### 4.2.5 Análisis del cariotipo

Se analizaron al menos 20 metafases, siempre que fue posible, por cada una de las muestras mediante el uso del programa Ikaros (Metasystems Inc., Alemania). La descripción de las anomalías detectadas se realizó según el Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica (ISCN, 2016).

### 4.3 Estudio de las alteraciones moleculares

#### 4.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción del DNA de las muestras de médula ósea se realizó empleando el QIAAmp® DNA Mini kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para comprobar la cantidad y calidad del producto obtenido, se realizó espectrofotometría y medición de la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de entre 260 nm y 280 nm (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE).

La determinación de la integridad del DNA se realizó mediante la migración de las muestras en geles de agarosa y posterior tinción con GelRed™ (Biotium, EEUU) para visualizar su nivel de degradación. Las muestras con concentraciones superiores a 50 mg/ $\mu$ L, cuya cantidad total no fuera inferior a 1  $\mu$ g y presentaran ratios Abs260/280 de alrededor de 1,8 fueron seleccionadas para el estudio. Posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

#### 4.3.2 Caracterización molecular de los pacientes

La caracterización molecular de los pacientes se realizó mediante la aplicación del panel diseñado de NGS en una plataforma Ion Torrent™ (Life Technologies). Este panel incluye 40 genes, permitiendo capturar las regiones codificantes de los mismos. El panel fue diseñado empleando el sistema *SureDesign Tool (Agilent HaloPlex Target Enrichment)*. La preparación de las librerías, así como la captura de las regiones de

interés se hizo siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante, usando un tamaño medio de amplicones de 150-200 pares de bases (pb).

Los 40 genes incluidos en el panel son los descritos previamente en la literatura relacionados directamente con la LMA (*NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*, *CEBPa*, *RUNX1*, *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *WT1*, *KIT*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL* y *TET2*), junto con otros genes relacionados con otras enfermedades mieloides (*BCOR*, *BRAF*, *CDKN2A*, *ETV6*, *EZH2*, *GNAS*, *JAK2*, *LUC7L2*, *MPL*, *NF1*, *NRAS*, *PHF6*, *PTPN11*, *RAD21*, *RPS14*, *SETBP1*, *SF1*, *SF3A1*, *SF3B1*, *SMC3*, *SMC3*, *SPARC*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* y *ZRSR2*). Se incluyeron teóricamente todos los exones de cada gen, así como las regiones intrónicas flanqueantes.

#### 4.3.3 Procesamiento de las muestras para la secuenciación masiva

La preparación del DNA para su posterior procesamiento en el secuenciador IonProton™ requiere una serie de pasos intermedios destinados a obtener una preparación final de muestra correctamente amplificada, identificada, purificada, cuantificada y diluida para ser analizada en dicho sistema (Figura 8 y Figura 9).



Figura 8. Esquema de preparación de las muestras para secuenciación en el IonProton™.

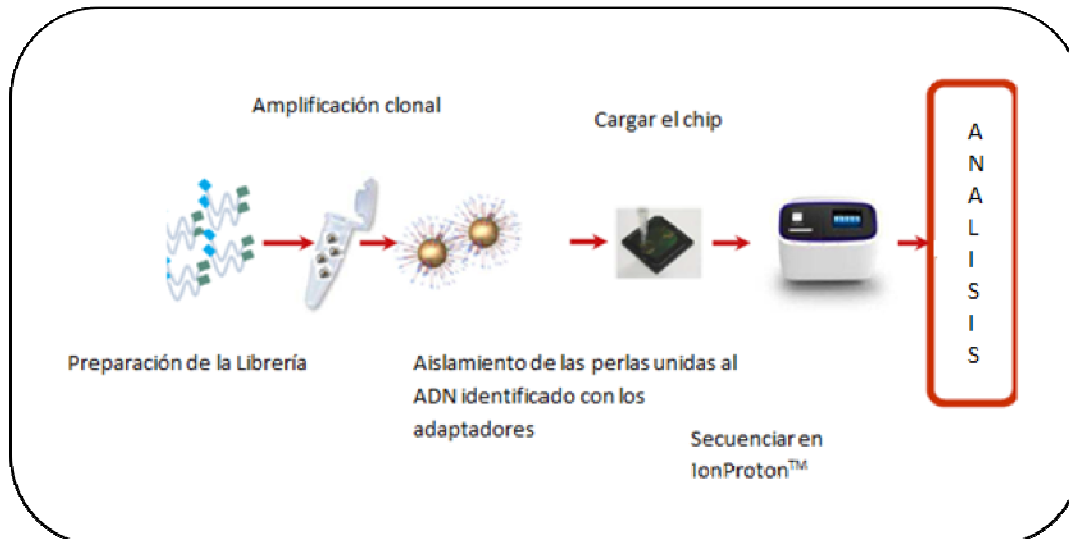


Figura 9. Esquema general de la secuenciación en la plataforma IonProton™.

Una vez preparada la librería se introduce en el chip Ion PITM de manera automatizada empleando el robot Ion Chef™. Posteriormente, el chip se introduce en el secuenciador IonProton™ para el procesamiento final de la muestra.

#### 4.3.3.1 Preparación de la librería

Para la obtención de la librería se realizó una PCR múltiple según las indicaciones del fabricante como se muestra en la Tabla 14. Para ello se emplearon los primers específicamente diseñados para cubrir las regiones de interés de los genes descritos previamente (*Custom Panels*). Para evitar apareamiento entre primers con regiones homólogas, éstos se distribuyeron en dos *pools* por paciente, dos pocillos cuando se realizó la PCR en placa, y dos tubos en los casos en los que se realizó de forma aislada el experimento, conteniendo el primero de ellos 324 parejas de primers y 335 el segundo. El volumen final por paciente fue de 20 µL.



Tabla 14. Preparación inicial de la PCR para paneles custom (según fabricante).

Componente	Volumen por muestra (µL)
5X Ion AmpliSeQT <sup>M</sup> HiFi Mix	4
2X Ion AmpliSeQT <sup>M</sup> Primer Pool	10
20X Ion AmpliSeQT <sup>M</sup> Sample ID Panel	1
DNA, 3000 copias (10ng para genomas de mamíferos)	≤5
Nuclease-free Water	hasta 20

El esquema inicial de la PCR se puede ver en la Tabla 15, siendo el número de ciclos recomendados por el fabricante de 17 ciclos, para *pools* de primers que presentaban entre 193-384 parejas por *pool*, como en nuestro caso.

Tabla 15. Esquema de la PCR inicial para paneles *custom* (según fabricante).

Fase	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
<b>Hold</b>	Activación de la enzima	99	2 minutos
	Desnaturalizar	99	15 segundos
<b>Ciclos</b>	Hibridar y elongar	60	4 minutos
<b>Hold</b>		10	Hold

#### 4.3.3.2 Digestión enzimática

Posteriormente se procedió a la digestión enzimática de los productos restantes de la PCR mediante la adición de 2 µL de reactivo FuPa a cada muestra amplificada, consiguiendo un volumen final de 22 µL. Tras vortear la muestra de forma vigorosa, se introdujeron de nuevo en el termociclador con el programa especificado en la Tabla 16.

**Tabla 16. Programa de termociclador para la digestión enzimática**

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
50	10
55	10
60	20
10	<i>Hold</i>

#### 4.3.3.3 Ligación de los adaptadores a los amplicones

Para la identificación de los pacientes tras la secuenciación es necesario añadir un adaptador o *barcode* a los amplicones obtenidos. Los identificadores se prepararon según las instrucciones del fabricante según se especifica en la Tabla 17.

**Tabla 17. Protocolo de preparación del adaptador para cuatro reacciones.**

Componente	Volumen (µL)
<i>Ion P1 Adapter</i>	2
<i>Ion Xpress™ Barcode X<sup>1</sup></i>	2
<i>Nuclease-free Water</i>	4
<b>Total</b>	8

<sup>1</sup> X= *barcode* elegido

Tras la obtención de los adaptadores se añadió a cada pocillo/tubo 4 µL de *Switch Solution* y 2 µL de adaptador, obteniendo un volumen final de 28 µL incluyendo los 22 µL del amplicon ya sometido a digestión enzimática.

Posteriormente, a cada pocillo/tubo se le añadieron 2  $\mu$ L de DNA Ligasa, tras lo cual se introdujeron en el termociclador para proceder a la reacción de ligación de los adaptadores a los amplicones según el programa especificado en la Tabla 18.

**Tabla 18. Programa de termociclador para la reacción de ligación**

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
22	30
72	10
10	<i>Hold</i> (hasta 1 hora)

#### 4.3.3.4 Purificación de la librería

Una vez obtenidos los amplicones identificados con un adaptador específico para cada paciente, se procedió a la purificación de la librería mediante el empleo de microesferas magnéticas denominadas Agencourt® AMPure® XP Reagent del cual se añadieron 45  $\mu$ L a cada librería realizando una mezcla homogénea manual durante 5 minutos. Posteriormente, se dejaron incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Tras ello se colocaron en un rack con carga magnética como el DynaMag™-96 Side Magnet, donde se dejaron incubar durante dos minutos o hasta que se aclaró la solución. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, ya que el DNA amplificado y unido a los adaptadores se localizó en el fondo del pocillo/tubo unido a las microesferas magnéticas.

Posteriormente, la eliminación de las esferas unidas a los amplicones se realizó añadiendo 150  $\mu$ L de etanol al 70% y moviendo la placa/tubo en las dos posiciones del imán para separar las esferas. Se eliminó de nuevo el sobrenadante que contenía las esferas sin alterar el pellet depositado en el fondo, que se correspondía con nuestro material amplificado. Este paso se repitió una vez más para optimizar el proceso de limpieza. Finalmente se dejaron secar los pocillos/tubos sobre el imán durante 5 minutos a temperatura ambiente.

#### 4.3.3.5 Amplificación de la librería previo a la cuantificación

Para enriquecer el material obtenido y unido a los adaptadores, previo a la fase final de secuenciación, se procedió a una segunda amplificación empleando primers genéricos según las indicaciones del fabricante. Se empleó Platinum<sup>®</sup> PCR SuperMix High Fidelity. Para ello, tras retirar la placa/tubo del imán se añadió a cada librería 50  $\mu$ L de este reactivo y 2  $\mu$ L de Library Amplification Primer Mix y se procedió a la realización de la PCR según el protocolo mostrado en la Tabla 19.

Tabla 19. Programa de termociclador para la PCR de amplificación de la librería

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
<i>Hold</i>	98	2 minutos
<b>Amplificación</b>	98	15 segundos
	<b>5 ciclos</b>	64
<i>Hold</i>	10	<i>Hold</i>

#### 4.3.3.6 Segunda purificación de la librería amplificada

Posteriormente se realizó un nuevo proceso de purificación para eliminar las esferas magnéticas empleadas que no hubieran sido eliminadas en el paso anterior usando de nuevo el reactivo Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP. Este proceso se realizó en dos pasos, en un primer lugar se añadieron 25  $\mu$ L de dicho reactivo a cada pocillo/tubo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó de nuevo en el DynaMag<sup>™</sup>-96 Side Magnet durante al menos otros 5 minutos; mediante este primer paso, las moléculas de alto peso molecular se quedan unidas a las microesferas y los amplicones y primers restantes quedan en el sobrenadante, que es el que debemos conservar para continuar con el proceso transfiriéndolo a una nueva placa/tubo.

En un segundo paso se le añadieron al sobrenadante 60  $\mu\text{L}$  del reactivo Agencourt® AMPure® XP y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se colocó la placa en el imán al menos durante 3 minutos; en este paso del procesado los amplicones se unen a las esferas magnéticas de forma que lo que interesa conservar es el pellet y desechar el sobrenadante.

Para la eliminación de las esferas unidas al material amplificado de nuevo se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a cada pocillo/tubo y de nuevo se colocó sobre el imán para eliminar las esferas magnéticas que se separan de los amplicones por efecto del etanol y quedan en el sobrenadante que debemos eliminar. Este paso se repite de nuevo para mejorar la eliminación de las esferas. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Tras retirar la placa/tubo del imán se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de TE para dispersar las esferas, tras dos minutos más en el imán se procedió a analizar el sobrenadante, donde se encuentra finalmente el DNA amplificado en dos ocasiones y unido a los adaptadores para su posterior identificación, ya que las esferas quedan en el pellet unidas al imán.

#### **4.3.3.7 Cuantificación de la librería y cálculo del factor de dilución**

Para la que la secuenciación se realice de forma homogénea se requiere que los amplicones tenga una concentración de 100 picoMolar (pM). Para cuantificarlo, se empleó el fluorómetro Qubit® 2.0 y el kit Qubit® dsDNA HS. Tras obtener la concentración de cada una de las librerías amplificadas, se determinó la dilución mediante un programa matemático proporcionado por el fabricante, de forma que se obtuvo la información necesaria para preparar las muestras a la concentración deseada.

#### **4.3.3.8 Procesado de los amplicones en el secuenciador Ion Proton™**

Una vez obtenidas las librerías a una concentración de 100 pM se procedió a la preparación para su introducción en el secuenciador, para lo que se cogieron 15  $\mu\text{L}$  de cada librería y se mezclaron todas juntas en un único tubo. Finalmente, a 25  $\mu\text{L}$  de esta mezcla final se le añadieron de nuevo microesferas, con capacidad para unir miles de fragmentos de DNA amplificado, sobre las que se producirá posteriormente la reacción de secuenciación. Esta mezcla fue inyectada en el chip Ion PI™ e introducida en el secuenciador para su procesamiento. Para este paso final se empleó un sistema denominado Ion Chef™, que realiza este proceso de forma automatizada.

Posteriormente los chips cargados mediante el uso de dicho sistema se introdujeron en el secuenciador Ion Proton™ y se inició el programa de secuenciación.

El chip introducido en el secuenciador es sometido a baños consecutivos de nucleótidos. A medida que se van incorporando a las cadenas complementarias de DNA, se produce la liberación de un protón, que es captado por los pHmómetros incorporados en el chip. Estos cambios son registrados por el sistema, siendo transformada la información en la secuencia de nucleótido (Figura 10).

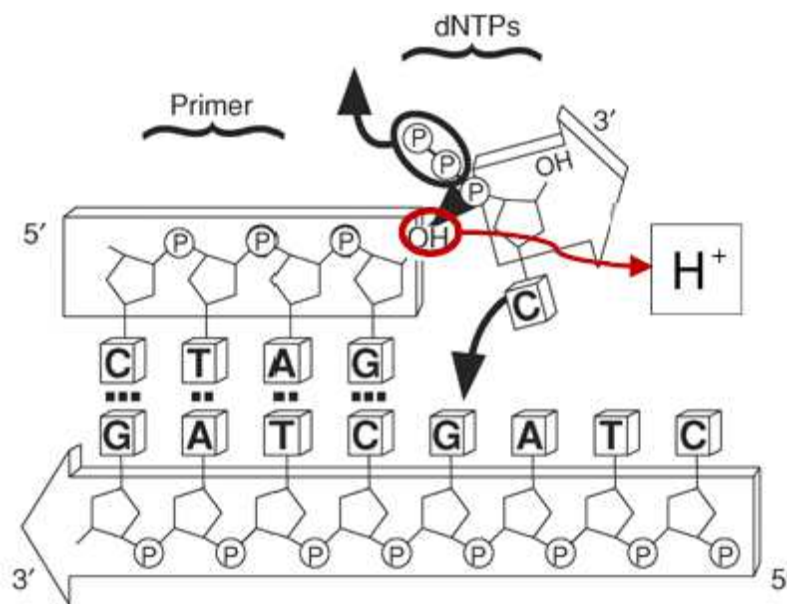


Figura 10. Esquema de funcionamiento de sistema IonProton™.

#### 4.3.4 Análisis bioinformático

Para el análisis de los datos obtenidos tras la secuenciación se empleó el software Ion Reporter™. Este programa simplifica las tareas de comparación de los datos experimentales con una referencia de DNA genómico para determinar presencia de mutaciones. En nuestro estudio se usó la versión del genoma de referencia hg19. Los datos de la secuenciación mediante amplicones se estudiaron empleando el software *Amplicon Variant Analyzer*. Este programa, en primer lugar, realiza un control de calidad de las lecturas, después alinea las lecturas de los diferentes amplicones obtenidos frente a una secuencia de referencia. Los resultados obtenidos se

reanalizaron con un algoritmo de selección de variables desarrollado por un bioinformático.

Tras la obtención de la matriz de datos provisional, se realizó una selección de las variables que cumplían una serie de requisitos preestablecidos y que se detallan en los siguientes puntos:

#### 4.3.4.1 Criterios de secuenciación

La cobertura mínima fue de 1000 lecturas, estando al menos el 95% de las bases detectadas con un mínimo de 100 lecturas. En global por muestra debía existir al menos más de 2 millones de lecturas y 4 millones de lecturas en amplicones.

#### 4.3.4.2 Criterios de filtrado de variantes

Una vez realizada la secuenciación, los archivos resultantes en formato .vcf se analizaron con el software de análisis de las plataformas empleadas o con los desarrollados por los bioinformáticos, como se exponía previamente. Las variantes resultantes se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios en el siguiente orden:

1. Se eliminaron variantes frecuentes en la base de datos propia para evitar *single nucleotide polymorphisms (SNPs)* y falsos positivos por error en la secuenciación.
2. Se seleccionaron las variantes con un mínimo de 100 lecturas y al menos 25 lecturas del alelo alternativo.
3. Se seleccionaron variantes exónicas y de las regiones, 3' y 5' UTR y de *splicing* (+/-10pb).
4. Se seleccionaron las variantes que producían un efecto deletéreo sobre la proteína, empleando predictores como *Polyphen2* y *Shift*.
5. Se seleccionaron las variantes cuya frecuencia alélica (VAF, *variant allele frequency*) era mayor al 5% salvo las variantes ya establecidas como patogénicas en las que se permitió un VAF mayor al 3%.

#### 4.3.4.3 Criterios de visualización en el IGV (Integrative Genomic Viewer)

Una vez obtenidas las variables, se comprobaron todas las variantes seleccionadas en el IGV para comprobar o descartar las siguientes consideraciones:

- La región debe estar capturada de forma uniforme en un rango de +/- 15 pb flanqueante a la variante estudiada.
- La variante debe haberse secuenciado en más de un fragmento.
- Se debe descartar la presencia de sesgos de hibridación (*strand bias*) y confirmar posteriormente que la proporción en las cadenas sentido y antisentido se mantiene proporcional entre la población mutada y normal.
- Se debe descartar la presencia de regiones repetitivas y homopolímeros.
- Se deben descartar la presencia de variantes localizadas en los extremos de los amplicones.

#### 4.3.5 Bases de datos

Los resultados finalmente obtenidos se compararon con los ya publicados en diversas bases de datos de referencia:

- Poblacionales. Para descartar las variantes polimórficas se emplearon las siguientes bases de datos poblacionales *dbSNP*, *1000genomes* y *ExAC Browser*.
- Somáticas. Para determinar si las variantes encontradas ya habían sido descritas como mutaciones somáticas se emplearon las bases de datos de *Cosmic* y *Clinvar*.
- Predictor afectación proteica. Para determinar si existía afectación de la función de la proteína de las variantes no sinónimas se emplearon 2 predictores *SIFT*, *Polyphen* y *Mutation Taster*.
- Predictores de splicing. Se emplearon al menos la utilización de 2 predictores de sitios de *splicing*. Principalmente se usan *NNSplice*, *Netgene2* y *Splice View*.

#### 4.4 Detección de mutaciones en *NPM1* y *FLT3*

El estudio de mutaciones de *NPM1* y de *FLT3*-ITD se realizó en el momento diagnóstico de las LMA-t dentro de la práctica habitual y posteriormente en los pacientes con SMD-t mediante las técnicas descritas previamente empleando cebadores específicos (Nakao *et al*, 1996 y Schnittger *et al*, 2005). Los productos se



analizaron mediante análisis de fragmentos en secuenciador ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### 4.5 Definiciones

*Remisión Completa y Remisión Parcial:* porcentaje de blastos en médula ósea inferior al 5% sobre la celularidad nucleada con normalización de los recuentos hematopoyéticos en sangre periférica, lo que implica un recuento absoluto de neutrófilos  $> 1.000/\mu\text{l}$  y de plaquetas  $\geq 100.000/\mu\text{L}$  tras la administración del tratamiento de inducción (Cheson *et al.*, 2003). El resto de posibles respuestas (remisión con recuperación hematopoyética incompleta, remisión sin recuperación de plaquetas, respuesta parcial o refractariedad), han sido consideradas en un grupo único como 'no respuesta'. Por tanto, en términos de medición de la eficacia del tratamiento de inducción sólo se ha considerado como respuesta válida la remisión completa

En los pacientes con SMD-t, se emplearon los criterios de respuesta del International Working Group (IWG) (Cheson *et al.*, 2006). La RC se definió como un porcentaje menor o igual al 5% de blastos en médula ósea, sin evidencia de displasia y unos recuentos en SP de: hemoglobina  $\geq 11\text{g/dl}$ , plaquetas  $\geq 100.000/\mu\text{L}$  y neutrófilos  $\geq 1000/\mu\text{L}$  con ausencia de blastos circulantes. La remisión parcial (RP) se definió como el cumplimiento de todos los requisitos de RC si eran anormales antes del tratamiento excepto que puede haber un recuento de blastos  $>5\%$  siempre y cuando haya habido un descenso mayor o igual del recuento de blastos respecto al inicio del tratamiento, sin tener en cuenta la celularidad ni la morfología.

En los pacientes con SMD/SMPC-t, se emplearon los criterios de Savona *et al.* (2015), donde se definió la RC como una proporción menor o igual al 5% de blastos, con maduración normal de todas las líneas celulares y recuperación de una celularidad normal. Si existía mielofibrosis previa, ésta debe estar ausente o definirse como una fibrosis reticulínica media ( $\leq$  grado 1). En cuanto a los recuentos en SP, las cifras de hemoglobina y plaquetas se definen igual que para los SMD, al igual que la cifra de neutrófilos, pero especificando que el recuento total de leucocitos debe ser  $\leq 10.000/\mu\text{L}$ , de monocitos  $\leq 10.00/\mu\text{L}$  y no deben existir blastos circulantes. Además, incluye la desaparición de enfermedad extramedular que pudiera existir previo al inicio del tratamiento. La definición de RP en estos pacientes implicaría la normalización de los recuentos periféricos y la hepatoesplenomegalia, así como una reducción de la

proporción de blastos inicial superior o igual al 50%, pero permaneciendo todavía por encima del 5% de la celularidad.

*Recaída de la NMRT:* El término recaída hace referencia a la reaparición de la enfermedad después de haber alcanzado RC. El criterio fue la presencia de > 5% de células blásticas en la médula ósea para los pacientes como LMA-t. En el caso de los pacientes con SMD-t, hablaríamos de recaída cuando se diera uno de los siguientes supuestos: volver al porcentaje de blastos previo al inicio del tratamiento, disminución  $\geq 50\%$  de los niveles máximos de neutrófilos y plaquetas obtenidos durante la remisión y disminución de la hemoglobina  $\geq 1.5$  g/dl o existencia de dependencia transfusional.

*Dependencia transfusional:* al menos una transfusión cada 8 semanas en un período de 4 meses.

*Supervivencia global (SG):* se obtuvo empleando la fecha de diagnóstico de la enfermedad y la fecha de última visita o muerte del paciente con independencia del estado de la enfermedad.

*Supervivencia libre de enfermedad (SLE):* se obtuvo para los pacientes que alcanzaron RC hasta una recaída o su muerte por cualquier motivo, lo que ocurriera primero. El resto de pacientes se “censuraron” en la fecha de última visita.

*Supervivencia libre de recaída (SLR):* se obtuvo empleando la fecha de obtención de RC hasta que se produjo la recaída de la enfermedad. El resto de pacientes se “censuraron” en la fecha de última visita o si se produjo su muerte por otra causa.

*Incidencia acumulada de recaída (cumulative incidence of relapse, CIR):* para su obtención se empleó la RC hasta la recaída de la enfermedad. El evento competitivo que se consideró fue la muerte en RC.

*VAF: (variant allele frequency, VAF):* porcentaje de las lecturas de la variante respecto al total de lecturas.

*Cariotipo complejo:* se define como tres o más alteraciones cromosómicas no relacionadas en ausencia de las denominadas traslocaciones recurrentes o inversiones definidas por la OMS como t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3)/t(3;3) y LMA con BCR-ABL1.

*Cariotipo monosómico:* definido por la presencia de una monosomía única (excluyendo la pérdida de los cromosomas sexuales) en asociación al menos con una monosomía adicional o una alteración estructural (excluyendo las LMA CBF). un estudio de frecuencia de las diversas variables analizadas.

## 4.6 Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo para caracterizar de forma general la serie de pacientes con diagnóstico de NMRT. Para ello, se incluyó un estudio de frecuencias de las distintas variables, el análisis de las diferencias y la definición, en el caso de variables cuantitativas continuas, de su distribución normal. Para analizar la distribución normal se emplearon las pruebas de Kolmorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. Para expresar los resultados obtenidos se emplearon porcentajes para las variables de tipo categórico y medianas para las continuas.

Para el estudio de las variables continuas, se analizaron las diferencias entre los grupos empleando la prueba de U de Mann-Whitney para las variables que no seguían una distribución normal y la t de Student para las que sí presentaban esta distribución.

Para realizar la comparación entre variables cualitativas se usó la prueba de Chi-cuadrado, salvo cuando el tamaño muestral era menor de 5, ya que entonces se aplicó el test exacto de Fisher. Para el estudio de las variables continuas, éstas se categorizaron de acuerdo al punto de corte más discriminante o bien a lo establecido previamente en la literatura.

El estudio incluyó parámetros demográficos básicos (sexo y edad), parámetros hematológicos (valores de hemoglobina, recuento leucocitario y plaquetar, porcentaje de blastos en MO y SP), parámetros relacionados con el propio proceso (agente empleado previamente, tiempo de latencia), esquemas de tratamiento y respuesta al mismo, así como parámetros biológicos como cariotipo y perfil mutacional de los pacientes.

Los estudios de supervivencia en sus distintas modalidades (SG, SLE y SLR) se llevaron a cabo empleando el método de Kaplan-Meier (Kaplan *et al.*, 1958) y las comparaciones se realizaron empleando las pruebas de Log-Rank (Mantel., 1966).

La probabilidad de recaída se calculó mediante los métodos de Kaplan-Meier y el método de incidencia acumulativa (riesgo competitivo, Gooley *et al.*, 1999). Para la determinación de la CIR, se consideró como evento competitivo la muerte no debida a recaída.

Para el análisis multivariante se usó el método de riesgos proporcionales (regresión múltiple) de Cox (Cox., 1972) o el método de Fine and Gray para la incidencia acumulativa (Fine *et al.*, 1999).

Las variables con valor de  $P < 0,1$  obtenidas en el análisis univariante se llevaron al multivariante, junto con las variables que sin alcanzar dicho valor habían sido previamente descritas como relevantes en el pronóstico de LMA y/o SMD. Las variables con más de un 10% de los datos perdidos no se incluyeron en el estudio multivariante. La significación estadística se estableció para todos los casos como un valor de  $P < 0,05$ .

La comparativa entre índices pronósticos se realizó mediante la aplicación del test de Estimación de la Probabilidad de Concordancia (Gonen *et al.*, 2005).

Los estudios estadísticos se realizaron con el paquete estadístico EZR en el lenguaje y entorno de programación R versión 2.13.2 (R Development Core Team., 2011), usando los paquetes recomendados en cada caso.

## **5. RESULTADOS**



## 5.1 Características generales de la serie

Se incluyeron un total de 74 pacientes diagnosticados de NMRT entre 1993 y 2013 de los que se disponía de muestra de DNA almacenada en los biobancos del Hospital La Fe y del Hospital Clínico de Valencia.

Las principales características clínico-biológicas de los pacientes se muestran en la Tabla 20. La serie estaba compuesta por 33 hombres y 41 mujeres, con una mediana de edad de 64 años (extremos, 32 – 83 años). La mediana de leucocitos al diagnóstico fue  $4 \times 10^9/L$  (extremos, 0 –  $108 \times 10^9/L$ ), hemoglobina 9 g/dL (extremos, 3 – 17g/dL) y plaquetas  $39 \times 10^9/L$  (extremos, 6 –  $440 \times 10^9/L$ ). La distribución de LMA-t (n = 55) y SMD-t (n = 19) fue 74% y 26%, respectivamente. Las neoplasias por las que habían recibido tratamiento previo fueron: cáncer de mama (n = 20, 27%), linfoma no Hodgkin (LNH) (n = 18, 24%), mieloma múltiple (n = 7, 10%), neoplasias mieloides (n = 7, 10%), siendo el resto una miscelánea de neoplasias.

Un tratamiento previo con QT, RT o ambas, se documentó en el 53%, 16% y 31% de los pacientes, respectivamente. En cuanto al tipo de QT, un 66% de los pacientes (n = 40) había recibido tratamiento con agentes alquilantes, un 10% (n = 6) con inhibidores de la topoisomerasa II y un 24% (n = 16) una combinación de ambos. Un 27% de los pacientes (n = 20) habían sido sometidos a un autotrasplante de sangre periférica (ATSP).

El tiempo de latencia entre la administración de agentes alquilantes y el desarrollo de la NMRT fue de 70 meses (extremos, 4 – 346 meses), mientras que los que recibieron tratamiento sólo con inhibidores de topoisomerasa II tuvieron un tiempo de latencia de 52 meses (extremos, 22 – 168 meses). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (P=0,84).

Tabla 20. Características generales de la serie global de pacientes

Características	NMRT		LMA-t		SMD-t		P
	N (%)	Mediana (rango)	N (%)	Mediana (rango)	N (%)	Mediana (rango)	
<b>Total</b>	74		55		19		
<b>Edad</b>		64 (32-83)		62 (32-83)		66 (44-79)	ns
<b>Sexo</b>							ns
Hombre	33 (45)		24		9		
Mujer	41 (55)		31		10		
<b>Enfermedad previa</b>							
Neoplasia mama	20 (27)		20		0		<0,01
LNH	18 (24)		12		6		ns
EH	1 (1)		1		0		ns
MM	7 (10)		3		4		ns
LA	7 (10)		1 <sup>1</sup>		6		<0,01
Otros	21 (28)		18		3		ns
<b>Tratamiento previo</b>							
Alquilantes y/o RT	53 (72)		44		9		0,01
<i>Alquilantes</i>	22 (30)		17		5		ns
<i>Radioterapia</i>	12 (16)		10		2		ns
<i>Alquilantes y RT</i>	19 (26)		17		2		ns
Inhibidores Topo. II	6 (8)		1		5 (26)		<0,01
Alquilantes + I. Topo II	11 (15)		6 (11)		5 (26)		ns
Alq. + I. Topo II +RT	4 (5)		4		0		ns
<b>Tiempo latencia (meses)</b>		61 (4-346)		64 (32-346)		47 (4-209)	ns
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>		9 (3-17)		9 (3-17)		10 (7-14)	ns
<b>Leucocitos (×10<sup>9</sup>/L)</b>		4 (0-108)		4 (0-108)		4 (1-76)	ns
<b>Plaquetas (×10<sup>9</sup>/L)</b>		39 (6-440)		34 (6-306)		60 (4-440)	0,02
<b>Blastos MO (%)</b>		45 (0-99)		60 (20-99)		4 (0-21)	0,01
<b>Tratamiento/Inducción</b>	55 (74)		45		1		0,01

<sup>1</sup> LLA previa; ns: no significativa



En la Tabla 21 se muestran los esquemas de tratamiento que recibieron para el tratamiento de la NMRT 55 de los 74 pacientes. Los 19 pacientes restantes no se trataron debido a una edad avanzada o a la presencia de comorbilidades. Estos pacientes no se han incluido en los posteriores análisis de supervivencia. Entre los pacientes que recibieron tratamiento, las respuestas observadas fueron las siguientes: remisión completa (n= 32, 58%), resistencia (n = 14, 25%), y muerte durante el tratamiento de inducción (n = 9, 16%).

**Tabla 21. Esquemas de tratamiento de inducción administrados.**

Esquema de tratamiento	N (%)
<b>Tratamiento LMA-t</b>	<b>45 (82)</b>
LMA92	1 (2)
LMA97	2 (4)
LMA2007	7 (16)
LMA2010	9 (20)
FLUGA	7 (16)
FLAGIDA	9 (20)
5-AZA	2 (4)
ICE	3 (8)
LPA93	2 (4)
LPA99	2 (4)
LPA2005	1 (2)
<b>Tratamiento SMD-t</b>	<b>10 (53)</b>
5-AZA	9 (90)
FLAGIDA	1 (10)

## 5.2 Clasificación

Para una mejor descripción de los pacientes, se procedió a clasificarlos de acuerdo a los criterios de la FAB y de la OMS, sin tener en cuenta el antecedente de la exposición a la terapia previa.

La distribución de los pacientes según la clasificación morfológica de la FAB se muestran en la Tabla 22 y Tabla 23 respectivamente.

**Tabla 22. Clasificación de los pacientes con LMA-t según la clasificación FAB.**

Clasificación FAB	N (%)
LMA con mínima diferenciación (M0)	3 (5)
LMA sin maduración (M1)	4 (7)
LMA con maduración (M2)	8 (15)
L. Promielocítica (M3)	5 (9)
LMA mielomonocítica (M4)	5 (9)
LMA monoblástica (M5)	12 (22)
LMA eritroide (M6)	7 (13)
LMA megacarioblástica (M7)	0
No clasificadas	11 (20)

**Tabla 23. Clasificación de los pacientes con SMD-t según la clasificación FAB**

Clasificación FAB	N (%)
Anemia refractaria (AR)	8 (42)
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	1 (5)
Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)	7 (37)
Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-T)	1 (5)
Leucemia Mielomonocítica Crónica	2 (11)

### 5.3 Caracterización citogenética de las NMRT

El estudio del cariotipo fue valorable en 72 de los 74 pacientes (97%), presentando algún tipo de alteración clonal 52 pacientes (72%). La distribución de las alteraciones más frecuentes se muestran en la Tabla 24. La única diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con LMA-t y SMD-t fue la presencia de traslocaciones balanceadas en el primer grupo. El 50% de los pacientes con estas translocaciones presentaban una  $t(15;17)(q22;q21)$ ; PML-RARA y un 30% de  $inv(16)(p13.1q22)$  o  $t(16;16)(p13.1;q22)$ ; CBFβ-MYH11.

Tabla 24. Alteraciones citogenéticas de los pacientes con NRMT

Alteración citogenética	NMRT N (%)	LMA-t N (%)	SMD-t N (%)	P
<b>Cariotipo normal</b>	20 (28)	12 (22)	8 (44)	ns
<b>Alteración clonal</b>	52 (72)	42 (78)	10 (56)	ns
<b>Alteración cromosoma 5 (-5/del5q)</b>	16 (22)	12 (22)	4 (22)	ns
<b>Monosomía 5</b>	3 (4)	3 (6)	0	ns
<b>Delección 5q</b>	13 (18)	9 (17)	4 (22)	ns
<b>Alteración cromosoma 7 (-7/del7q)</b>	19 (26)	12 (22)	7 (39)	ns
<b>Monosomía 7</b>	10 (14)	5 (9)	5 (28)	ns
<b>Delección 7q</b>	10 (14)	8 (15)	2 (11)	ns
<b>Alteración cr. 5 +/- cr.7</b>	28 (39)	20 (37)	8 (44)	ns
<b>Cariotipo complejo</b>	20 (28)	15 (28)	5 (28)	ns
<b>Cariotipo monosómico</b>	18 (25)	13 (24)	5 (28)	ns
<b>Traslocación balanceada</b>	10 (14)	10 (19)	0	0,04
<i>t(15;17)(q22;q21)</i>	5 (7)	5 (9)	0	
<i>inv(16)(p13.1q22)</i> o <i>t(16;16)(p13.1;q22)</i>	3 (4)	3 (5)	0	
<i>t(6;9)(p22;q23)</i>	1 (1)	1 (2)	0	
<i>t(9;11)(p22;q23)</i>	1 (1)	1 (2)	0	

ns: No significativa

Las alteraciones citogenéticas observadas según el tratamiento previo se muestran en la Tabla 25. Los pacientes que recibieron tratamiento con alquilantes y/o RT presentaron con mayor frecuencia alteraciones de los cromosomas 5 y 7. Los pacientes que recibieron exclusivamente tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II no presentaron alteraciones en dichos cromosomas. Por otro lado los pacientes que recibieron tratamiento exclusivo con alquilantes presentaron más traslocaciones balanceadas.

**Tabla 25. Alteraciones citogenéticas en función del tratamiento previo**

Tratamiento previo (N)	Alteraciones Cr. 5 y 7		T. balanceadas	
	(N/%)	P	(N/%)	P
<b>Alquilantes y/o RT (52)</b>	22 (43)	NS	9 (17)	ns
<b>Alquilantes +/- RT (40)</b>	20 (50)	<b>0,03</b>	9 (23)	ns
<b>Inhibidores Topoisomerasa II<sup>1</sup> (6)</b>	0	<b>0,05</b>	1 (17)	ns
<b>Alquilantes (21)</b>	10 (48)	NS	7 (33)	<b>0,01</b>
<b>Radioterapia (12)</b>	2 (17)	NS	0	ns
<b>Alquilantes y RT (19)</b>	10 (53)	NS	2 (11)	ns
<b>Alquilantes + I.T II (10)</b>	3 (30)	NS	1 (10)	ns
<b>Alquilantes + I. T II + RT (4)</b>	3 (75)	NS	0	ns

ns: No significativa

La distribución de los pacientes según las clasificaciones citogenéticas más importantes se muestran en la Tabla 26 y Tabla 27.

Tabla 26. Distribución de los pacientes con LMA-t según las clasificaciones citogenéticas

Grupo de riesgo	SWOG/ECOG N (%)	CALGB N (%)	MRC (2010) N (%)	ELN (2017) N (%)
Favorable	7 (13)	2 (4)	8 (15)	5 (9)
Intermedio	13 (24)	26 (54)	20 (37)	16 (30)
Desfavorable	25 (46)	21 (29)	26 (48)	28 (52)
Desconocido/No aplicable	9 (17)	5 (9)		5* (9)

\* Los 5 pacientes excluidos corresponden a los diagnosticados de LPA t(15;17)(q22;q12); *PML-RAR*

Tabla 27. Clasificación de los pacientes con SMD-t según el R-IPSS

Grupo de riesgo R-IPSS	N (%)
Muy bajo	2 (11)
Bajo	3 (17)
Intermedio	5 (28)
Alto	4 (22)
Muy alto	4 (22)

#### 5.4 Caracterización molecular de las NMRT

El estudio de mutaciones mediante NGS pudo realizarse en los 74 pacientes. Un 95% de los casos (N = 70) presentó algún tipo de alteración. Los genes mutados con mayor frecuencia fueron *TP53*, que se mostró alterado en un 37% de los pacientes (n = 27) y *TET2* que se presentó mutado en un 23% de los casos (n = 23). No se encontraron mutaciones en los genes *FLT3*, *IDH1*, *SF1* y *WT1*. Sólo uno de los pacientes analizados no presentó alteraciones citogenéticas ni moleculares detectadas por las técnicas empleadas.

En la Figura 11 se muestra la correlación entre las distintas mutaciones encontradas, el diagnóstico y las principales características citogenéticas de los

pacientes. Las mutaciones de los genes se encuentran descritas en la Tabla 28 atendiendo a grupos de categorías funcionales y gen mutado, respectivamente. Ninguna de las comparaciones entre los distintos genes en función del diagnóstico mostró diferencias estadísticamente significativas.

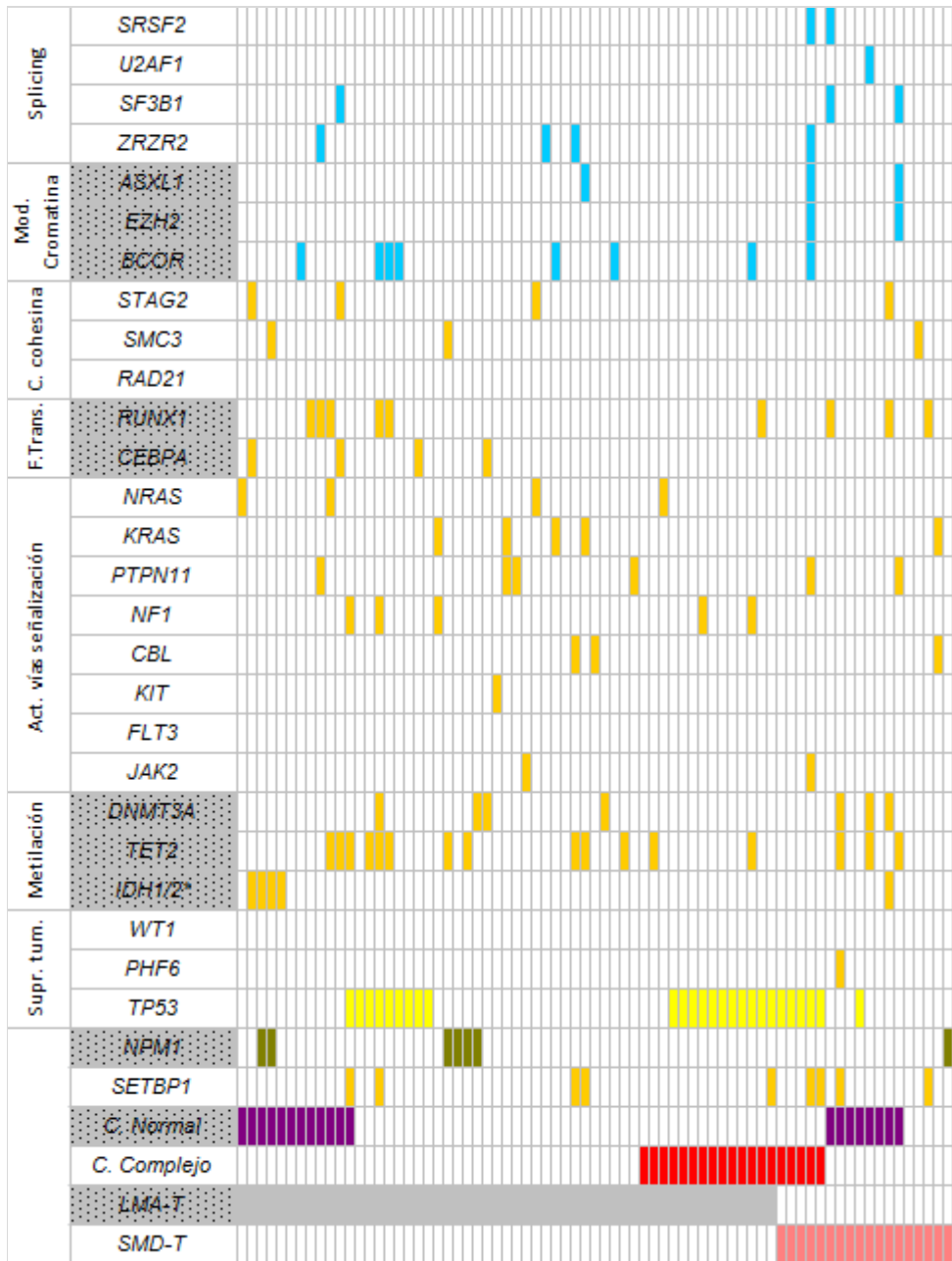


Figura 11. Distribución de mutaciones analizadas por NGS en los pacientes con NMRT.

Tabla 28. Distribución de los pacientes en función de las mutaciones

Subtipo genético N (%)	Gen	NMRT-t	LMA-t	SMD-t	P
		N=74 (%)	N= 55 (%)	N=19 (%)	
<b>Splicing 10 (14)</b>	<b>SRSF2</b>	2 (3)	0	2 (11)	ns
	<b>U2AF1</b>	1 (1)	0	1 (6)	ns
	<b>SF3B1</b>	3 (4)	1 (2)	2 (11)	ns
	<b>ZRZR2</b>	4 (5)	3 (6)	1 (6)	ns
<b>Modificadores de la Cromatina 13 (18)</b>	<b>ASXL1</b>	3 (4)	1 (2)	2 (11)	ns
	<b>EZH2</b>	2 (3)	0	2 (11)	ns
	<b>BCOR</b>	8 (11)	7 (13)	1 (5)	ns
<b>Complejo de la Cohesina 9 (12)</b>	<b>STAG2</b>	4 (5)	3 (6)	1 (6)	ns
	<b>SMC3</b>	4 (5)	2 (4)	2 (11)	ns
	<b>RAD21</b>	1 (1)	1 (2)	0	ns
<b>Factores de transcripción mieloide 14 (19)</b>	<b>RUNX1</b>	9 (12)	6 (11)	3 (16)	ns
	<b>CEBPA</b>	5 (7)	4 (7)	1 (6)	ns
<b>Activadores vía Señalización 26 (35)</b>	<b>NRAS</b>	4 (5)	4 (7)	0	ns
	<b>KRAS</b>	5 (7)	4 (7)	1 (5)	ns
	<b>PTPN11</b>	6 (8)	4 (7)	2 (11)	ns
	<b>NF1</b>	5 (7)	5 (9)	0	ns
	<b>CBL</b>	3 (4)	2 (4)	1 (5)	ns
	<b>KIT</b>	1 (1)	1 (2)	0	ns
	<b>FLT3</b>	0	0	0	ns

Subtipo genético N (%) Gen		NMRT-t N=74 (%)	LMA-t N= 55 (%)	SMD-t N=19 (%)	P
	<b>JAK2</b>	2 (3)	1 (2)	1 (5)	ns
Metilación DNA 29 (39)	<b>DNMT3A</b>	7 (9)	4 (7)	3 (16)	ns
	<b>TET2</b>	17	14 (26)	3 (16)	ns
	<b>IDH1/2*</b>	5 (7)	4 (7)	1 (5)	ns
Genes supresores tumores 28 (30)	<b>WT1</b>	0	0	0	ns
	<b>PHF6</b>	1 (1)	0	1 (5)	ns
	<b>TP53</b>	27 (36)	20 (36)	7 (37)	ns
<b>SETBP1 10 (14)</b>		10 (14)	5 (9)	5 (26)	ns
<b>NPM1 7 (10)</b>		7 (9)	6 (11)	1 (5)	ns

\* No Mutaciones en *IDH1* 1 no significativa

En la Tabla I y II de los anexos se describen de forma específica las mutaciones detectadas en los pacientes.

En la Tabla 29 se muestra la distribución de los pacientes de acuerdo a la clasificación propuesta por Lindsley *et al* (2015).

**Tabla 29. Distribución de los pacientes en función de los subgrupos descritos por Lindsley *et al.*, 2015.**

Subgrupos	NMRT N (%)	LMA-t N (%)	SMD-t N (%)	P
<b>Secondary-type</b>	15 (41)	11 (20)	4 (21)	ns
<b>De novo/PanLMA mutaciones</b>	30 (41)	24 (44)	6 (32)	ns
<b>TP53</b>	27 (36)	20 (36)	7 (37)	ns



Los pacientes con mutaciones en *TP53* presentaron menor frecuencia de cariotipo normal (8% vs. 39%;  $P < 0,01$ ) y una mayor frecuencia de cariotipo complejo (65% vs. 7%;  $P < 0,01$ ), cariotipo monosómico (58% vs. 7%;  $P < 0,01$ ) y alteraciones de los cromosomas 5 y/o 7 (69% vs. 22%;  $P < 0,01$ ). Estos resultados se mantuvieron para los pacientes con LMA-t. En los pacientes con SMD-t se observó asociación estadísticamente significativa entre los pacientes con *TP53* mutado y cariotipo complejo (71% vs. 0%;  $P < 0,01$ ) y monosómico (71% vs. 0%;  $P < 0,01$ ).

## 5.5 Relación entre citogenética y perfil mutacional

### 5.5.1 Pacientes con cariotipo normal

Los pacientes con cariotipo normal presentaron una menor frecuencia de mutaciones del grupo de genes supresores de tumores (15% vs. 46%;  $P = 0,01$ ), una mayor frecuencia de mutaciones *secondary-type* (40% vs. 14%;  $P = 0,01$ ), de mutaciones en genes del *splicing* (25% vs. 6%;  $P = 0,03$ ), en genes de la cohesina (35% vs. 13%;  $P = 0,04$ ), así como, en los genes implicados en la metilación del DNA (60% vs. 25%;  $P = 0,01$ ) y en los catalogados dentro del grupo de factores de transcripción (35% vs. 13%;  $P = 0,04$ ). También presentaron una menor frecuencia de mutaciones en *TP53* (10% vs. 46%;  $P < 0,01$ ) y una mayor frecuencia de mutaciones en *IDH2* (25% vs. 0%;  $P < 0,01$ ).

Analizando separadamente los pacientes con LMA-t y cariotipo normal presentaron una mayor frecuencia de mutaciones en los genes relacionados con los factores de transcripción (42% vs. 12%;  $P = 0,02$ ) y los implicados en la metilación (66% vs. 31%;  $P = 0,03$ ) así como una menor frecuencia de alteraciones en los genes supresores de tumores (8% vs. 43%;  $P = 0,03$ ). Como en la serie global, los pacientes con LMA-t también tuvieron una menor frecuencia de *TP53* (8% vs. 43%;  $P = 0,03$ ) y mayor de *IDH2* (33% vs. 0%;  $P < 0,01$ ).

Ocho pacientes con SMD-t presentaron cariotipo normal presentando una mayor frecuencia de las consideradas *secondary type mutations* (50% vs. 0%;  $P = 0,02$ ) y de los genes implicados en metilación (50% vs. 0%;  $P = 0,02$ ).

### 5.5.2 Pacientes con cariotipo complejo

Los pacientes con cariotipo complejo presentaron una menor frecuencia de *secondary type mutations* (0% vs. 29%;  $P<0,01$ ), mutaciones del grupo *de novo*/Pan LMA (15% vs. 52%;  $P<0,01$ ) y de los genes implicados en la metilación (15% vs. 42%;  $P=0,03$ ) y una mayor frecuencia de mutaciones en los genes catalogados como supresores de tumores (85% vs. 19%;  $P<0,01$ ). También presentaron una mayor frecuencia de mutaciones de *TP53* (85% vs. 17%;  $P<0,01$ ). Estos resultados se mantuvieron cuando se analizaron por separado las series de LMA-t y SMD-t con cariotipo complejo.

### 5.5.3 Pacientes con cariotipo monosómico

Los pacientes con cariotipo monosómico presentaron una menor frecuencia de mutaciones *de novo*/Pan LMA (6% vs. 54%;  $P<0,01$ ), de genes activadores de señales (11% vs. 37%;  $P=0,03$ ), así como de genes implicados en la metilación (6% vs. 44%;  $P<0,01$ ), mientras que mostraron una mayor frecuencia de mutaciones en genes supresores de tumores (83% vs. 22%;  $P<0,01$ ). Asimismo, presentaron menor frecuencia de mutaciones en *TET2* (5% vs. 30%;  $P=0,03$ ) y una mayor frecuencia de mutaciones en *TP53* (83% vs. 21%;  $P<0,01$ ). Estos resultados fueron similares en los pacientes con LMA-t. Los 5 pacientes con SMD-t y cariotipo monosómico tuvieron mutaciones de genes supresores de tumores ( $P<0,01$ ).

### 5.5.4 Pacientes con alteraciones de los cromosomas 5 y/o 7

Los pacientes con alteraciones en los cromosomas 5 y/o 7 presentaron una menor frecuencia de mutaciones *secondary-type* (7% vs. 29%;  $P=0,02$ ), de mutaciones *de novo*/Pan LMA (25% vs. 52%;  $P=0,02$ ), de genes implicados en la metilación (18% vs. 45%;  $P=0,02$ ). En cambio, una mayor frecuencia de mutaciones de genes supresores de tumores (64% vs. 20%;  $P<0,01$ ). Resultados similares se observaron en los pacientes con LMA-t. Sin embargo, estas asociaciones no pudieron confirmarse en los pacientes con SMD-t.

Las mutaciones en *DNMT3A* fueron menos frecuentes en los pacientes con cariotipo monosómico (0% vs. 16%;  $P=0,03$ ), mientras que fueron más frecuentes las mutaciones en *TP53* (64% vs. 18%;  $P<0,01$ ). Ésta última asociación con *TP53* también pudo demostrarse en los pacientes con LMA-t (65% vs. 18%;  $P<0,01$ ).

### **5.5.5 Pacientes con traslocaciones balanceadas**

Los 10 pacientes con LMA-t con traslocación balanceada únicamente presentaron mayor frecuencia de mutaciones en los genes activadores de señal (60% vs. 26%; P=0,04).

## **5.6 Factores con impacto en la supervivencia global, supervivencia libre de evento e incidencia acumulada de recaída**

### **5.6.1 Análisis univariante de las características clínico-biológicas**

Cincuenta y cinco pacientes que recibieron tratamiento fueron incluidos en los estudios de supervivencia. La mediana de seguimiento para los pacientes vivos fue de 17 meses. En la Tabla 30 se muestran los resultados del análisis univariante para SG, SLE y CIR de las principales características clínico-biológicas de la serie global.

Tabla 30. Análisis univariante del impacto pronóstico de las características clínico-biológicas en la SG de las NMRT.

	SG al año						SLE al año			CIR al año				
	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	LMA-t (%)	P	N (%)	SMD-t (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P		
<b>Edad</b>			ns			ns			ns			ns		
<60	24 (44)	54		20 (44)	55		4 (40)	50		16 (52)	38		16 (52)	38
≥60	31 (56)	37		25 (56)	36		6 (60)	40		15 (48)	33		15 (48)	40
<b>Sexo</b>			ns			ns			ns			ns		
Hombre	25 (45)	36		21 (47)	38		4 (40)	25		13 (42)	39		13 (42)	31
Mujer	30 (55)	52		24 (53)	50		6 (60)	60		18 (58)	33		18 (58)	44
<b>Leucocitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>			ns			ns			ns			ns		
<30	47 (85)	39		38 (84)	40		9 (90)	38		25 (81)	40		25 (81)	36
≥30	8 (15)	75		7 (16)	57		1 (10)	100		6 (19)	17		6 (19)	50
<b>PMN (x10<sup>9</sup>/L)</b>			ns			ns			ns			ns		<b>0,04</b>
<800	21 (38)	38		20 (44)	35		1 (10)	100		12 (39)	50		12 (39)	17
≥800	34 (62)	49		25 (56)	52		9 (90)	37		19 (61)	26		19 (61)	53
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>			ns			ns			ns			ns		

	SG al año									SLE al año			CIR al año		
	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	LMA-t (%)	P	N (%)	SMD-t (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P
<10	33 (60)	46		29 (64)	45		4 (40)	50		20 (65)	35		20 (65)	45	
≥10	22 (40)	43		16 (36)	44		6 (60)	40		11 (35)	37		11 (35)	27	
<b>Plaquetas (×10<sup>9</sup>/L)</b>			ns			ns			ns			ns			ns
<100	48 (87)	45		38 (84)	45		4 (40)	33		26 (84)	35		26 (84)	39	
≥100	7 (13)	43		7 (16)	44		6 (60)	50		5 (16)	40		5 (16)	40	
<b>Plaquetas (×10<sup>9</sup>/L)</b>			ns			ns			ns			ns			ns
<50	33 (60)	35		29 (64)	35		4 (40)	33		16 (52)	38		16 (52)	31	
≥50	22 (40)	59		16 (13)	63		6 (60)	50		15 (48)	33		15 (48)	47	
<b>Diagnóstico FAB</b>			ns			na			na						
LMA-t	45 (82)	44													
SMD-t	10 (18)	44													
<b>Riesgo citogenético*</b>			<0,01			0,01			ns			0,05			ns
Favorable	8 (15)	63		8 (18)	63		0			7 (23)	57		7 (23)	29	
Intermedio	19 (36)	53		16 (36)	50		3 (33)	66		14 (45)	29		14 (45)	29	

## Resultados

	SG al año						SLE al año			CIR al año					
	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	LMA-t (%)	P	N (%)	SMD-t (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P			
Adverso	26 (49)	36		20 (46)	30		6 (66)	40		9 (32)	33		9 (32)	55	
<b>Riesgo citogenético**</b>			<b>0,02</b>			<b>0,04</b>			ns						ns
Favorable	5 (9)	80		5 (11)	80		0			4 (13)	50		4 (13)	50	
Intermedio	14 (27)	57		12 (28)	50		2 (22)	50		10 (33)	20		10 (33)	40	
Adverso	29 (55)	32		22 (50)	27		7 (78)	50		11 (37)	36		11 (37)	36	
No aplicable***	5 (9)	60		5 (11)	60		0			5 (17)	60		5 (17)	20	
<b>Tto. previo alquilantes</b>			<b>0,02</b>			<b>0,03</b>			ns						ns
No	38 (69)	35		31 (70)	36		7 (70)	33		19 (61)	29		19 (61)	38	
Sí	17 (31)	65		14 (30)	64		3 (30)	67		12 (39)	33		12 (39)	40	
<b>LPA-t</b>			<b>0,02</b>			<b>0,02</b>			<b>na</b>				<b>0,03</b>		ns
No	50 (91)	43		40 (89)	43					26 (84)	31		26 (84)	42	
Sí	5 (9)	60		5 (11)	80					5 (16)	60		5 (16)	20	

SG: supervivencia global SLE: supervivencia libre de evento CIR: incidencia acumulada de recaída

\*De acuerdo a la clasificación MRC 2010 (Grimwade *et al.*, 2010)

\*\*De acuerdo a la clasificación ELN 2017 (Döhner *et al.*, 2017)

\*\*\* Corresponden a los pacientes con diagnóstico de LPA que no se engloban en el índice

ns: No significativa

En relación con la SG, la mediana de supervivencia de la serie global fue de 9,3 meses (IC 95%: 5,2-13,4) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). las variables que mostraron una influencia pronóstica favorable significativa fueron el tratamiento previo únicamente con agentes alquilantes ( $P=0,02$ ) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y que la enfermedad desarrollada como evento secundario fuera una LPA-t ( $P=0,02$ ) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Debemos señalar que la aplicación de las clasificaciones genéticas MRC 2010 y ELN 2017 a los pacientes también demostró diferencias significativas en la SG, pero sólo cuando se compararon los pacientes con genética favorable comparados con el resto (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Al excluir las LPA-t del análisis, ninguna variable alcanzó significación estadística.

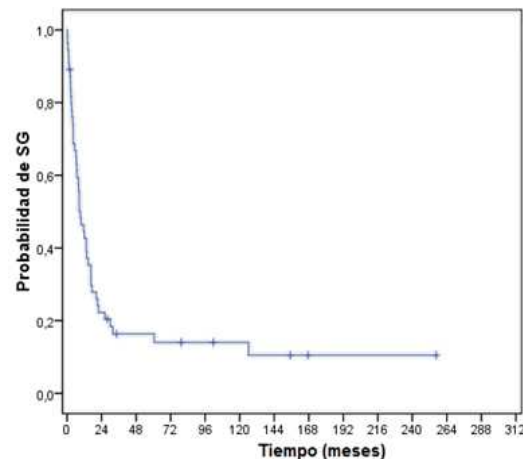


Figura 12. SG de los pacientes con NMRT que recibieron tratamiento.

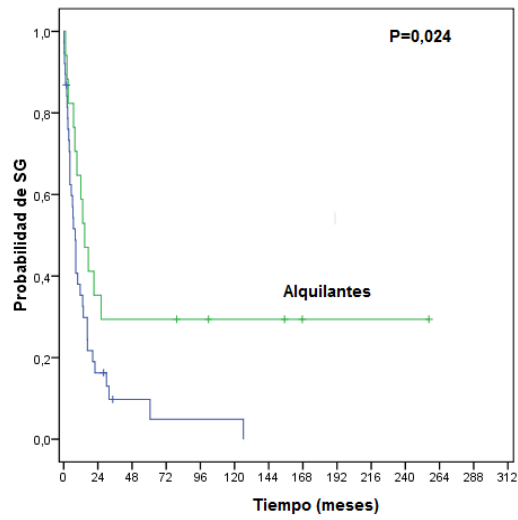


Figura 13. SG de los pacientes con NMRT en función del tratamiento previo.

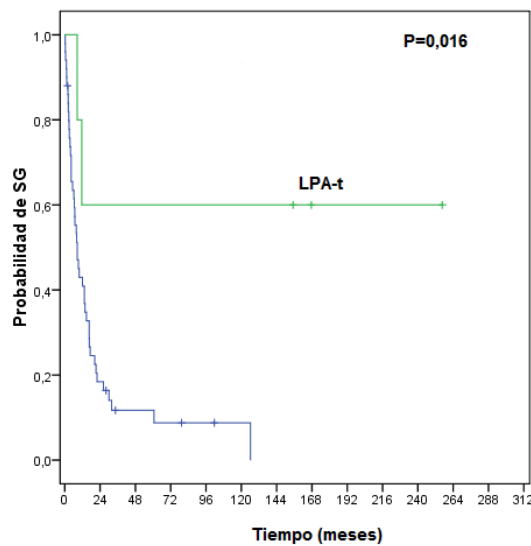


Figura 14. SG de los pacientes con NMRT en función del diagnóstico de LPA-t.



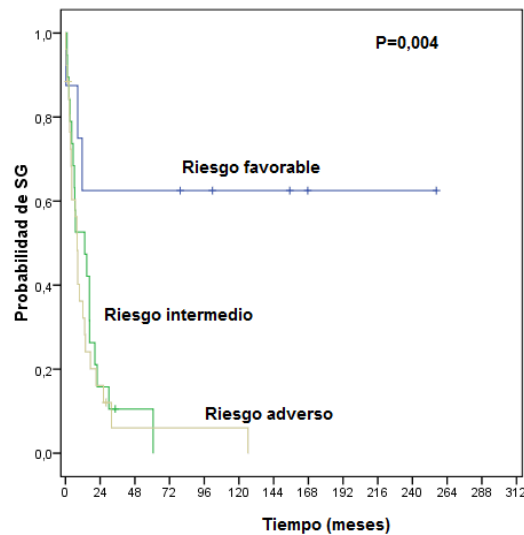


Figura 15. SG de los pacientes con NMRT en función del riesgo citogenético MRC2010.

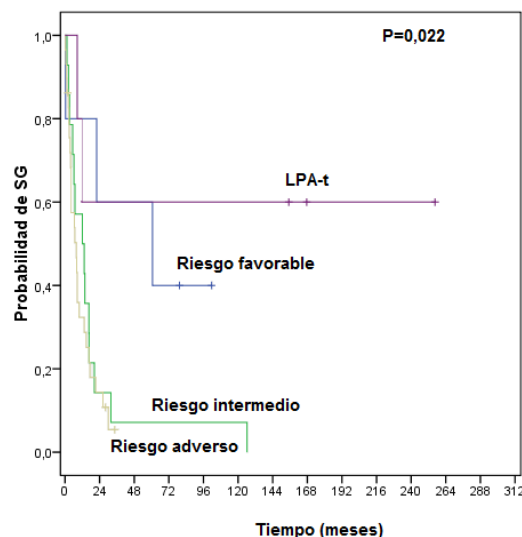


Figura 16. SG de los pacientes con NMRT en función del riesgo citogenético ELN2017 incluyendo las LPA-t.

Con respecto a la SLE, la mediana de la serie global fue de 7,8 meses (IC 95%: 5,5-10,1). La única variable que mostró un impacto favorable en la SLE fue el diagnóstico de LPA-t ( $P=0,03$ ) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El tamaño muestral no permitió el análisis por subgrupos LMA-t y SMD-t. Al igual que en la SG, la aplicación de las clasificaciones genéticas MRC 2010 y ELN 2017 a los pacientes también demostró diferencias significativas en la SLE, pero sólo cuando se

compararon los pacientes con citogenética favorable comparados con el resto (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

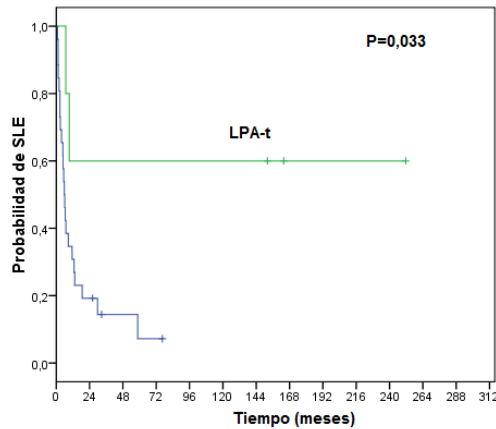


Figura 17. SLE de las LPA-t respecto al resto de NMRT

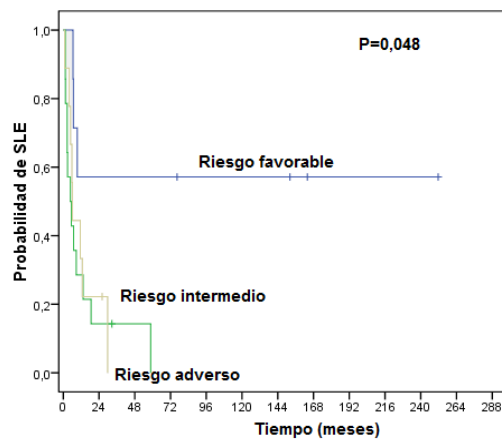


Figura 18. SLE de los pacientes con NMRT en función del riesgo citogenético (MRC 2010).

La incidencia acumulada de recaída (CIR) de la serie global a los 12 meses fue del 32%. La única variable asociada con un mayor riesgo de recaída en la serie global fue el valor del recuento de PMN  $\geq 800 \times 10^9/L$  ( $P=0,04$ ) como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**. Al igual que para la SLE, el tamaño muestral no permitió el análisis univariante de la CIR por subgrupos LMA-t y SMD-t.

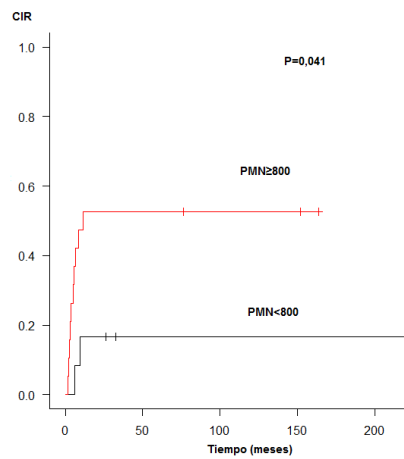


Figura 19. CIR de los pacientes con NMRT en función del recuento de PMN.

### 5.6.2 Análisis univariante de las características moleculares

En la Tabla 31 se muestran los resultados del análisis univariante para SG, SLE y CIR de las principales características moleculares de la serie global.

Tabla 31. Análisis univariante del impacto pronóstico de las características moleculares en la SG/SLE/CIR de las NMRT.

	SG al año									SLE al año			CIR al año		
	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	LMA-t (%)	P	N (%)	SMD-t (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P
<b>Secondary type</b>			ns			ns			ns			ns			ns
No	24 (77)	33		35 (80)	43		9 (90)	38		24 (77)	33		24 (77)	42	
Si	7 (23)	43		10 (20)	50		1 (10)	100		7 (23)	43		7 (23)	29	
<b>de novo/PanLMA</b>			ns			<b>0,04</b>			ns			ns			ns
No	32 (58)	25		26 (58)	23		6 (60)	33		15 (48)	33		15 (48)	40	
Si	23 (42)	73		19 (42)	74		4 (40)	67		16 (52)	38		16 (52)	38	
<b>Splicing</b>			ns			ns			<b>0,01</b>			ns			ns
No	50 (91)	45		41 (91)	44		9 (90)	50		27 (87)	33		27 (87)	41	
Si	5 (9)	40		4 (9)	50		1 (10)	0		4 (13)	50		4 (13)	25	
<b>M. Cromatina</b>			ns			ns			<b>0,01</b>			ns			ns
No	47 (85)	46		38 (84)	45		9 (90)	50		26 (84)	35		26 (84)	42	
Si	8 (15)	38		7 (16)	43		1 (10)	0		5 (16)	40		5 (16)	20	

	SG al año									SLE al año			CIR al año		
	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	LMA-t (%)	P	N (%)	SMD-t (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P
<b>Cohesina</b>			ns			ns			ns			ns			ns
No	47 (85)	44		40 (89)	43		7 (70)	43		26 (84)	35		26 (84)	39	
Si	8 (15)	38		5 (11)	40		3 (30)	50		5 (16)	40		5 (16)	40	
<b>F. Transcripción</b>			ns			ns			ns			ns			ns
No	44 (80)	44		37 (82)	43		7 (70)	50		26 (84)	31		26 (84)	42	
Si	11 (20)	46		8 (18)	50		3 (30)	33		5 (16)	60		5 (16)	20	
<b>A. Señales</b>			ns			ns		3 (30)	ns			ns			ns
No	36 (65)	34		28 (62)	43		8 (80)	43		18 (58)	28		18 (58)	39	
Si	19 (35)	63		17 (38)	59		2 (20)	50		13 (42)	46		13 (42)	39	
<b>Metilación</b>			ns			ns			ns			ns			ns
No	36 (65)	37		28 (62)	39		8 (80)	29		19 (61)	32		19 (61)	42	
Si	19 (35)	58		17 (38)	53		2 (20)	100		12 (39)	42		12 (39)	33	
<b>Gen Supresor</b>			<b>0,03</b>			<b>0,03</b>			ns			ns			ns
No	35 (64)	56		29 (64)	59		7 (70)	50		25 (80)	36		25 (80)	36	

Resultados

	SG al año									SLE al año			CIR al año		
	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	LMA-t (%)	P	N (%)	SMD-t (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P	N (%)	NMRT (%)	P
Si	20 (36)	25		16 (36)	19		3 (30)	33		6 (20)	33		6 (20)	50	
<b>TP53</b>			<b>0,02</b>			<b>0,03</b>			ns			ns			ns
No	36 (65)	57		29 (64)	59		7 (70)	50		25 (80)	43		25 (80)	36	
Si	19 (35)	21		16 (36)	19		3 (30)	33		6 (20)	59		6 (20)	50	
<b>DNMT3A</b>			<b>0,04</b>			<b>0,04</b>			ns			ns			ns
No	50 (91)	9		42 (93)	41		7 (70)	50		28 (90)	33		28 (90)	42	
Si	5 (9)	30		3 (7)	66		3 (30)	33		3 (10)	43		3 (10)	33	
<b>NRAS sle/cir</b>			ns			ns			na			<b>0,01</b>			<b>0,05</b>
No	51 (92)	45		41 (94)	43					28 (90)	39		28 (90)	36	
Si	4 (8)	40		4 (8)	59					3 (10)	0		3 (10)	67	

SG: supervivencia global SLE: supervivencia libre de evento CIR: incidencia acumulada de recaída  
 ns: No significativa

Las alteraciones que se asociaron de forma significativa con una peor SG en el análisis univariante fueron la presencia mutaciones en *TP53* ( $P=0,02$ ) (Figura 20), en los genes supresores de tumores ( $P=0,03$ ). Por el contrario, la presencia de mutaciones en *DNMT3A* ( $P=0,04$ ) (Figura 21) consideradas *de novo*/Pan LMA ( $P=0,04$ ) (Figura 22) se asociaron de forma significativa con una mejor SG. Resultados similares se observaron cuando se analizaron por separado las series de LMA-t y SMD-t.

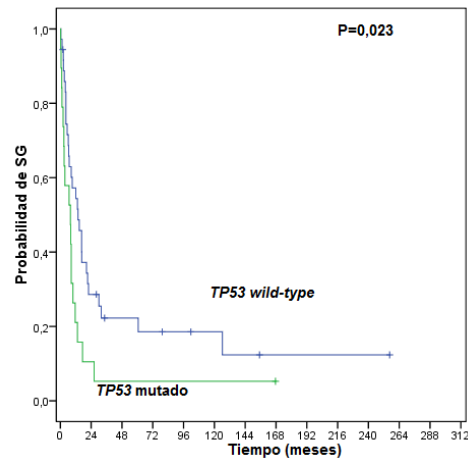


Figura 20. SG de los pacientes con NMRT con mutaciones en *TP53*.

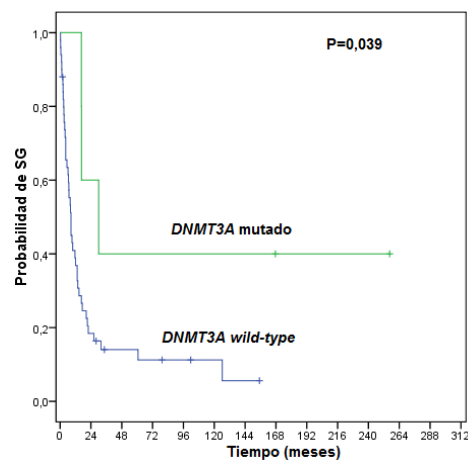
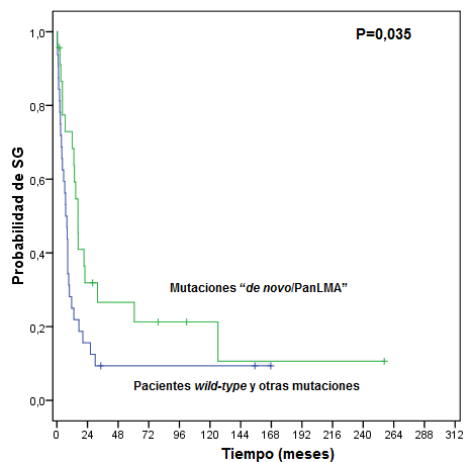
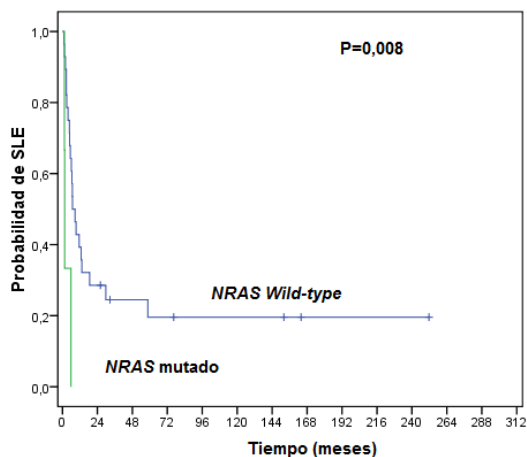


Figura 21. SG de los pacientes con NMRT con mutaciones en *DNMT3A*.



**Figura 22. SG de los pacientes con NMRT con alteraciones consideradas como mutaciones de novo/panLMA.**

En el análisis de la SLE, la única alteración genética que se asoció de forma significativa con una peor SLE fue la presencia de mutaciones en *NRAS* ( $P=0,01$ ) (Figura 23).



**Figura 23. SLE de los pacientes con NMRT con mutaciones en *NRAS*.**

En el análisis de la CIR, la única variable que alcanzó significación estadística fue la presencia de mutaciones en *NRAS* ( $P=0,05$ ) (Figura 24).



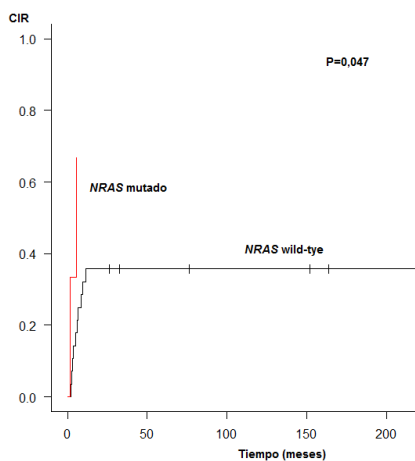


Figura 24. CIR en los pacientes con NMRT en función de la presencia de mutaciones de *NRAS*.

### 5.6.3 Análisis multivariante

En la Tabla 32 se muestran los resultados del análisis multivariante para SG, SLE y CIR.

Tabla 32. Análisis multivariante de la SG, SLE y CIR en los pacientes con NMRT

SG			SLE			CIR		
	HR (IC 95%)	P		HR (IC 95%)	P		HR (IC 95%)	P
<b>LPA-t</b>	0,14 (0,03-0,61)	0,03	<b>NRAS</b>	5,64 (1,50-21,25)	0,02	<b>Cariotipo complejo</b>	1,03 (1,02-1,05)	<0,01
<b>TP53</b>	2,60 (1,40-4,82)	0,01	<b>Cariotipo Monosómico</b>	1.04 (1,00-1,05)	0,04			



## **6 . DISCUSIÓN**



Los resultados del presente estudio muestran que las enfermedades de base más frecuentes en los pacientes que desarrollaron una NMRT fueron el cáncer de mama (27%), linfoma no Hodgkin (24%), mieloma múltiple (10%) y otra neoplasia mieloide (10%), mientras que una miscelánea de otras enfermedades representaron de conjunto el resto de la serie. Los agentes alquilantes y los inhibidores de la topoisomerasa II, solos o en combinación fueron los agentes quimioterápicos implicados en la inmensa mayoría de los casos, destacando que una cuarta parte de los pacientes habían sido sometidos a un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. Con respecto a las características citogenéticas debemos destacar la mayoritaria presencia de una alteración cromosómica en los pacientes con LMA-t (78%), siendo algo menor en los pacientes con SMD-t (56%). Las alteraciones de los cromosomas 5 y 7, así como otras alteraciones complejas fueron las alteraciones más comunes. A destacar la ausencia de monosomías parciales o totales de los cromosomas 5 y 7 en los pacientes que habían recibido sólo inhibidores de la topoisomerasa II. Se confirma el pronóstico peyorativo de las alteraciones citogenéticas monosómicas en la SLE y del cariotipo complejo en la tasa de recaída. Como en las LMA *de novo*, los pacientes con LPA-t tuvieron un pronóstico más favorable que el resto de LMA-t. A destacar el valor pronóstico independiente en la SG de las mutaciones de *TP53* y de las mutaciones de *NRAS* en la SLE.

Aunque son evidentes algunas debilidades de nuestro estudio, que en gran medida son comunes a la mayoría de los estudios de cohortes históricas, no es menos cierto que el enfoque del estudio nos aporta información de interés, especialmente en el aspecto menos estudiado, como es el perfil mutacional de las NMRT. Quizás la limitación más notable sea el tamaño muestral, especialmente en el subgrupo de pacientes con SMD-t. Aunque en términos relativos es una serie importante, la realización de análisis en subgrupos puede mermar la potencia estadística del mismo y no poner de manifiesto asociaciones estadísticamente significativas, como las reportadas en alguno de los estudios disponibles en la literatura (Lindsley *et al.*, 2015; Mauritzson *et al.*, 2002). Como la mayoría de los estudios publicados de pacientes con NMRT, nuestros pacientes también fueron tratados con esquemas terapéuticos diversos a lo largo del periodo de estudio. Por esta razón, entre otras, no es tarea fácil comparar los análisis de supervivencia con los reportados en otros estudios (Shih *et al.*, 2013; Lindsley *et al.*, 2015). Por otro lado, la metodología empleada tiene también limitaciones que deben ser tenidas en cuenta. Así, los métodos de NGS no permiten estudiar con exactitud determinadas regiones del genoma al no poder garantizar una

cobertura completa, además no se seleccionaron variantes por debajo de 25 lecturas. Otro aspecto a tener en cuenta es que los análisis se realizaron con DNA de las muestras tumorales, por lo que no pueden descartarse alteraciones germinales potencialmente hereditarias. Finalmente, cometimos inicialmente un error de diseño en el panel que no permitió el correcto análisis del exón 12 de *ASXL1*, que si se confirma su interés deberemos resolver con nuevas muestras en el futuro.

Las características de la cohorte de nuestro estudio es similar a la mayoría de los estudios publicados (Kartarjian *et al.*, 1986; Le Beau *et al.*, 1986; Czader *et al.*, 2009; Cervera *et al.*, 2007; Kayser *et al.*, 2011), siendo los tumores sólidos, especialmente cáncer de mama y linfoma no Hodgkin, el antecedente de enfermedad de base previa más frecuente, seguido de las enfermedades oncohematológicas y los procesos autoinmunes. Aunque un la cuarta parte de los pacientes en nuestro estudio tenía el antecedente de un LNH, esta proporción es inferior a la reportada por otros grupos, en las que los pacientes con LNH representan en torno al 45-50% (Kayser *et al.*, 2011; Bueso-Ramos *et al.*, 2015). Esta observación podría justificarse por un sesgo de selección de los pacientes, posiblemente relacionado con que la disponibilidad de DNA fuese un criterio de inclusión en el estudio. Es posible que este requerimiento hubiese llevado a una selección de pacientes diagnosticados más recientemente en los que el uso de radioterapia es mucho más restringido que en otras épocas pasadas, en las que los esquemas más clásicos de tratamiento recurrían con relativa frecuencia al uso de radioterapia. Merece también algún comentario la baja proporción de pacientes que tenían el antecedente de EH (3%), lo que contrasta con otras series en las que está enfermedad era la segunda más frecuente entre las enfermedades hematológicas (Kayser *et al.*, 2011). Este hallazgo está en línea con lo observado por el registro alemán de EH, en el que el antecedente de esta enfermedad en pacientes que desarrollaron una NMRT era también mucho menor que lo reportado previamente en la literatura (Eichenauer *et al.*, 2015). También en este caso, como lo argumentado más arriba para los LNH, esto podría deberse al cambio en los esquemas de tratamiento de la EH, implicando un menor uso de RT que en tiempos pretéritos.

La mayor frecuencia de antecedente de cáncer de mama en el grupo de los pacientes con LMA-t comparado con los SMD-t podría estar justificado por los cambios en los tratamientos previos administrados en los pacientes, así como, la naturaleza de la serie, detalles que se exponen a continuación, o bien, porque las pacientes no

fueron diagnosticadas en la fase previa de SMD-t si no ya directamente como LMA-t, pasando esta fase previa inadvertida.

La relación entre los tratamientos previos y los tipos de NMRT en nuestros pacientes discrepa en algunos aspectos de lo publicado por otros autores. Los pacientes tratados con agentes alquilantes y/o RT en nuestro estudio se presentaron con mayor frecuencia como LMA-t, mientras que la mayor parte de pacientes con SMD-t habían recibido tratamiento previo con inhibidores de la topoisomerasa II. Este hallazgo es aparentemente contrario a lo descrito clásicamente, donde la exposición a inhibidores de topoisomerasa II se ha asociado con mayor frecuencia a al desarrollo de una LMA-t. Sin embargo, como ya se han hecho eco otros grupos, los cambios y combinaciones de los tratamientos oncológicos actuales hacen más difícil separar a los pacientes de NMRT como se hacía clásicamente. Quizás por ello, la clasificación de la OMS, en su versión de 2008, ya excluyó el tratamiento previo como elemento diferenciador (Smith *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2011). En los pacientes de nuestra serie, sólo un 29% de los pacientes que recibieron inhibidores de topoisomerasa II lo hicieron de forma aislada, mientras que el resto había recibido estos fármacos en combinaciones con agentes alquilantes y/o RT. Esto podría corresponder a un cambio de tendencia en el tratamiento más manifiesto en los pacientes con diagnóstico más reciente, cuyo sesgo de selección vendría determinado, como se ha comentado anteriormente para los LNH y EH, por la disponibilidad de DNA en los pacientes más recientes.

En relación con los tiempos de latencia desde la exposición a la terapia leucemogénica de la enfermedad de base hasta el diagnóstico de NMRT, los observado en este estudio no difiere significativamente de lo reportado en otras series, ni tampoco fue diferente entre LMA-t y SMD-t (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2002<sup>a</sup>; 2006<sup>b</sup> y 2008<sup>c</sup>; Smith *et al.*, 2003; Arber *et al.*, 2008; Czader *et al.*, 2009).

La frecuencia y distribución de las anormalidades citogenéticas previamente comentadas, que afectaron prioritariamente a la pérdida de material de los cromosomas 5 y 7, y que con frecuencia se observaron en el contexto de cariotipos complejos (28%) y monosómicos (25%) mostraron ser más comunes que lo descrito en los pacientes con LMA *de novo*, (Le Beau *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1998; Mauritzson *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2011). Por otro lado, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con LMA-t

y SMD-t, salvo por lo referente a las traslocaciones balanceadas, sólo presentes en el primer grupo justificado por la propia definición de LMA.

El estudio de la relación entre el tratamiento previo y las alteraciones citogenéticas mostró una mayor frecuencia de alteraciones en los cromosomas 5 y 7 en los pacientes que fueron tratados con alquilantes y/o RT, similar a los observado por otros (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2002; Arber *et al.*, 2008). Esta relación entre el tipo de tratamiento previo y las anomalías citogenéticas no pudo establecerse con los cariotipos complejos. Cuando se analizó de forma aislada el uso de alquilantes (excluyendo los pacientes que recibieron RT) sólo se mostró asociación estadística con el desarrollo de traslocaciones balanceadas. En cuanto a los inhibidores de topoisomerasa II, pudimos demostrar su relación con la presencia de traslocaciones balanceadas como se reporta en la literatura (Andersen *et al.*, 1998; Sill *et al.*, 2011). Sin embargo, no podemos sacar conclusiones sólidas debido al escaso tamaño muestral a este respecto.

Es difícil comparar nuestros resultados con los publicados previamente en lo referente al perfil molecular de los pacientes con NMRT, principalmente debido a que son pocos los estudios que han empleado tecnología de NGS y, por tanto, no todos han analizado los mismos genes o lo han hecho de forma exhaustiva. Por otro lado, no todos los grupos analizan de forma conjunta pacientes con NMRT, siendo más habitual el estudio de pacientes con LMA-t como se muestra en la Tabla 33. Esta variabilidad en las técnicas empleadas y el perfil de los pacientes podrían justificar las diferencias encontradas entre otros grupos y nuestro estudio. Aunque se mantengan las características generales publicadas en otros trabajos, creemos que la diversidad de pacientes con NRMT aportado en el presente trabajo enriquece los resultados al permitir abordar de forma más completa esta enfermedad.



**Tabla 33. Selección de series publicadas que incluyeron estudios moleculares en pacientes con NMRT.**

	N	alt. %	TP53 N (%)	TET2 N (%)	SETBP1 N (%)	RUNX1 N (%)	ASXL1 N (%)	LMA-t/ SMDt	Técnica
OK <i>et al.</i> 2015	70	59	25 (36)	ND	ND	ND	ND	42/28	NGS <i>hotspot</i>
Lindsley <i>et al.</i> 2015	101	97	23 (23)	14 (14)	3 (3)	11 (11)	17 (17)	101	NGS genes completos
Pedersen- Bjergaard <i>et al.</i> 2008	140	72	34 (24)	ND	ND	22 (16)	ND	51/89	Sanger
Shih <i>et al.</i> 2013	38	42	8 (21)	4 (11)	ND	ND	1 (3)	6/32	Sanger
Voso <i>et al.</i> 2013	77	26	ND	ND	ND	ND	ND	77	NGS genes splicing
Ramsingh <i>et al.</i> 2012	23	35	2 (10)	8 (35)	ND	ND	3 (13)	23	WGS
Presente estudio	74	95	27 (37)	17 (23)	10 (14)	9 (12)	ND	55/19	NGS

1 Pendiente de publicación ND: no disponible

La frecuencia global de mutaciones del 95% en nuestra serie es superponible a la reportada por otros grupos que han aplicado una tecnología similar (Lindsley *et al.*, 2015); las discrepancias con otros grupos, en cambio, pueden justificarse porque no realizaron una cobertura tan amplia de genes, analizando únicamente regiones *hotspot* (Ok *et al.*, 2013). El resto de estudios muestra una frecuencia mutacional diversa (Tabla 33) pero siempre menor que la detectada en los pacientes del presente estudio. En este caso creemos que son las diferencias metodológicas las que justificarían en gran medida estos resultados, por la menor sensibilidad de la tecnología Sanger comparado con la NGS.

El análisis específico de los pacientes con LMA-t, mostró una frecuencia (95%) y una distribución de las mutaciones parecida a lo publicado por el grupo de Lindsley *et al.*, (2015), usando una metodología similar a la del presente estudio. En cambio, en otras series, los pacientes presentaron alteraciones entre el 26% y 86%. Esta

variabilidad podría justificarse, entre otros, por los genes candidatos a estudio, ya que Voso *et al.*, (2013) describieron una frecuencia de 26% de mutaciones, estudiaban genes implicados en la maquinaria del *splicing*, que generalmente se encuentran con más frecuencia alterados en pacientes con SMD. En los pacientes con SMD-t, la tasa de mutaciones fue superior a lo reportado por el resto de grupos (95%). Ello podría justificarse por la selección de genes, la baja representación de esta enfermedad en la mayoría de los estudios, o por la utilización de tecnología con menor sensibilidad que la NGS. El único grupo que empleó la misma metodología reportó una frecuencia mutacional menor, pero como se ha mencionado previamente, su análisis se limitó a determinadas regiones génicas. (Ok *et al.*, 2015). La comparativa del estado mutacional de los genes analizados entre los pacientes con LMA-t y SMD-t no mostró diferencias entre ambos. Este hecho se mantuvo en todas las comparaciones realizadas, bien de forma individual en cada gen así como cuando la comparación se estableció en base al grupo funcional.

La frecuencia de las alteraciones de los distintos genes en los pacientes de nuestro estudio (*TP53* 37%, *TET2* 23%, *SETBP1* 14%, y *RUNX1* 12%) fue únicamente comparable con lo reportado por Lindsley *et al.*, quienes usaron una metodología similar a la nuestra. Las discrepancias con el estudio de Lindsley *et al.* en la frecuencia de mutaciones del gen *ASXL1* se justificarían, como hemos comentado anteriormente, por el error en el diseño de nuestro panel.

La asociación entre las mutaciones de *TP53* con los cariotipos complejos, así como con alteraciones de los cromosomas 5 y 7 aisladas, coinciden con lo que ha sido previamente reportado. (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2008; Shigh *et al.*, 2013, Ok *et al.*, 2015; Lindsley *et al.*, 2015). La asociación de las mutaciones de *TP53* con el cariotipo monosómico no ha sido evaluada en otros estudios con quienes compararnos. Estas asociaciones, demostradas en el conjunto de las NMRT, se mantenían en los pacientes con LMA-t, pero no en los SMD-t. En estos últimos, únicamente se pudo establecer la relación entre la presencia de mutaciones en *TP53* y cariotipos complejos y monosómicos, probablemente debido al escaso número de pacientes en este subgrupo.

En relación con la asociación de la mutación de *TP53* y los agentes alquilantes reportada por Pedersen-Bjergaard *et al.*, (2008), nosotros no fuimos capaces de demostrarla ni en la serie global de NMRT ni en los subanálisis en los pacientes con LMA-t y SMD-t por separado. La asociación inversa entre las mutaciones del gen *TP53*

y las mutaciones de *NPM1* que encontramos en nuestro estudio no lo hemos encontrado descrito en otros estudios.

La ausencia de mutaciones en los genes *FLT3*, *IDH1* y *WT1* en los pacientes de la serie creemos que merece ser resaltada aunque estos genes no suelen encontrarse alterados en NMRT siendo la frecuencia descrita en *FLT3* y *IDH1* bastante inferior (5%) a la LMA *de novo* (Ok *et al.*, 2015) y del 3% en *WT1* de en el grupo de LMA-t (Lindsley *et al.*, 2015).

La estratificación de los pacientes del presente estudio de acuerdo al perfil mutacional propuesto por Lindsley *et al.* (2015), se hizo debido a que metodológicamente era el más similar al trabajo realizado en este proyecto de Tesis Doctoral. Un 20% de los pacientes de nuestro estudio se incluyeron en el grupo “*secondary type mutations*”, definido principalmente por las mutaciones en *ASXL1*; y un 41% presentaron mutaciones de tipo “*nova/pan LMA*”. Sin embargo, no pudieron confirmarse las características descritas por estos autores en cada subgrupo de pacientes, ya que, como se ha comentado anteriormente, un error en el diseño de la cobertura del gen *ASXL1* podría afectar al análisis de los resultados. Diferente es el caso de las mutaciones en *TP53*, cuya incidencia y asociación con los cariotipos complejos y una menor supervivencia global son similares a las descritas Lindsey *et al.* (2015).

El análisis multivariante demostró que las variables asociadas de forma independiente a la supervivencia fueros las mutaciones en *TP53*, confirmando un pronóstico adverso, y el diagnóstico de LPA-t con un pronóstico favorable, coincidiendo con lo reportado previamente en la literatura (Park *et al.*, 2013; Shing *et al.*, 2013; Lindsley *et al.*, 2015; Sevcikova *et al.*, 2016). La asociación entre las mutaciones del gen *NRAS* y el cariotipo monosómico con la SLE, así como de los cariotipos complejos con la incidencia acumulada de recaída debemos interpretarlos con cautela debido al número limitado de pacientes y la ausencia de bibliografía de referencia.

Finalmente, la aplicación de los sistemas de clasificación pronóstica para LMA *de novo* basados en la citogenética y el perfil mutacional (MRC 2010, ELN 2017), mostró capacidad para estratificar de forma significativa los grupos de pacientes de bajo y alto riesgo citogenético, pero sin poder discriminar entre los pacientes de riesgo intermedio y alto. Esto se justificaría porque son clasificaciones realizadas sobre

pacientes con enfermedad mieloide *de novo*, limitando por tanto su aplicación en los pacientes con NMRT.

## **7 . CONCLUSIONES**



1. La distribución de las enfermedades más comúnmente implicadas en el desarrollo de una NMRT mostró que el cáncer de mama y el linfoma no Hodgkin representaban algo más de la mitad de la serie (27% y 24%, respectivamente), el mieloma múltiple (10%), otra neoplasia mielode (10%) y una miscelánea de otras enfermedades representaron el resto de la serie (28%).
2. La mediana de latencia para el desarrollo de una NMRT fue de 61 meses (extremos 4 – 346), sin diferencias estadísticamente significativas entre la LMA-t y el SMD-t.
3. Los agentes alquilantes y los inhibidores de la topoisomerasa II, solos o en combinación, fueron los agentes quimioterápicos implicados en la inmensa mayoría de los casos. La radioterapia también estuvo implicada en una importante proporción de pacientes, de forma aislada o en combinación (16% y 31%, respectivamente). Una cuarta parte de los pacientes habían sido sometidos a un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.
4. Los pacientes que habían recibido tratamiento con agentes alquilantes y/o radioterapia se presentaron en su mayoría como LMA-t, mientras que los pacientes que recibieron inhibidores de topoisomerasa II lo hicieron en su mayoría como SMD-t.
5. En los pacientes con LMA-t encontramos un alteración cromosómica en el 78% de los casos, mientras que la proporción fue mas baja en los SMD-t (56%).
6. Las alteraciones citogenéticas más frecuentes fueron la monosomía del cromosoma 7 y la pérdida del brazo largo del cromosoma 5. Los pacientes con NMRT presentaron cariotipos complejos y monosómicos en el 25% y 28% de los casos, respectivamente. Salvo una proporción de pacientes con traslocaciones balanceadas en el grupo con LMA-t, que por definición excluyen el diagnóstico de SMD, no observamos diferencias en el perfil citogenético de los pacientes con LMA-t y SMD-t.
7. La metodología de NGS permitió detectar alteraciones moleculares en un 95% de los pacientes con NMRT, siendo los genes más frecuentemente mutados *TP53* (37%), *SETBP1* (14%) y *RUNX1* (12%).
8. Las diferencias encontradas en el perfil mutacional de las LMA-t y los SMD-t no fueron estadísticamente significativas ni cuando se compararon individualmente ni por categorías funcionales.

9. Las mutaciones de *TP53* se asociaron fuertemente con alteraciones citogenéticas de mal pronóstico como el cariotipo complejo (65%), cariotipo monosómico (58%) y alteraciones de los cromosomas 5 y/o 7 (69%).
10. Las variables que identificamos con valor pronóstico independiente para la SG, SLE y CIR fueron las siguientes
  - a. Supervivencia global: las mutaciones de *TP53* (peor si *TP53* mutado) y el diagnóstico de LPA-t (mejor si LPA).
  - b. Supervivencia libre de enfermedad: las mutaciones de *NRAS* (peor si *NRAS* mutado) y el cariotipo monosómico.
  - c. Incidencia acumulativa de recaída: el cariotipo complejo.
11. La aplicación de las clasificaciones citogenéticas MRC2010 y ELN2017 permitió discriminar en términos de supervivencia global entre los pacientes de alto y bajo riesgo, desdibujándose su capacidad de discriminar entre el riesgo intermedio y alto de ambas clasificaciones.



## **8 . BIBLIOGRAFÍA**



**A**

- Andersen MK, Christiansen DH, Jensen BA *et al.* Therapy-related acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report of two new cases and review of the literature since 1992. *Br J Haematol* 2001;114:539-43.
- Andersen MK, Johansson B, Larsen SO, Pedersen-Bjergaard J. Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica* 1998;83(6):483-8.
- Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Increased frequency of dicentric chromosomes in therapy-related MDS and AML compared to de novo disease is significantly related to previous treatment with alkylating agents and suggests a specific susceptibility to chromosome breakage at the centromere. *Leukemia* 2000;14(1):105-11.
- Antonijevic N, Suvajdzic N, Terzic T, *et al.* Favourable prognostic factors in therapy related acute myeloid leukaemia. *Srp Arh Celok Lek* 2011;139:347-52.
- Arber DA, Slovak ML, Popplewell L, *et al.* Therapy-related acute myeloid Leukemia/Myelodysplasia with balanced 21q22 translocations. *Am J Clin Pathol* 2002;117:306-13.
- Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, *et al.* Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities: WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. (ed. Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J.) World Health Organization. 2008. IARC press, Lyon, France.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-405.

**B**

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976. Aug;33(4):451-8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med* 1985;103(4):620-5.
- Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, *et al.* Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leuk Res* 2006;30(12):1471-91.
- Bolufer P, Collado M, Barragan E, *et al.* Profile of polymorphisms of drug-metabolising enzymes and the risk of therapy-related leukaemia. *Br J Haematol* 2007;136(4):590-6.

Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008; 26(29):4791-4797

Bueso-Ramos CE, Kanagal-Shamanna R, Routbort MJ, et al. Therapy-Related Myeloid Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2015;144:207-18.

Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002;100(13):4325-36.

## C

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* 2012;9:2636-57.

Cervera J, Moscardó F, Bolufer P, et al. Etiopatogenia de las leucemias agudas secundarias. *Haematologica/edición española* 2007;92 (Supl 1):13-8.

Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96(12):3671-74.

Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia: Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting

tandards for therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:4642–49.

Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, *et al.* Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* 2006;108(2):419-25

Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc B* 1972; 34:187-220.

Czader M, Orazi A. Therapy-related myeloid neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2009;132:410-25.

## **D**

Deguchi K and Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia* 2002;16:740–744.

Descasta A, Jenabian A, Conso F, Amelie J. Occupational exposures and haematological malignancies : overview on human recent data. *Cancer Causes Control* 2005 ;16:939-53.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424-47.

## **E**

Eichenauer DA, Thielen I, Haverkamp H, *et al.* Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in patients with Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group. *Blood* 2014;123:1658-64.

## **F**

Fabiani E, Falconi G, Fianchi L, *et al.* Clonal evolution in therapy-related neoplasms. *Oncotarget* 2017;8(7):12031-40.

Fine JP and Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association* 1999;94:446:496-509.

## **G**

Gaidzik VI, Paschka P, Spath D, *et al.* *TET2* mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol* 2012;30(12):1350-7.

Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, *et al.* Clonal hematopoiesis and blood cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014;371(26):2477-87.

- Gilliland DG, Gribben JG. Evaluation of the risk of therapy-related MDS/AML after autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(1):9-16.
- Gillis NK, Pharm D, Ball M *et al.* Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study. *The Lancet Oncology* 2017;18(1):112-21.
- Gonen M and Heller G. Concordance probability and discriminatory power in proportional hazards regression. *Biometrika* 2005;92(4): 965-70
- Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, *et al.* Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med* 1999;18(6):695-706.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120(12):2454-65.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F *et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322-33.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354-65.

## H

- Haddy N, Le Deley MC, Samand A, *et al.* Role of radiotherapy and chemotherapy in the risk of secondary leukaemia after a solid tumour in childhood. *Eur J Cancer* 2006;42:2757-64.
- Haferlach C, Dicker F, Herholz H, *et al.* Mutations of the *TP53* gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2008;22(8):1539-41.
- Harris NL, Jaffe Es, Diebold J, *et al.* World Health Organization classification of neoplastic diseases of the Hematopoietic and Lymphoid tissues. *JCO* 1999;17(12):3835-49.
- Heuseer M. Therapy-related myeloid neoplasms: does knowing the origin help to guide treatment. *Hematology* 2016:24-32/asheducation-2016.

## I

- Itzhar N, Dessen P, Toujani S, *et al.* Chromosomal minimal critical regions in therapy related leukemia appear different from those of the novo leukemia by high resolution Achg. *PloS One* 2011;6(2):e16623.

**J**

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC. Press: Lyon 2001.

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, *et al.* Age related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014;371(26):2488-98.

**K**

Kartarjian HM, Keating MJ, Walters RS, *et al.* Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome: clinical, cytogenetic, and prognostic features. *JCO* 1986;4(12):1748-57.

Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457–81.

Kayser S, Döhner K, Krauter J *et al.* The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011;117(7):2137-45.

Krishnan A, Bhatia S, Slovak ML, *et al.* Predictors of therapy-related leukemia and myelodysplasia following autologous transplantation for lymphoma: an assessment of risk factors. *Blood* 2000;95(5):1588-93.

Kosminder O, Delabesse E, Mansat-De Mas V, *et al.* *TET2* mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Haematologica* 2011;96(07):1059-63.

**L**

Lan Q, Zhang L, Li G, *et al.* Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004;306:1774-6.

Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Best Practice and Research Clinical Hematology* 2007;20:109-118.

Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, *et al.* Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no.5 and 7. *JCO* 1986;4(3):325-35.

Le Deley MC, Suzan F, Cutuli B, *et al.* Anthracyclines, mitoxantrone, radiotherapy, and granulocyte colony-stimulating factor: risk factors for leukemia and myelodysplastic syndrome after breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:292-00.

Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano I. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 1999;84(10):937-45.

Ley TJ, Ding L, Walter MJ, *et al.* *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363(25):2424-33.

Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, *et al.* Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* 2015;125(9):1367-76.

Little JB. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:337-52.

## **M**

Mauritzson N, Albin M, Rylander I, *et al.* Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and *de novo* adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia* 2002;16(12):2366-78.

Mantel N: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:163–70.

Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, *et al.* TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1373-81.

Michels SD, McKenna RW, Arthur DC, *et al.* Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a clinical and morphological study of 65 cases. *Blood* 1985;65:1364-72.

## **N**

Nakao M, Yokota S, Iwai T, *et al.* Internal tandem duplications of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10(12):1911–18.

## **O**

Ojha RP, Fischbach LA, Zhou Y, *et al.* Acute myeloid leukemia incidence following radiation therapy for localized or locally advanced prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol* 2010;34:274-78.

Ok CY, Hasserjian RP, Fox PS, *et al.* Application of the International Prognostic Scoring System-Revised in therapy-related myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014;28:185-89.



Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, *et al.* Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias by next generation sequencing, a comparison with *de novo* diseases. *Leukemia Research* 2015; 39:348-54.

## P

Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, *et al.* Somatin *SF3B1* mutations in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med* 2011;365(15):1384-95.

Park SH, Chi HS, Cho YU *et al.* Evaluation of prognostic factors in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood Res* 2013; 48(3): 185–92.

Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1079-89.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood* 2000;95(11):3273-9.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH and Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;99(6):1909-12.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT and Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008;22:240-48.

Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Andersen MK and Skovby F. Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. *Leukemia* 2002;16:2177-84.

Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Destf F and Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20:1943-49.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007.392-7. Review

Pedersen-Bjergaard J, Pedersen M, Roulston D and Philip P. Different genetic pathways in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 1995;86:3542-52.

Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, *et al.* Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 1994;137(2):S68-97.

## R

- Ramsingh G, Shen D, Lamprecht T, *et al.* Whole Genome Sequencing of Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts 2012;120:Abstract 784.
- R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rowley JD, Golomb HM, Vardiman JW. Nonrandom chromosomal abnormalities in acute non-lymphocytic leukemia in patients treated for Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;50:759-70.
- Rowley JD, Golomb HM, Vardiman JW. Nonrandom chromosome abnormalities in acute leukemia and dysmyelopoietic syndromes in patients with previously treated malignant disease. *Blood* 1981;58:759-67.

## S

- Savona MR, Malcovati L, Komrokji R, *et al.* International Working Group. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood* 2015;125(2):1857-65.
- Sevcikova, Z Zhuang, G Garcia-Manero, *et al.* Comprehensive analysis of factors impacting risks and outcomes of therapy-related myeloid neoplasms following breast cancer treatment. *Leukemia* 2016;30(1):242-47.
- Shih AH, Chung SS, Dolezal EK, *et al.* Mutational analysis of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2013; 98(6):908-12.
- Sill H, Olipitz W, Zebisch A, *et al.* Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *British Journal of Pharmacology* 2011;162:792-805.
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, *et al.* New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international data base merge. *J Clin Oncol* 2012,30(8):820-29.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, *et al.* Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005 ;106(12):3733-39.
- Schoch C, Kern W, Hiddemann W and Haferlach T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients

with t-AML in comparison to 1091 patients with *de novo* AML. *Leukemia* 2004;18:120-25.

Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, *et al.* Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000;96(13):4075-83.

Smith SM, Le Beau MM, Huo D, *et al.* Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 2003;102:43-52.

Sttensma DP, Bejar R, Jaiswal S, *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndrome. *Blood* 2015;126(1):9-16.

Stuart CF. Radiation-induced leukemia: Lessons from history. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2007;20(1):109-118.

Such E, Cervera J, Costa D, *et al.* Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96(3):375-83.

Such E, Germing U, Malcovati L, *et al.* Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121(15):3005-15.

## T

Thol K, Kade S, Schalmann C, *et al.* Frequency and prognostic impact of mutations in *SRSF2*, *U2AF1* and *ZRSR2* in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;119(15):3578-84.

Travis LB, Andersson M, Gospodarowicz M, *et al.* Treatment-associated leukemia following testicular cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1165-71.

Traweek ST, Slovak ML, Nademanee AP, *et al.* Myelodysplasia and acute myeloid leukemia occurring after autologous bone marrow transplantation for lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996;20(5-6):365-72.

## V

Vallespí T, Sánchez-Morata C, Ortega M, *et al.* Diagnóstico integrado de las neoplasias mieloides secundarias a tratamiento: datos clínicos, morfología, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular. *Haematologica/edición española* 2011;96(Extra 1):203-09.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 ;114:937-51.

Voso MT, Fabian E, Fianchi L *et al.* Mutations of epigenetic regulators and of the spliceosome machinery in therapy-related myeloid neoplasms and in acute leukemias evolved from chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia* 2013 ;27(4) :982-85.

## **W**

Walter MJ, Ding L, Shen D, *et al.* Recurrent *DNMT3A* mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2011 ;25(7) :1153-8.

Wong TN, Ramsingh G, Young AL, *et al.* The Role of *TP53* Mutations in the Origin and Evolution of Therapy-Related AML. *Nature* 2015 ;518(7540):552-55.

## **X**

Xie M, Lu C, Wang J, *et al.* Age related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014 ;20(12) :1472-78.

## **Y**

Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, *et al.* Frequent pathways mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478(7367):64-9.

## **Z**

Zuber J, Radtke I, Pardee TS, *et al.* Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev* 2009;23(7):877-89



## **9 . ANEXOS**



Tabla I. Nomenclatura de mutaciones detectadas en la serie global por NGS.

Gen	Localización	Tipo	Cob.	VAF (%)	c.DNA	Proteína	Cosmic	S. pat*
TP53	cr17:7577593	INDEL	1977	6	c.686_687delGT	p.C229fs	44360	1
TP53	cr17:7578263	SNV	1816	7	c.586C>T	p.R196Ter	10705	1
TP53	cr17:7578190	SNV	1986	79	c.659A>G	p.Y220C	10758	1
TP53	cr17:7578394	SNV	1990	8	c.536A>G	p.H179R	10889	1
TP53	cr17:7578406	SNV	1997	16	c.524G>A	p.R175H	10648	1
TP53	cr17:7578204	SNV	1995	23	c.645T>G	p.S215R	44979	1
TP53	cr17:7577539	SNV	2000	27	c.742C>T	p.R248W	10656	1
TP53	cr17:7577097	SNV	1441	33	c.841G>A	p.D281N	43596	1
TP53	cr17:7578525	SNV	100	41	c.405C>G	p.C135W	44219	1
TP53	cr17:7577120	SNV	1997	41	c.818G>A	p.R273H	10660	1
TP53	cr17:7574002	INDEL	1918	43	c.1024_1024delC	p.R342fs	18597	1
TP53	cr17:7577121	SNV	1993	47	c.817C>T	p.R273C	10659	1
TP53	cr17:7578203	SNV	1995	52	c.646G>A	p.V216M	10667	1
TP53	cr17:7578535	SNV	306	55	c.395A>G	p.K132R	11582	1
TP53	cr17:7577124	SNV	1252	63	c.814G>A	p.V272M	10891	1
TP53	cr17:7578265	SNV	1456	73	c.584T>C	p.I195T	11089	1
TP53	cr17:7577124	SNV	1576	79	c.814G>A	p.V272M	10891	1
TP53	cr17:7577120	SNV	1643	82	c.818G>A	p.R273H	10660	1
TP53	cr17:7577094	SNV	1644	83	c.844C>G	p.Arg282Gly	10992	1
TP53	cr17:7578271	SNV	1691	85	c.578A>G	p.H193R	10742	1
TP53	cr17:7578406	SNV	1729	87	c.524G>A	p.R175H	10648	1
TP53	cr17:7577571	SNV	1902	95	c.710T>A	p.M237K	43952	1
TP53	cr17:7577093	INDEL	1955	8	c.844_845insAGG	p.R282delinsQG	45866	2
TP53	cr17:7579470	INDEL	1011	15	c.216_217insC	p.V73fs	128714	2
TP53	cr17:7578475	SNV	200	23	c.455C>T	p.P152L	10790	2



Gen	Localización	Tipo	Cob.	VAF (%)	c.DNA	Proteína	Cosmic	S. pat*
TP53	cr17:7578518	SNV	310	25	c.412G>C	p.A138P	11188	2
TP53	cr17:7578395	SNV	1992	28	c.535C>A	p.H179N	44151	2
TP53	cr17:7577536	SNV	1979	32	c.745A>G	p.R249G	10668	2
TP53	cr17:7578441	SNV	827	29	c.489C>G	p.Y163Ter	43820	2
TP53	cr17:7578496	SNV	304	44	c.434T>A	p.L145Q	44137	2
TP53	cr17:7577142	SNV	1997	51	c.796G>T	p.G266Ter	44891	2
TP53	cr17:7578496	SNV	205	64	c.434T>G	p.L145R	45351	2
TP53	cr17:7579546	INDEL	1998	74	c.140_140delC	p.P47fs	13161	2
TP53	cr17:7578395	SNV	1655	82	c.535C>T	p.H179Y	10768	2
TP53	cr17:7579581	SNV	1999	6	c.106C>T	p.P36S	No	3
TET2	cr4:106164794	SNV	1999	6	c.3662G>A	p.C1221Y	211717	1
TET2	cr4:106182926	SNV	1999	17	c.3965T>A	p.L1322Q	211728	1
TET2	cr4:106197210	SNV	1999	39	c.5543C>G	p.S1848Ter	5945069	1
TET2	cr4:106164068	SNV	494	47	c.3578G>A	p.C1193Y	1737882	1
TET2	cr4:106164741	SNV	1998	49	c.3609C>G	p.S1203R	1235473	1
TET2	cr4:106180783	INDEL	1292	50	c.3811_3812insG	p.C1271fs	4170106	1
TET2	cr4:106157698	SNV	1998	52	c.2599T>C	p.Y867H	327337	1
TET2	cr4:106197401	SNV	1999	93	c.5734C>T	p.H1912Y	4766174	1
TET2	cr4:106190782	SNV	805	5	c.4060A>G	p.R1354G	No	2
TET2	cr4:106196248	INDEL	1142	37	c.4582_4582delC	p.Q1529fs	No	2
TET2	cr4:106196248	INDEL	493	39	c.4582_4582delC	p.Q1529fs	No	2
TET2	cr4:106157650	SNV	1998	40	c.2551C>T	p.P851S	2952775	2
TET2	cr4:106196248	INDEL	310	44	c.4582_4582delC	p.Q1529fs	No	2
TET2	cr4:106197367	INDEL	1989	49	c.5701_5701delT	p.Y1902fs	No	2
TET2	cr4:106157489	INDEL	972	51	c.2391_2391delC	p.F797fs	No	2
TET2	cr4:106196770	SNV	1808	41	c.5103G>A	p.M1701I	No	3

## Bibliografía

Gen	Localización	Tipo	Cob.	VAF (%)	c.DNA	Proteína	Cosmic	S. pat*
<i>TET2</i>	cr4:106155199	SNV	1996	47	c.100C>T	p.L34F	No	3
<i>TET2</i>	cr4:106196819	SNV	1343	50	c.5152G>T	p.V1718L	41742	3
<i>TET2</i>	cr4:106196834	SNV	2000	50	c.5167C>T	p.P1723S	1235472	3
<i>TET2</i>	cr4:106156729	SNV	1990	60	c.1630C>T	p.R544Ter	41850	3
<i>TET2</i>	cr4:106196458	SNV	1992	52	c.4791C>G	p.F1597L	No	4
<i>SETBP1</i>	cr18:42531907	SNV	1998	12	c.2602G>A	p.D868N	1318400	1
<i>SETBP1</i>	cr18:42530351	SNV	2000	5	c.1046A>G	p.N349S	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42530258	SNV	739	5	c.953A>G	p.D318G	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42531149	SNV	1998	6	c.1844G>A	p.R615Q	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42531913	SNV	1991	8	c.2608G>A	p.G870S	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42530845	SNV	1993	10	c.1540C>T	p.P514S	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42531917	SNV	1672	23	c.2612T>C	p.I871T	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42531917	SNV	1999	45	c.2612T>C	p.I871T	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42533267	SNV	1994	47	c.3962G>A	p.R1321H	No	2
<i>SETBP1</i>	cr18:42533267	SNV	1999	47	c.3962G>A	p.R1321H	No	2
<i>RUNX1</i>	cr21:36259173	SNV	579	7	c.318G>T	p.W106C	24720	1
<i>RUNX1</i>	cr21:36231782	SNV	1981	7	c.602G>A	p.R201Q	24805	1
<i>RUNX1</i>	cr21:36252866	SNV	1997	15	c.496C>T	p.R166Ter	24769	1
<i>RUNX1</i>	cr21:36171607	SNV	1999	30	c.958C>T	p.R320Ter	41699	1
<i>RUNX1</i>	cr21:36206845	SNV	1972	45	c.667G>T	p.E223Ter	4385168	1
<i>RUNX1</i>	cr21:36259312	SNV	1999	56	c.179C>T	p.A60V	24762	1
<i>RUNX1</i>	cr21:36231791	SNV	2000	56	c.593A>G	p.D198G	24799	1
<i>RUNX1</i>	cr21:36231833	SNV	2000	9	c.551C>T	p.P184L	1030461	2
<i>RUNX1</i>	cr21:36252875	SNV	1998	38	c.487T>G	p.F163V	No	2
<i>RUNX1</i>	cr21:36206711	SNV	1998	88	c.801G>A	p.M267I	1681955	2
<i>BCOR</i>	crX:39932084	INDEL	1987	5	c.2514_2515insC	p.K839fs	1319442	1

Gen	Localización	Tipo	Cob.	VAF (%)	c.DNA	Proteína	Cosmic	S. pat <sup>*</sup>
<i>BCOR</i>	crX:39932084	INDEL	1736	6	c.2514_2515insC	p.K839fs	1319442	1
<i>BCOR</i>	crX:39932084	INDEL	1978	7	c.2514_2515insC	p.K839fs	1319442	1
<i>BCOR</i>	crX:39932084	INDEL	1990	12	c.2514_2515insC	p.K839fs	1319442	1
<i>BCOR</i>	crX:39931873	SNV	1432	33	c.2726G>A	p.G909D	No	2
<i>BCOR</i>	crX:39932279	SNV	881	44	c.2320A>G	p.K774E	No	2
<i>BCOR</i>	crX:39911402	SNV	413	8	c.5228G>A	p.W1743Ter	No	2
<i>BCOR</i>	crX:39913251	SNV	1994	9	c.4864G>T	p.G1622Ter	No	2
<i>BCOR</i>	crX:39932807	INDEL	287	100	c.1791_1792insT	p.V598fs	No	2
<i>DNMT3A</i>	cr2:25457243	SNV	1988	52	c.2644C>T	p.R882C	53042	1
<i>DNMT3A</i>	cr2:25467190	SNV	1993	92	c.1685G>A	p.C562Y	249136	1
<i>DNMT3A</i>	cr2:25462035	INDEL	1976	42	c.2371_2371delG	p.A791fs	No	2
<i>DNMT3A</i>	cr2:25464513	INDEL	810	49	c.1998_1999delTG	p.C666Ter	No	2
<i>DNMT3A</i>	cr2:25462038	INDEL	1782	50	c.2367_2368delCA	p.H789fs	No	2
<i>DNMT3A</i>	cr2:25505414	SNV	364	10	c.344C>G	p.P115R	No	4
<i>DNMT3A</i>	cr2:25505414	SNV	618	11	c.344C>G	p.P115R	No	4
<i>PTPN11</i>	cr12:112888199	SNV	467	22	c.215C>T	p.A72V	13015	1
<i>PTPN11</i>	cr12:112926888	SNV	963	45	c.1508G>T	p.G503V	14271	1
<i>PTPN11</i>	cr12:112884103	SNV	849	5	c.38G>C	p.G13A	430369	2
<i>PTPN11</i>	cr12:112884093	SNV	1998	49	c.28A>G	p.N10D	No	3
<i>PTPN11</i>	cr12:112919962	SNV	1999	15	c.1177G>A	p.A393T	No	4
<i>PTPN11</i>	cr12:112926974	SNV	687	52	c.1594G>A	p.E532K	No	4

<sup>1</sup> Genes con variantes detectadas en más de 5 pacientes

\* 1= patogénica, 2= probablemente patogénica, 3= variante de significado incierto, 4= probablemente benigna

**Tabla II. Nomenclatura de mutaciones detectadas en la serie global por NGS en 5 o menos pacientes.**

Gen	Locus	Tipo	Cob	VAF (%)	c.DNA	Proteína	Cosmic	S. pat*
ASXL1	cr20:3102112 2	SNV	2000	6	c.1121A>G	p.N374S	No	3
ASXL1	cr20:3102115 7	INDEL	1984	16	c.1157_1158delITG	p.V388fs	No	3
ASXL1	cr20:3102133 2	SNV	1998	43	c.1331C>G	p.S444Ter	No	4
BRAF	chr7:1405078 09	SNV	564	5	c.662A>G	p.E221G	No	2
CBL	cr11:1191489 91	SNV	303	40	c.1211G>A	p.C404Y	34068	1
CBL	cr11:1191492 46	SNV	1997	40	c.1254C>A	p.F418L	34078	1
CBL	cr11:1191492 41	SNV	1998	41	c.1249C>T	p.P417S	3738507	1
CEBP A	cr19:3379275 5	SNV	253	10	c.566C>A	p.P189H	No	4
CEBP A	cr19:3379242 0	SNV	2000	16	c.901G>T	p.D301Y	No	2
CEBP A	cr19:3379242 2	SNV	1992	19	c.899G>T	p.R300L	27478	1
CEBP A	cr19:3379239 5	INDEL	1948	21	c.925_926insCCA AGCAGCGCAAC GTGG	p.V308_E309insA KGQRNV	No	2
CEBP A	cr19:3379313 9	SNV	144	30	c.182C>G	p.Ser61Cys	No	2
CEBP A	cr19:3379238 1	INDEL	1968	44	c.939_940insAGA AG	p.Val314fs	No	2
CEBP A	cr19:3379235 9	SNV	1996	45	c.962A>G	p.Asn321Ser	5065128	1
EZH2	cr7:14851442 6	SNV	1689	10	c.1298A>G	p.E433G	No	2
EZH2	cr7:14852356 0	SNV	2000	17	c.893G>A	p.R298H	No	4

<i>EZH2</i>	cr7:14850876 1	INDEL	1989	17	c.1902_1902delA	p.D635fs	No	2
<i>IDH2</i>	cr15:9063193 4	SNV	1999	30	c.419G>A	p.R140Q	41590	1
<i>IDH2</i>	cr15:9063193 4	SNV	980	40	c.419G>A	p.R140Q	41590	1
<i>IDH2</i>	cr15:9063193 4	SNV	857	41	c.419G>A	p.R140Q	41590	1
<i>IDH2</i>	cr15:9063193 4	SNV	1999	44	c.419G>A	p.R140Q	41590	1
<i>IDH2</i>	cr15:9063193 4	SNV	813	49	c.419G>A	p.R140Q	41590	1
<i>JAK2</i>	cr9:5073710	SNV	663	5	c.1789G>A	p.A597T	5032211	2
<i>JAK2</i>	cr9:5072561	SNV	824	51	c.1711G>A	p.G571S	29107	1
<i>KIT</i>	cr4:55599320	SNV	1999	12	c.2446G>T	p.D816Y	1310	1
<i>KIT</i>	cr4:55589768	INDEL	1979	16	c.1251_1253delTT A	p.Y418del	No	2
<i>KIT</i>	cr4:55599321	SNV	1998	16	c.2447A>T	p.D816V	1314	1
<i>KIT</i>	cr4:55589774	SNV	1985	16	c.1256A>G	p.D419G	1430124	1
<i>KRAS</i>	cr12:2539828 4	SNV	1996	10	c.35G>A	p.G12D	521	1
<i>KRAS</i>	cr12:2539828 4	SNV	985	12	c.35G>A	p.G12D	521	1
<i>KRAS</i>	cr12:2539828 7	INDEL	966	15	c.31_32insGAG	p.G10dup	1166616	1
<i>KRAS</i>	cr12:2539828 1	SNV	1068	16	c.38G>A	p.G13D	532	1
<i>KRAS</i>	cr12:2539826 6	SNV	812	17	c.53C>A	p.A18D	542	1
<i>KRAS</i>	cr12:2539828 4	SNV	2000	30	c.35G>C	p.G12A	522	1
<i>LUC7L 2</i>	cr7:13909200 6	INDEL	354	42	c.589_589delC	p.H197fs	No	2
<i>LUC7L 2</i>	cr7:13910233 5	SNV	1002	48	c.852A>C	p.E284D	No	2

## Bibliografia

<i>LUC7L2</i>	cr7:139107009	SNV	1188	52	c.1093A>C	p.K365Q	No	4
<i>LUC7L2</i>	cr7:139102335	SNV	2000	55	c.852A>C	p.E284D	No	2
<i>NF1</i>	cr17:29663849	SNV	1997	5	c.6344C>T	p.P2115L	5597166	2
<i>NF1</i>	cr17:29661945	SNV	1195	10	c.5902C>T	p.R1968Ter	3402748	1
<i>NF1</i>	cr17:29653134	INDEL	1982	15	c.5132_5133insT	p.P1712fs	No	2
<i>NF1</i>	cr17:29576037	SNV	1998	49	c.4010G>A	p.R1337Q	No	4
<i>NF1</i>	cr17:29496957	SNV	615	51	c.528T>A	p.D176E	24498	2
<i>NRAS</i>	cr1:115258744	SNV	1998	5	c.38G>A	p.G13D	573	1
<i>NRAS</i>	cr1:115258748	SNV	1741	6	c.34G>A	p.G12S	563	1
<i>NRAS</i>	cr1:115258747	SNV	1998	16	c.35G>C	p.G12A	565	1
<i>NRAS</i>	cr1:115258744	SNV	1997	34	c.38G>T	p.G13V	574	1
<i>PHF6</i>	crX:133527949	SNV	1458	33	c.385C>T	p.R129Ter	4606367	2
<i>SF3A1</i>	cr22:30733834	SNV	603	5	c.1796G>C	p.R599P	No	2
<i>SF3A1</i>	cr22:30733834	SNV	653	5	c.1796G>C	p.R599P	No	2
<i>SF3A1</i>	cr22:30733714	INDEL	358	96	c.1915_1916insC	p.M639fs	No	2
<i>SF3B1</i>	cr2:198267359	SNV	1354	40	c.1998G>T	p.K666N	131557	1
<i>SF3B1</i>	cr2:198267359	SNV	1988	42	c.1998G>C	p.K666N	131557	1
<i>SF3B1</i>	cr2:198267359	SNV	1589	44	c.1997A>G	p.K666R	131553	1
<i>SMC3</i>	cr10:1123608	SNV	953	5	c.2590T>G	p.S864A	No	4

	34							
SMC3	cr10:1123608 34	SNV	591	6	c.2590T>G	p.S864A	No	4
SMC3	cr10:1123608 34	SNV	467	7	c.2590T>G	p.S864A	No	4
SMC3	cr10:1123580 02	SNV	1992	47	c.2222T>A	p.M741K	No	4
SMC3	cr10:1123579 94	INDEL	1946	47	c.2215_2220delAT GAAG	p.M739_K740del	No	2
SPAR C	cr5:15104933 3	SNV	1998	53	c.343G>T	p.D115Y	No	2
SRSF 2	cr17:7473295 9	SNV	637	32	c.284C>A	p.P95H	144993	1
SRSF 2	cr17:7473295 9	SNV	198	33	c.284C>T	p.P95L	146288	1
SRSF 2	cr17:7473295 5	INDEL	118	44	c.287_288insC	p.D97fs	No	2
STAG 2	crX:12318406 1	SNV	1997	12	c.919A>T	p.I307F	No	2
STAG 2	crX:12318131 1	SNV	1226	17	c.775C>T	p.R259Ter	216178	1
STAG 2	crX:12322054 5	SNV	1776	42	c.3202T>C	p.S1068P	No	4
STAG 2	crX:12319175 4	INDEL	1115	59	c.1344_1348delGA AAA	p.R451fs	No	2
STAG 2	crX:12321031 3	INDEL	1522	94	c.2665_2666insA	p.Y889fs	No	2
U2AF1	cr21:4452445 6	SNV	1827	39	c.101C>T	p.S34F	166866	1
ZRSR 2	crX:15821854	SNV	1837	7	c.247C>A	p.Q83K		2
ZRSR 2	crX:15841230	INDEL	204	32	c.1314_1315insAG CCGG	p.G438_S439insS R	4169502	4
ZRSR 2	crX:15836741	SNV	215	80	c.803G>C	p.G268A		2
ZRSR 2	crX:15841230	INDEL	461	94	c.1314_1315insAG CCGG	p.G438_S439insS R	4169502	4

