

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Evolución genómica en el proceso de leucemogénesis en
leucemia en células del donante post-trasplante alogénico de
progenitores hematopoyéticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julia Suárez González

Directores

**Ismael Buño
Carolina Martínez Laperche
José Luis Díez Martín**

Madrid

© Julia Suárez González, 2019

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina
Programa de Doctorado en Ciencias Médico Quirúrgicas



Evolución genómica en el proceso de leucemogénesis en leucemia en células del donante post-trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Doctoranda:
Julia Suárez González

Directores:
Ismael Buño
Carolina Martínez Laperche
José Luis Díez Martín

Madrid - 2019



**Hospital General Universitario
Gregorio Marañón**





UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR

Dña. Julia Suárez González con número de DNI: 71661544-F, estudiante en el Programa de Doctorado en Ciencias Médico Quirúrgicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Evolución genómica en el proceso de leucemogénesis en leucemia en células de donante post-trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

y dirigida por Ismael Buño, Carolina Martínez Laperche y Jose Luis Díez Martín

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de Abril, por el que se aprueba el texto, refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de Marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 11 de Julio de 2019

Fdo: Julia Suárez González

TESIS DOCTORAL

**Evolución genómica en el proceso de leucemogénesis en leucemia en
células del donante post-trasplante alogénico de progenitores
hematopoyéticos**

Memoria para optar al grado de Doctor

Presentada por:

Julia Suárez González

Directores:

Ismael Buño Borde

Carolina Martínez Laperche

José Luis Díez Martín



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas

Departamento de Medicina

Madrid - 2019



El **Dr. Ismael Buño Borde** responsable del Laboratorio de Genética Hematológica (Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), Madrid), de la Unidad de Genómica del HGUGM y del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM) y director científico del IISGM; la **Dra. Carolina Martínez Laperche**, adjunta del Laboratorio de Genética Hematológica (Servicio de Hematología y Hemoterapia, HGUGM, Madrid), **José Luis Díez Martín**, Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia (HGUGM, Madrid) y el **Dr. Rafael Bañares Cañizares**, jefe de Servicio de Digestivo (HGUGM, Madrid).

Certifican:

Que el trabajo titulado *Evolución genómica en el proceso de leucemogénesis en leucemia en células del donante post-trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos* ha sido realizado por Doña **Julia Suárez González** en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón y en el Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón de Madrid bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor.

*The trick is always to try
collect the tries like trophies
and you will never lose.*

Quiero recordar y reconocer...

A mis padres y mi hermana, porque no existe mejor modelo de esfuerzo y superación, pero especialmente, por su apoyo incondicional y su amor infinito.

A Kiel por estar siempre ahí, por tu apoyo y comprensión, por cuidarme, por hacer fácil lo difícil y por tu infinita paciencia.

A Carolina, sin tu ayuda habría sido mucho más difícil llegar hasta aquí, gracias por tu experiencia, paciencia y consejos, por ser una amiga.

A Ismael por el apoyo, por darme la oportunidad y por tu infatigable dedicación. Sin tu optimismo no estaríamos aquí.

A Jose Luis por la confianza depositada.

A Cristina, Ainhoa, Mari Jose y María que me acompañan en el día a día y hacen del laboratorio un hogar. Ellas son un ejemplo de energía, fuerza, dedicación y ganas de aprender.

A Mariana, Diego, María y Paula, compañeros en este viaje y apoyo moral para seguir adelante.

A Asun, Merche, Alfonso, Loli, Marisol, Susana, Jose y todos lo que han pasado por el laboratorio de Genética Hematológica donde di mis primeros pasos y donde aprendí que todo es posible.

A mis amigas que siempre me acompañan en todos los pasitos de la vida, de Oviedo a Salamanca, de Salamanca a Madrid, de Madrid a quien sabe dónde. Gracias por vivir mis avances como si fuesen vuestros. Gracias de todo corazón.

Quisiera mostrar mi agradecimiento a toda mi familia y compañeros de trabajo que de una manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

Alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

AMA: Acondicionamiento mieloablativo.

AIR: Acondicionamiento de intensidad reducida

ATG: Globulina antitimocítica.

Cr: Cromosoma.

EICR: Enfermedad injerto contra receptor.

EICT: Enfermedad injerto contra tumor.

FAV: Frecuencia alélica de la variante.

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente.

HC: Hematopoyesis clonal.

HLA: *Human leucocyte antigen* (antígeno humano leucocitario).

HR: *Hazard Ratio*.

ICT: Irradiación corporal total.

ITC: Inhibidor de tirosin-cinasa.

LLA: Leucemia linfoblástica aguda.

LMA: Leucemia mieloide aguda.

MO: Médula ósea.

NH: Neoplasia hematológica

NHCD: Neoplasia hematológicas en células del donante.

NK: *Natural killer*.

NM-t: Neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento.

PH: Progenitores hematopoyéticos.

QC: Quimerismo completo.

QM: Quimerismo mixto.

RA: Reconstitución autóloga.

SCU: Sangre de cordón umbilical.

SMD: Síndrome mielodisplásico.

SP: Sangre periférica.

STR: *Short Tandem Repeat*.

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

TPH-DNE: Trasplante de donante no emparentado.

TPH-Haplo: Trasplante haploidéntico.

TPH-HLA-id: Trasplante HLA idéntico.

TPH-SCU: Trasplante de sangre de cordón umbilical.



ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	5
1.INTRODUCCIÓN	9
1.1.Hematopoyesis.....	11
1.2.Neoplasias hematológicas.....	12
1.3.Leucemogenesis.....	16
1.4.Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.....	22
1.5 Neoplasia hematológica en células del donante (NHCD).....	25
2.HIPÓTESIS.....	33
3.OBJETIVOS.....	37
4.MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
4.1.Revisión sistemática de la literatura.....	43
4.2.Estudio genómico de una amplia cohorte los pacientes con NHCD.....	44
4.2.1.Pacientes y muestras analizadas.....	44
4.2.2.Secuenciación del exoma completo.....	47
4.2.3.Análisis de las variantes genómicas en las muestras del receptor post-TPH.....	47
4.2.4.Análisis de las variantes genómicas en las muestras del donante.....	48
4.2.5.Validación de las variantes genómicas mediante secuenciación dirigida.....	48
4.2.6.Análisis de la evolución clonal.....	49
5.RESULTADOS.....	51
5.1.Revisión sistemática de la literatura.....	53
5.1.1.Principales características de los pacientes con NHCD.....	53

5.1.2.Estado de salud de los donantes en el momento del diagnóstico de NHCD.....	58
5.1.3.Pronóstico de los pacientes con NHCD.....	60
5.2.Estudio de la cohorte de los pacientes con NHCD.....	60
5.2.1.Primer estudio de secuenciación de exoma completo en la cohorte de NHCD.....	60
5.2.2. Alteraciones somáticas adquiridas en el periodo post alo-TPH.....	61
5.2.3. Estudio de adquisición de variaciones en el número de copia.....	64
5.2.4. Análisis de las muestras de los donantes	65
5.2.5. Evolución clonal en los pacientes con NHCD.....	66
6.DISCUSIÓN.....	69
7.CONCLUSIONES.....	85
8.BIBLIOGRAFIA.....	89
9.ANEXOS.....	I
I.Índice de figuras	III
II.Índice de Tablas	IV
III.Características clínicas de los casos de neoplasias hematológicas reportadas en la literatura.....	V
IV.Artículos.....	XI

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as bright red, oval shapes with a darker center. They are scattered across the lower half of the image.

Resumen

Evolución genómica en el proceso de leucemogénesis en leucemia en células del donante post-trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Las neoplasias hematológicas (NH) engloban diversos tipos de proliferación tumoral de las células sanguíneas o de sus precursores localizados en la médula ósea (MO) y en los órganos linfoides. Las NHs comprenden un conjunto de enfermedades clásicamente definidas por criterios clínicos, morfológicos, citogenéticos y moleculares, que se comportan de manera heterogénea en su evolución, patogénesis, pronóstico y respuesta al tratamiento. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es actualmente la única opción potencialmente curativa para muchos de estos pacientes.

A pesar de que se han producido numerosos avances en la biología del alo-TPH, en el conocimiento de los antígenos HLA, en los regímenes de acondicionamiento y en la profilaxis de la enfermedad injerto contra receptor (EICR) y de las infecciones; una proporción significativa de los pacientes desarrollan serias complicaciones post-alo-TPH, como EICR y/o recaída de la enfermedad primaria. Una complicación menos frecuente del alo-TPH es el desarrollo de una NH derivada de las células del donante (NHCD), que consiste en la transformación leucémica de las células sanas procedentes del donante en un paciente sometido a un alo-TPH.

Se han propuesto varios mecanismos por los que se produce la transformación leucémica de los progenitores hematopoyéticos, no obstante, los datos disponibles son limitados y la heterogeneidad de los casos excluye la identificación de un mecanismo simple. Nuestro grupo realizó una revisión sistemática de todos los casos reportados en la literatura como punto de partida del estudio y se objetivó que los pacientes que desarrollan una NHCD tienen características muy heterogéneas en cuanto a la edad y sexo del receptor y del donante y el régimen de acondicionamiento del TPH. Sin embargo, se observan algunas características comunes como la enfermedad primaria por la cual los pacientes se someten a un alo-TPH, el tipo de enfermedad hematológica desarrollada en las células del donante, la fuente de PHs empleada en el trasplante y las alteraciones citogenéticas detectadas en las NHCDs. La mayor parte de los casos de NHCD han sido reportados en las últimas dos décadas, este aumento está directamente relacionado con la elevación en el número de alo-TPHs realizados en el mundo, así como

con la mejora en supervivencia global a largo plazo de estos pacientes y al empleo rutinario de técnicas moleculares para la detección del quimerismo.

Posteriormente, se recogió la casuística nacional de esta enfermedad (n=8) y se secuenció el exoma completo de las muestras secuenciales de MO post alo-TPH, así como en muestras del donante con el fin de dilucidar los mecanismos implicados en la patogénesis de esta enfermedad y de analizar la dinámica de adquisición y pérdida de alteraciones genómicas y su implicación en el proceso de leucemogénesis.

Se detectó en uno de los donantes la presencia de monosomía del cromosoma 7 en los progenitores hematopoyéticos en el momento de la donación y en los otros 7 casos se detectaron variantes de probable origen germinal en genes relacionados previamente con síndromes de predisposición al cáncer. Sin embargo, todos los donantes estaban sanos en el momento del diagnóstico de NHCD en el receptor.

A través del estudio seriado de las muestras de MO post-trasplante se objetiva que las neoplasias mieloides se estructuran en un único clon fundador con alteraciones genómicas que se detectan en todas las células leucémicas y varios subclones; los clones malignos evolucionan y aceleran la progresión de la enfermedad mediante la adquisición de nuevas mutaciones. El nicho en el que se producen todos estos cambios tienen una toxicidad residual, por la enfermedad y el tratamiento previo, que puede favorecer a la inestabilidad genómica y acelerar el proceso, además la vigilancia inmune suele estar disminuida como consecuencia del tratamiento inmunosupresor o por la inmadurez del nuevo sistema inmune.

Las NHCDs presentan modelo *in vivo* único para estudiar la dinámica de aparición de mutaciones tempranas que conducen al desarrollo de una NH. La implicación de cada uno de los factores relacionados con el trasplante o de los factores genéticos que contribuyen a la aparición de una NHCD es desconocida. Posiblemente, no existe un mecanismo único que sea el responsable del desarrollo de las NHCDs, será la combinación de varias condiciones las que promuevan su aparición.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as bright red, oval shapes with a central indentation. Some cells are in sharp focus, while others are blurred in the background, creating a sense of depth.

Summary

Genomic evolution in the process of leukemogenesis in donor cells derived leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Hematological neoplasms (HN) encompass various types of tumor proliferation of blood cells or their precursors located in the bone marrow (BM) and lymphoid organs. The NHs comprise a group of diseases classically defined by clinical, morphological, cytogenetic and molecular criteria, which behave very heterogeneously in their evolution, pathogenesis, prognosis and response to treatment. Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) is currently the only potentially curative option for many of these patients.

Although there have been numerous advances in the biology of allo-HSCT, in the knowledge of HLA-antigens, in conditioning regimens and in the prophylaxis of graft-versus-host disease (GVHD) and infections; a significant proportion of patients develop serious complications post-allo-HSCT, such as GVHD and/or relapse of the primary disease. A less frequent complication of allo-HSCT is the development of a HN derived from donor cells (DCHN), which consists in the leukemic transformation of healthy cells from the donor in a patient undergoing allo-TPH.

Several mechanisms have been proposed by which the leukemic transformation of hematopoietic progenitors occurs, however, the available data are limited and the heterogeneity of the cases excludes the identification of a simple mechanism. Our group performed a systematic review of all cases reported in the literature as a starting point of the study and found that patients who develop a NHCD have very heterogeneous characteristics in terms of age and sex of the recipient and the donor and the regimen of conditioning. However, some common characteristics are observed such as the primary disease by which patients undergo allo-TPH, the type of hematological disease developed in the donor cells, the source of stem cells infused and the cytogenetic alterations detected in NHCDs patients. The majority of cases of NHCD have been reported in recent decades, this increase is directly related to the increase in the number of allo-TPHs performed in the world, as well as the improvement in long-term overall survival of these patients and the routine use of molecular techniques for the detection of chimerism.

Subsequently, the national casuistic of this disease (n = 8) was collected and the complete exome of the sequential samples of MO post-allo-TPH and of the donor was sequenced, in order to elucidate the mechanisms involved in the pathogenesis of this disease and to analyze the dynamics of acquisition and loss of genomic alterations and their involvement in the process of leukemogenesis.

The presence of chromosome 7 monosomy in hematopoietic progenitors at the time of donation was detected in one donor and in the other 7 cases, variants of probable germinal origin were detected in genes previously associated with predisposition to cancer syndromes. However, all donors were healthy at the time of diagnosis of NHCD in the recipient.

Through the serial study of post-transplant BM samples, it was found that myeloid neoplasms are structured in a single founder clone with genomic alterations that are detected in all leukemic cells and several subclones; malignant clones evolve and accelerate the progression of the disease by acquiring new mutations. The niche in which all these changes take place has a residual toxicity, due to the disease and previous treatment, which may favor genomic instability and accelerate the process. In addition, immune surveillance is usually diminished as a consequence of immunosuppressive treatment or immaturity of the new immune system.

The DCHNs present a unique *in vivo* model to study the dynamics of appearance of early mutations that lead to the development of an HN. The implication of each one of the factors related to the transplant or the genetic factors that contribute to the appearance of a DCHN is unknown. Possibly, there is no single mechanism that is responsible, it will be the combination of several conditions that promote the onset of DCHN.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as lighter red, oval shapes with some showing their characteristic indentation. They are scattered across the lower half of the image.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso biológico, altamente dinámico, que requiere tanto de la capacidad de autorrenovación de las células madre hematopoyéticas como de la capacidad de diferenciación y maduración hacia los diferentes linajes para mantener los niveles de las células tejido hematopoyético durante toda la vida del individuo.¹ La hematopoyesis en el ser humano tiene diferentes localizaciones anatómicas a lo largo del desarrollo embrionario. La producción de las células sanguíneas comienza en el saco vitelino durante las primeras semanas de gestación, entre el segundo y el séptimo mes. El hígado y en menor grado el bazo, los ganglios linfáticos y el timo, son los lugares más importantes de producción; a partir del séptimo mes la médula ósea (MO), se convierte en el órgano hematopoyético principal. En el recién nacido, el tejido hematopoyético rellena las cavidades de todos los huesos. Entre los 5 y los 20 años, los huesos largos van perdiendo lentamente su capacidad de producir células hemáticas y, a partir de los 20 años el tejido hematopoyético se reduce a las vértebras, al esternón, a las costillas y a la pelvis. El hígado y el bazo mantienen una capacidad residual para la producción de células sanguíneas y, sólo en circunstancias patológicas, reasumirán sus funciones hematopoyéticas.²

La MO proporciona un microambiente óptimo para la proliferación, diferenciación, la adhesión y la quiescencia de las células madre hematopoyéticas.³ El microambiente hematopoyético está constituido por un conjunto de células (endoteliales, fibroblastos, macrófagos, linfocitos, adipocitos, osteoblastos, osteoclastos, condrocitos), factores solubles (factores de crecimiento, citocinas, interleucinas, quimiocinas) y proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, laminina, etc.), esenciales para el desarrollo normal de las células madre y la regulación de sus funciones. La comunicación intercelular y con la matriz extracelular se realiza mediante moléculas de adhesión y sus ligandos, así como por factores solubles (CXCL12, VLA-4, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3, PCAM-1, etc.).³ La combinación de factores extrínsecos e intrínsecos, como el microambiente medular, las rutas de señalización intracelular, los factores de transcripción y los modificadores de la cromatina contribuyen al equilibrio dinámico

entre la autorrenovación de las células madre y la diferenciación en los diferentes linajes. La alteración o desregulación de la hematopoyesis normal en algún punto de la cascada hematopoyética (Figura 1) puede resultar en el desarrollo de una neoplasia hematológica (NH).⁴

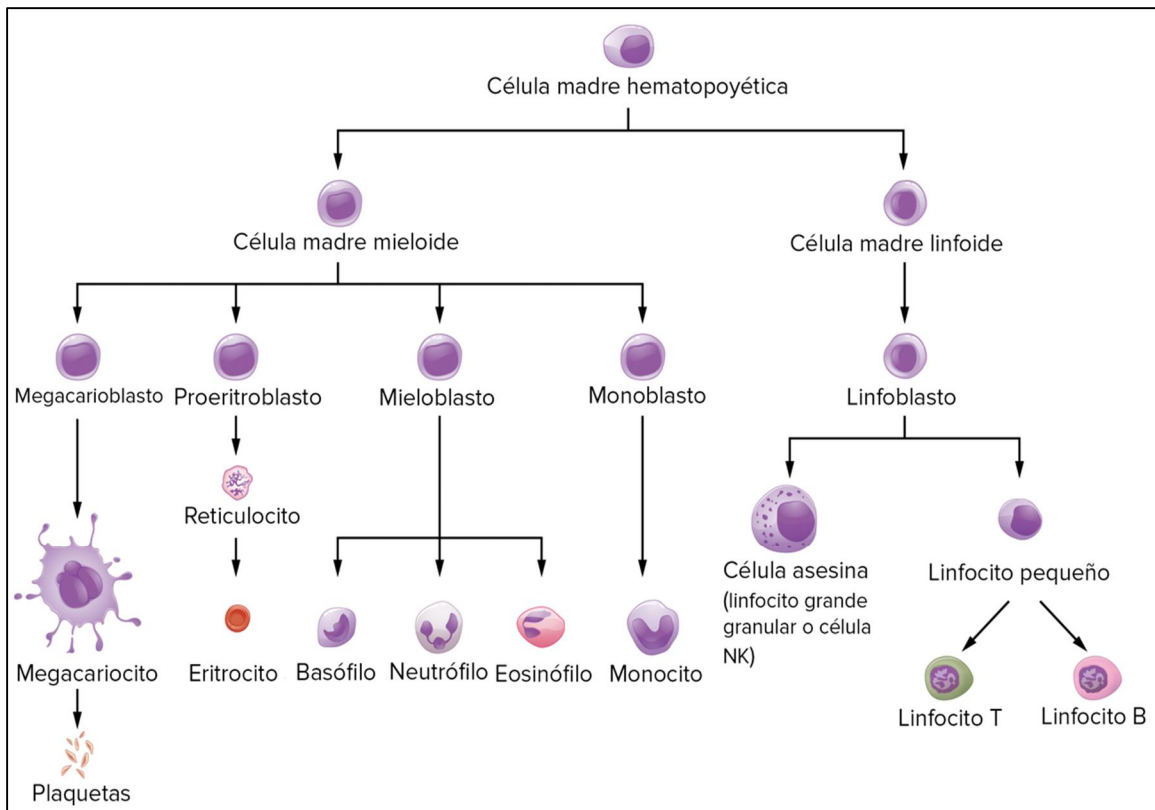


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis (Imagen modificada de Sistema hematopoyético de la médula ósea por OpenStax College, Anatomy & Physiology).

1.2. Neoplasias hematológicas

Actualmente, el término NH engloba los diversos tipos de proliferaciones tumorales de las células sanguíneas o de sus precursores localizados en la MO y en los diferentes tejidos linfoides (ganglios linfáticos, tejido linfoides asociado a mucosas, bazo). Las NHs reúnen a un conjunto de enfermedades clásicamente definidos por criterios clínicos, morfológicos, inmunohistoquímicos, inmunocitométricos, citogenéticos y moleculares, que se comportan de manera muy heterogénea en su patogénesis, pronóstico, evolución y respuesta al tratamiento.⁵

Al igual que ocurre en los tumores sólidos, las NHs son la expresión fenotípica de la transformación neoplásica de los precursores hematopoyéticos (PHs), mediante un proceso de acumulación de alteraciones genómicas sucesivas en los genes que dirigen y regulan funciones celulares básicas como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la muerte celular. Estas mutaciones ocasionan una proliferación excesiva y/o una inhibición de la apoptosis, dando lugar a un cúmulo de células indiferenciadas e hiperlongevas en la MO y en la sangre periférica (SP), con obliteración de la hemopoyesis normal.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud clasifica las NHs según su origen sea mielóide o linfóide. Dentro de las neoplasias mieloides se encuentran la leucemia mielóide aguda (LMA), el síndrome mielodisplásico (SMD), neoplasia mieloproliferativa crónica y neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa. Dentro de las neoplasias linfoides se encuentran las neoplasias linfoides de células precursoras (Leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B o T), el linfoma de Hodgkin y los linfomas no Hodgkin que engloba a las neoplasias de células B maduras y a las neoplasias de células T y células NK maduras.

Según los datos de GLOBOCAN⁶ la incidencia estimada de nuevos casos de NHs en el mundo para el año 2020 es superior a 1,2 millones de casos, lo que representa el 6,7% de la incidencia global estimada de cáncer en el mundo. Así mismo, la mortalidad estimada para las NHs es de 720.000 casos, que se corresponde con el 7,1% de la mortalidad global estimada de cáncer en el mundo en el año 2020 (Figura 2).⁶

Atendiendo a la misma fuente⁶, las leucemias son el tipo de NHs con mayor tasa de mortalidad, el 71% de los pacientes fallecen durante el curso de la enfermedad.⁶

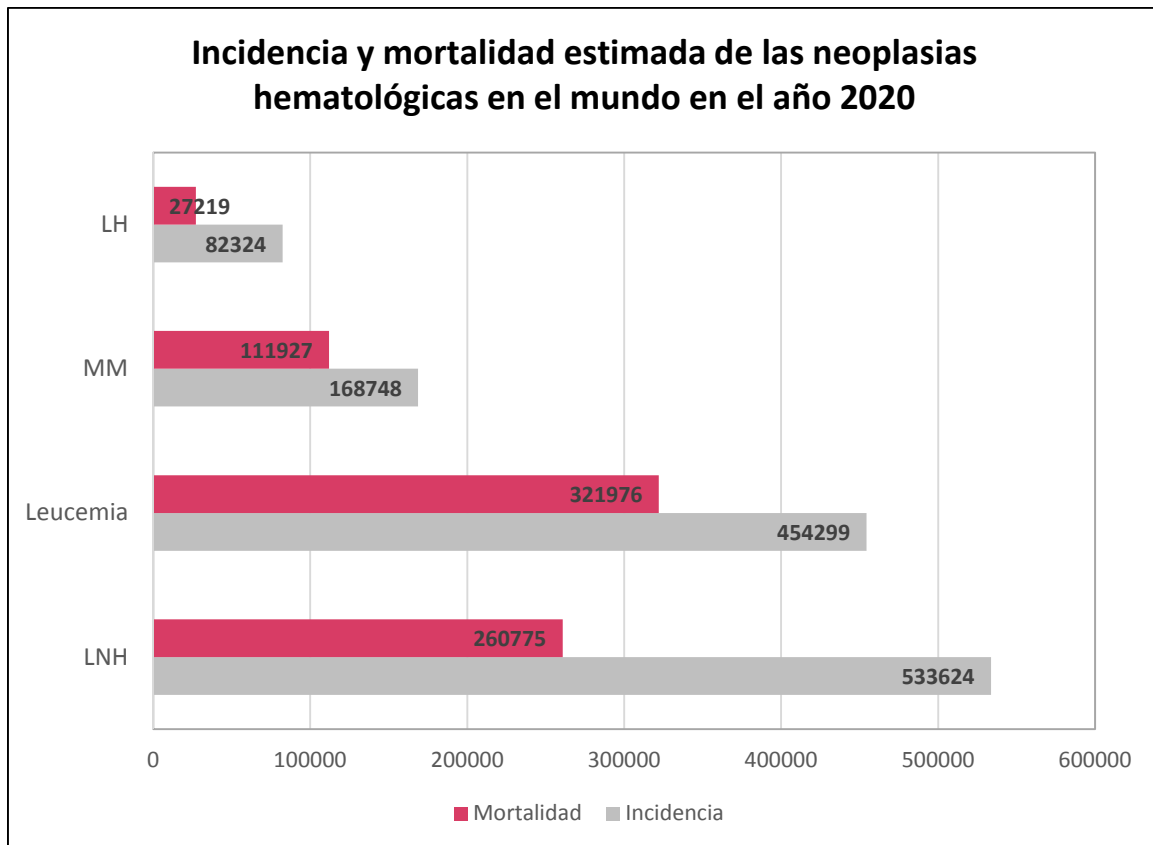


Figura 2. Incidencia y mortalidad estimada de las neoplasias hematológicas en el mundo en el año 2020. (Figura obtenida con los datos de GLOBOCAN.⁶ Abreviaturas: LH: Linfoma de Hodgkin; MM: Mieloma múltiple, LNH: Linfoma no Hodgkin).

Los primeros casos reportados de leucemia datan de la primera mitad del siglo XIX. El primer comunicado que con seguridad se refiere a esta enfermedad es del médico francés Velpeau, quien en 1823 describe a un paciente de 63 años que presentaba un abdomen aumentado de tamaño, fiebre, debilidad, manifestaciones propias de quien tiene cálculos renales y que al practicarle la autopsia observó que tenía el hígado y el bazo de tamaño aumentado, mientras que la sangre y el pus parecían del color de la levadura y el vino tinto. Posteriormente, en el año 1945 Virchow⁷ describió un caso en el que el paciente presentaba un material blanquecino en los vasos sanguíneos y acuñó el término de leucemia, palabra que viene del latín científico y que se integra de dos raíces griegas, *leukos*, que quiere decir blanco y *haima* que significa sangre. Otros casos similares fueron descritos por Bennett (1945) y Vogel (1951).⁸ En 1878, Neumann distingue por primera vez las dos formas de leucemia, linfoide y mieloide,⁹ sentando así, las bases de estas enfermedades.

Las leucemias conforman un grupo heterogéneo de neoplasias clonales que surgen de la transformación maligna de las células hematopoyéticas. Su característica común es el acúmulo de las células malignas anormales en la MO y en la SP, lo que provoca fallo medular (anemia, neutropenia y trombopenia) e infiltración de órganos (hígado, bazo, ganglios linfáticos, meninges, cerebro, testículos o piel). Como ya se ha comentado, las leucemias pueden clasificarse según la línea celular proliferante en linfoides o mieloides. Adicionalmente, según el grado de diferenciación celular se clasifican en agudas o crónicas. Las leucemias agudas son enfermedades invasivas en las que la transformación maligna ocurre en estadios precoces de diferenciación de los PHs, por lo que las células neoplásicas son indiferenciadas (blastos) y se produce fallo medular e infiltración orgánica por acumulación. Las leucemias crónicas son enfermedades en las que las células malignas transformadas conservan cierta capacidad de diferenciación y los pacientes sufren un curso natural de la enfermedad más lento y crónico.

Las leucemias han estado históricamente a la vanguardia en el empleo de las pruebas genéticas para el diagnóstico, clasificación, pronóstico y selección de tratamiento. La caracterización genética es vital para la evaluación clínica y ha evolucionado de manera continua con el incremento de los estudios genómicos del cáncer y las mejoras en las técnicas de diagnóstico molecular.⁵ A pesar de estos avances en el campo de la genética de las NHs, el tratamiento de las leucemias no ha cambiado sustancialmente en los últimos años. Este comprende dos fases fundamentales, una primera fase o inducción, en la que se administra al paciente un tratamiento intensivo de quimioterapia con el fin de obtener una remisión completa de la enfermedad, seguida de una segunda fase en la que se administra un tratamiento de consolidación y otro de intensificación, que puede ir seguido de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), que es actualmente la única opción potencialmente curativa que tienen estos pacientes.

1.3. Leucemogénesis

La primera teoría sobre la leucemogénesis se inició en la década de 1920 por Bauer y Strong.¹⁰ Estos autores plantearon que el origen de la célula tumoral no era más que una célula normal afectada por algún tipo de alteración genética. La mayor objeción a esta teoría era que no explicaba la variación de la frecuencia del cáncer con la edad. Estos autores proponían la existencia de un periodo de latencia relativamente largo a partir del cual las nuevas cualidades adquiridas por la célula se hacían evidentes y el fenómeno se diagnosticaba como cáncer. Sin embargo, la incidencia de leucemia y sarcoma a edades tempranas no encajaba esta teoría del periodo de latencia. Paralelamente, en el año 1943, Dahlberg propuso una explicación totalmente diferente para explicar la relación entre la edad y el cáncer, propuso que la incidencia de cáncer aumentaba con la edad, debido a que la célula tumoral necesitaba realizar un cierto número de divisiones celulares, que tomaban su tiempo, para dar lugar a la aparición del cáncer.¹¹ La cuestión estaba entonces en el proceso que tenía lugar en las células en los intervalos entre las diferentes divisiones. Según Timoféeff-Ressofsky *et al.* y Schroedinger, las mutaciones constituían este proceso que ocurría de manera incesante en un gran número de células.¹² Si estas células portadoras de la mutación se propagaban, es decir, si mantenían la capacidad de autorrenovación, las células mutadas se multiplicaban y en este caso era probable que alguna de las células ya mutadas adquiriera una nueva mutación. En base a estas teorías, Nordling^{12,13} sugirió que probablemente fuese necesaria la adquisición de mutaciones sucesivas en una misma célula para desarrollar cáncer, asumiendo que solamente aquellas mutaciones que incrementan la tasa de proliferación celular y las que producen que la célula no se desarrolle de manera normal, ocasionan este efecto.^{12,13}

En el año 1976, Nowell¹⁴ propone la hipótesis de la evolución clonal de los tumores, expone que el inicio de un proceso tumoral es inducido por la adquisición de una alteración en una célula normal, que la convierte en una célula neoplásica, y le proporciona una ventaja proliferativa frente a las células normales adyacentes. La proliferación neoplásica puede ocurrir inmediatamente o tras un periodo de latencia. A partir de este momento, y como resultado de la inestabilidad genética en la población tumoral que se está expandiendo, se producen células con diferentes mutaciones en el

organismo, muchas de las cuales serán eliminadas por el sistema inmunológico. Sin embargo, alguna de estas células adquirirá una nueva mutación que le proporciona una ventaja selectiva adicional con respecto a las células originarias del tumor y a las células normales, y se convertirán en los precursores de una nueva subpoblación predominante.¹⁴ En este proceso denominado evolución clonal, las células tumorales adquieren más mutaciones que les permite tornarse cada vez más agresivas en sus propiedades y más proliferativas. Estas características son propias de un proceso darwiniano de evolución; la evolución demanda diversidad genética en una población determinada, a partir de la cual seleccionar individuos aptos para adaptarse a una presión ambiental concreta. En los tumores, esta heterogeneidad la proporciona la inestabilidad genómica propia de las células neoplásicas. Por este motivo, esta teoría evolutiva de los tumores se conoce como la teoría de la evolución darwiniana. La teoría de la evolución clonal en cáncer ha sido apoyada por numerosos autores y ha sobrevivido a 43 años de pruebas y observaciones empíricas, responde a cuestiones fundamentales sobre la biología del cáncer, como la progresión de los tumores, la diferencia entre alteraciones neutras para las células y las alteraciones que le proporcionan una ventaja selectiva y el desarrollo de resistencia al tratamiento (Figura 3).^{15,16}

Actualmente sabemos que el cáncer se desarrolla como resultado de la acumulación de alteraciones somáticas en genes que modifican los puntos de control de la división celular, lo que resulta en una proliferación celular anormal y finalmente en la tumorigénesis.¹⁷ Dependiendo del tipo de tumor, las células adquieren más o menos mutaciones, siendo los tumores pediátricos y las leucemias las neoplasias con un menor número de alteraciones, en torno a 9-10 alteraciones.¹⁵

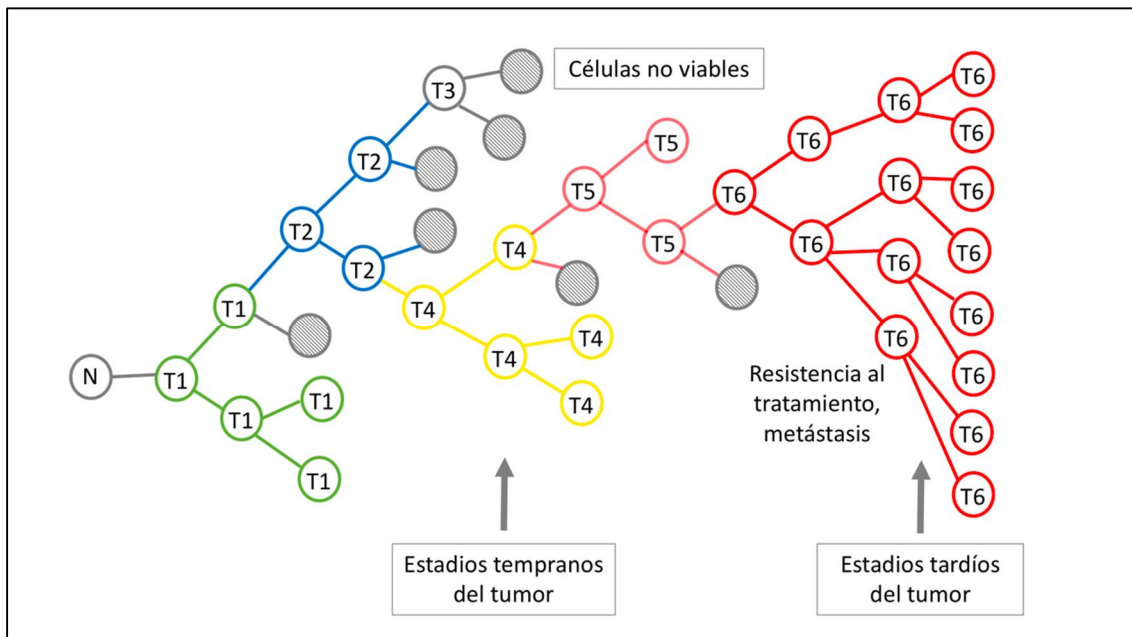


Figura 3. Modelo de evolución clonal en cáncer. (Los agentes carcinogénicos inducen la transformación de una célula normal (N) en una célula tumoral (T1) con ventajas proliferativas que permiten el inicio de la expansión clonal. La inestabilidad genómica de T1 conlleva a la producción de variantes (T2-T6), la mayoría de ellas mueren por una desventaja metabólica o inmunológica (círculos rayados), durante un tiempo una población celular se mantiene como predominante (T2) hasta que otra subpoblación adquiere características más favorables que la convierten en la predominante (T4). Este proceso secuencial difiere en cada tumor. Modificada de Nowell, 1976¹⁴).

La transformación leucémica de las células hematopoyéticas tiene lugar a través de un proceso evolutivo, que requiere de la adquisición de alteraciones genómicas que dotan a la célula de una diversidad genética conocida como heterogeneidad intratumoral.¹⁸ Las primeras alteraciones genéticas darán lugar a células en estadios pre-malignos, denominadas células pre-leucémicas, y la adquisición de mutaciones adicionales convertirá a algunas de estas células en clones abiertamente malignos. La progresión de un clon u otro dependerá del tipo de mutaciones adquiridas; progresarán aquellos clones con mutaciones que le confieren a la célula una ventaja proliferativa y/o características anti-apoptóticas, siempre y cuando mantengan la capacidad de autorrenovación.¹⁹ Debido a que estos clones se dividirán más rápidamente de lo normal, superarán el desarrollo de otras células hematopoyéticas y se transformarán en el clon dominante (Figura 4).

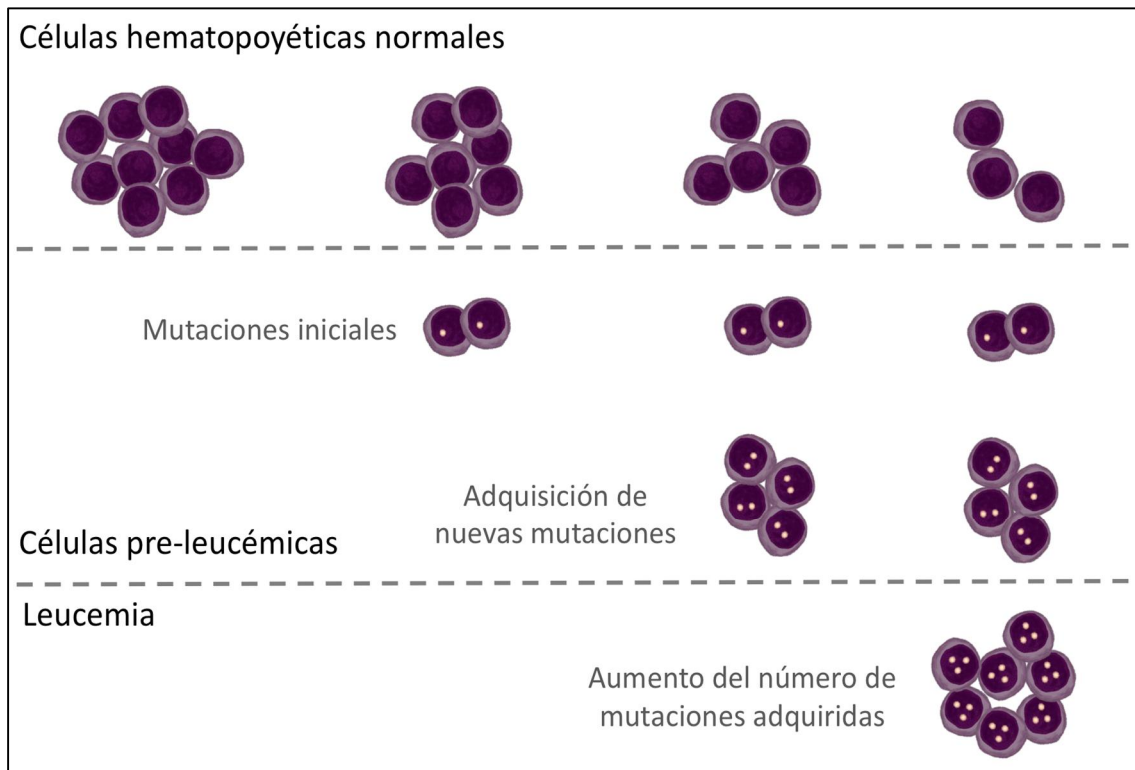


Figura 4. Modelo de evolución clonal de las células hematopoyéticas en un clon leucémico.

En los últimos años, el empleo de nuevas técnicas citogenéticas y de biología molecular han permitido la caracterización de diversas alteraciones genéticas recurrentes identificadas en las NHs, permitiendo un mayor conocimiento de su fisiopatología. Así, hablamos de la existencia de biomarcadores genéticos con potencial diagnóstico, ya que un número elevado de alteraciones genéticas se asocian específicamente con determinadas neoplasias. Estos biomarcadores se han convertido, además, en herramientas clínicas con un potencial pronóstico, en muchas ocasiones constituyendo factores pronóstico independientes de otras variables clínicas, que permiten una mejor estratificación de los pacientes en determinados grupos en función del riesgo.^{20,21,22,23} Además, estas alteraciones genéticas se emplean como marcadores moleculares para el seguimiento de la enfermedad.

Por otro lado, la caracterización genética de las NHs favorece también a la identificación de dianas moleculares que permiten la selección de nuevos tratamientos dirigidos a mutaciones específicas, obteniendo así una mejor respuesta terapéutica.²⁴

En la actualidad, el catálogo de alteraciones genéticas asociadas a las NHs, con valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico es tan elevado que es necesario abordar el análisis de las mismas por técnicas de secuenciación masiva que nos permitan estudiar un gran número de genes al mismo tiempo. Por esta razón, en los últimos años se ha producido la implementación progresiva de la de secuenciación masiva en la rutina asistencial, lo que supone un cambio de paradigma en el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes.²⁵

Así mismo, la secuenciación masiva permite detectar de manera indirecta la adquisición de mutaciones a lo largo del tiempo que conducen al desarrollo de una leucemia, mediante la detección de diferencias en la proporción relativa de mutaciones co-ocurrentes en la muestra tumoral. Gracias a la profundidad de lectura alcanzada por esta tecnología podemos detectar diferencias de frecuencia entre el alelo normal y el alelo mutado, que se expresan como frecuencia alélica de la variante (FAV). La FAV es la proporción de lecturas que contienen el alelo mutado respecto a las lecturas totales en una posición determinada, a partir de estas proporciones relativas es posible inferir la arquitectura tumoral.²² Estos estudios han demostrado la aparición de nuevos clones portadores de mutaciones a lo largo de la evolución de la leucemia.^{26, 27} En el momento del diagnóstico, aquellas mutaciones que tienen una FAV alta probablemente habrán tenido lugar en estadios tempranos de la enfermedad, mientras que aquellas mutaciones que están presentes en una fracción minoritaria de células se habrán adquirido en estadios tardíos del desarrollo. Esta heterogeneidad clonal también se ha demostrado en estudios longitudinales en los que se han estudiado muestras del diagnóstico de la enfermedad y muestras de la recaída del mismo paciente, identificándose así diferentes patrones de recaída.²⁸ Las recaídas pueden provenir de la expansión de los clones mayoritarios o minoritarios presentes en el diagnóstico o bien pueden deberse a la aparición de nuevos clones que comparten una relación ancestral con el clon del diagnóstico (Figura 5).²²

Estos estudios han documentado la presencia de mutaciones tempranas o iniciadoras que están presentes en todas las células del tumor y también han detectado mutaciones que se mantienen tras un fallo de respuesta al tratamiento. El estudio de estos modelos biológicos permite identificar mecanismos de transformación neoplásica. Otro modelo

útil para identificar estos mecanismos, lo proporcionan las células en las que se produce una transformación maligna en los pacientes diagnosticados de SMD que progresan a LMA secundaria.²⁹

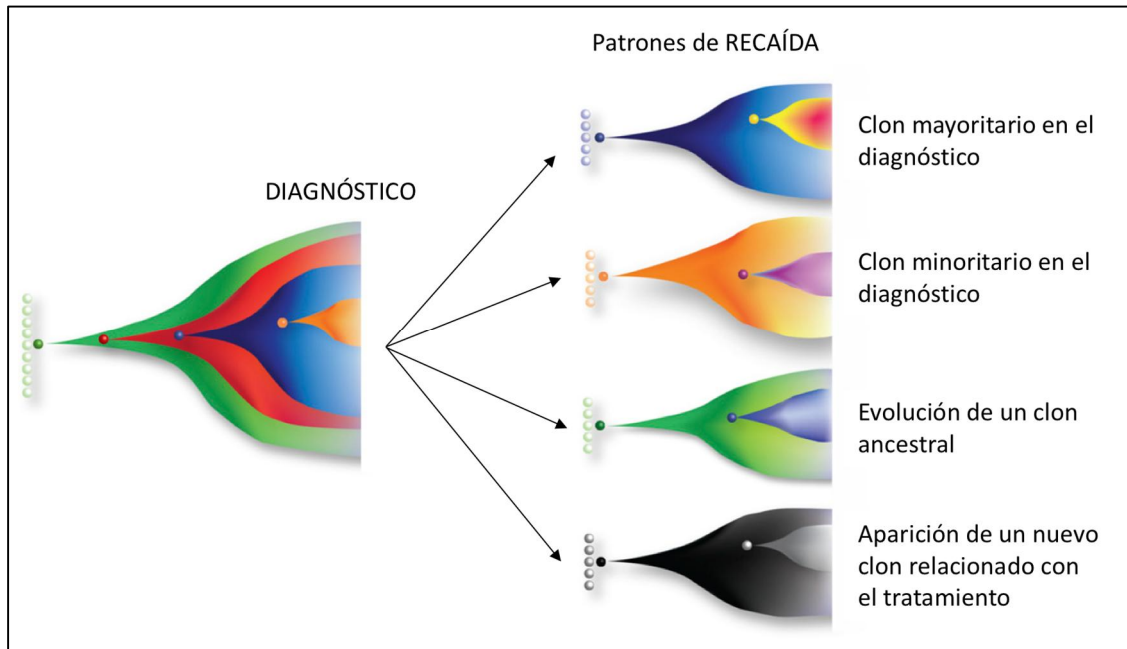


Figura 5. Patrones de recaída observados en la leucemia mieloide aguda. (Imagen modificada de Grimwade. et al. 2016²²).

Sin embargo, en estos modelos biológicos no es posible estudiar la dinámica real de adquisición de las alteraciones moleculares pre-leucémicas, ya que las muestras disponibles corresponden al momento del diagnóstico de la neoplasia en el paciente y de su evolución posterior, pero habitualmente, no se dispone de muestras previas al diagnóstico.

Existe una patología denominada neoplasia hematológica en las células del donante (NHCD) que es una complicación extremadamente infrecuente de pacientes que han recibido un alo-TPH. En estos casos, al ocurrir la neoplasia en un paciente que está siendo sometido a controles periódicos tras el trasplante, es factible que existan muestras anteriores al diagnóstico de la NHCD susceptibles de ser estudiadas. Así, la NHCD proporciona un modelo *in vivo* de leucemogénesis a través del cual se podría estudiar la dinámica de adquisición de mutaciones que tienen lugar en el desarrollo de una NH.

1.4. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

El desarrollo del trasplante hematopoyético se inició en los años 50, como consecuencia de las deficiencias de MO ocurridas en pacientes por causa de la radiación o de tratamientos de quimioterapia. Los primeros TPHs se llevaron a cabo en el año 1957 por el Thomas y colaboradores³⁰ (en 1990 fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina, compartiendo este honor con Joseph E. Murray, pionero en el área del trasplante de riñón), desde entonces hasta la actualidad se ha consolidado el papel del TPH como terapia celular en un gran número de enfermedades malignas y no malignas. Su aplicación en neoplasias hematológicas comenzó en los años 70,³¹ después de más de 50 años de desarrollo. La enorme variedad de procedimientos disponibles actualmente, que incluye diferentes tipos de donantes, fuentes de PHs e intensidad de tratamiento lo han convertido en la única opción curativa disponible para muchos pacientes con este tipo de enfermedades hematológicas.³²

El alo-TPH consiste en la administración de un tratamiento quimioterápico, denominado acondicionamiento, de intensidad variable y con efecto inmunosupresor, a veces administrado junto con radioterapia (irradiación corporal total (ICT)) y seguido de la infusión intravenosa de los PHs extraídos de un donante sano, los cuales reconstituirán, de forma estable, la hematopoyesis en el receptor. La gran ventaja del alo-TPH, es que además de permitir la administración de una terapia antineoplásica intensiva que destruye las células tumorales, las células del donante desarrollan una reacción inmunológica frente a las células tumorales residuales del receptor, denominada, efecto injerto contra tumor (EICT) de base aloinmune y de larga duración, que contribuye decisivamente a la erradicación de la neoplasia.³² El alo-TPH es posible gracias a la identificación del sistema HLA o complejo mayor de histocompatibilidad. El sistema HLA está compuesto por glicoproteínas presentes en la membrana de todas las células nucleadas, cuyos genes se hallan en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31), se heredan como haplotipos y son determinantes para el reconocimiento de lo propio y lo extraño por parte de los linfocitos T.

Las modalidades de trasplante se han diversificado según el tipo de donante, la fuente de PHs y la intensidad del acondicionamiento. Según el tipo de donante, el alo-TPH

puede ser familiar: HLA idéntico (TPH-HLA-id) o haploidéntico (TPH-Haplo), o no familiar de donante no emparentado voluntario (TPH-DNE) HLA-id o Haplo. La fuente de PHs puede ser la MO del donante, de la que se extraen los progenitores mediante punciones sucesivas de la sangre medular a nivel de la cresta ilíaca posterosuperior; la SP, de la que los PHs se recogen mediante leucoaféresis tras movilizarlas con factores de crecimiento hematopoyético para que se liberen de la MO a la SP o la sangre cordón umbilical (TPH-SCU), cuyos PHs se obtienen tras un parto. Las tres fuentes de células progenitoras tienen distintas características biológicas que condicionan el desarrollo del procedimiento. El TPH de SP proporciona un implante más precoz que el de MO y el de SCU, ya que contiene un mayor número de PH, lo que se traduce en un acortamiento del periodo de aplasia y un menor número de días de exposición a las infecciones. Del mismo modo, al tener el inóculo un mayor número de linfocitos, se incrementa el riesgo de enfermedad injerto contra receptor (EICR), ocasionada por el ataque de los linfocitos T del donante a otros tejidos del receptor que reconoce como extraños. La SCU tiene una alta proporción de PH, pero permite obtener un menor volumen de sangre total con lo que el número final de progenitores es limitado. Adicionalmente, las poblaciones linfocitarias presentes en la SCU son inmunológicamente más inmaduras, lo que conlleva una menor EICR, pero se asocia a un riesgo aumentado de fallo del injerto y una recuperación inmunológica más lenta que las otras dos fuentes de progenitores. Por último, la intensidad del tratamiento de acondicionamiento se define según sea mieloablativo (AMA), en el cual el régimen de preparación utilizado produce una lesión irreversible de las células hematopoyéticas de la MO seguida de una pancitopenia muy intensa de la que sólo se recupera con la infusión de los PH del donante o de intensidad reducida (AIR), el tratamiento de acondicionamiento utilizado es menos intenso, menos mielosupresor pero más inmunosupresor.³²

Pese al avance en el conocimiento de la biología de la leucemia, en las últimas décadas una proporción elevada de los pacientes presentan recaída de su enfermedad tras el alo-TPH.—Ocasionalmente, la enfermedad en la recaída puede presentar un inmunofenotipo y unas características citogenéticas diferentes a las que tenía la enfermedad primaria, como consecuencia de una evolución clonal o de la supervivencia de clones minoritarios que no se detectaron en el momento del diagnóstico, estos

clones de la recaída suelen tener su origen en las células del receptor. Sin embargo, puede ocurrir que el paciente trasplantado desarrolle una neoplasia *de novo* en las células del donante, ésta es una complicación poco frecuente, pero severa del alo-TPH, que recibe el nombre de NHCD. Para diferenciar estos dos eventos es necesario la determinación del quimerismo hematopoyético, o proporción relativa de celularidad del donante y el receptor post-alo-TPH.

La valoración del quimerismo se basa en la capacidad de distinguir células del donante y el receptor, de diferente origen genético, durante el periodo post alo-TPH. Para ello se estudian secuencias polimórficas del genoma como los microsatélites (SRTs, del inglés *Short Tandem Repeats*) que tienen un alto índice de heterozigosidad y un número elevado de alelos en la población. El quimerismo es un indicador de la efectividad del trasplante y sirve como guía en el manejo del paciente, para, por ejemplo anticipar o diagnosticar precozmente un fallo del injerto o una recaída. El quimerismo puede clasificarse como quimerismo completo (QC) todas las células que se detectan proceden del donante; reconstitución autóloga (RA), cuando todas las células proceden del receptor o quimerismo mixto (QM), cuando coexisten células del donante y células del receptor. La situación ideal tras el alo-TPH conlleva la detección de QC. Cuando el paciente sufre una recaída de la enfermedad se detecta QM o, finalmente, RA con presencia de enfermedad. En los casos en los que el paciente desarrolla una NHCD el diagnóstico de la neoplasia se realiza en una situación de QC (Figura 6).

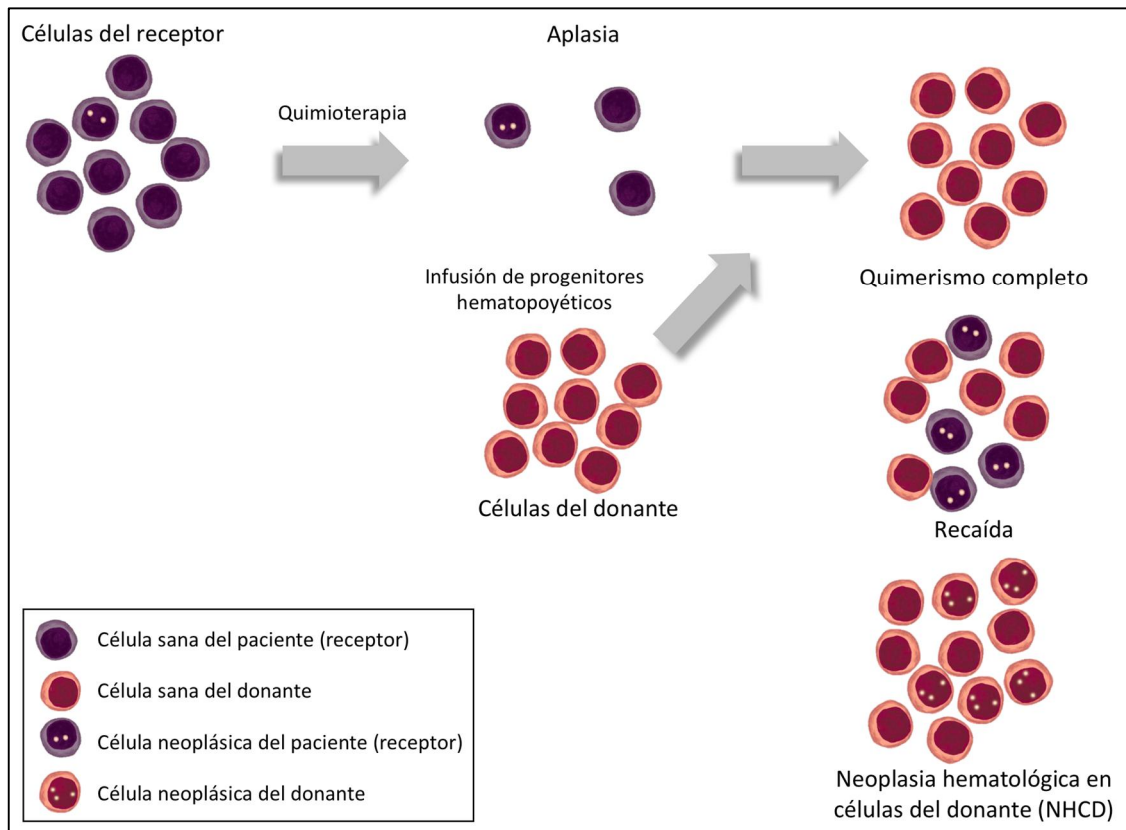


Figura 6. Origen celular del sistema hematopoyético del receptor y alguna de las posibles complicaciones tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

1.5. Neoplasia hematológica en células del donante (NHCD)

El primer caso de NHCD fue descrito por Fialkow en el año 1971, se trataba de una paciente diagnosticada con 16 años de leucemia linfoblástica aguda (LLA) refractaria y que recibió un alo-TPH de su hermano HLA-idéntico. A los 62 días del trasplante se objetivó una reaparición de la leucemia, pero los blastos tenían un cariotipo masculino (XY), lo que llevó a concluir a los autores que las células leucémicas tenían que provenir del donante.³³ Posteriormente, se publicaron un mayor número de casos, la mayoría de forma aislada o en pequeñas series. La incidencia de esta enfermedad es difícil de estimar y las cifras varían entre distintos estudios. Se diagnosticaron 3 pacientes de 243 trasplantes alogénicos (1,2%) con NHCD en el estudio realizado por Boyd *et al.*,³⁴ 14/10.498 (0,13%) por el Grupo Europeo de Trasplante,³⁵ 4/478 (0,84%) por el banco de sangre de cordón de Tokyo³⁶ y 40/36.870 (0,1%) por Kato *et al.*³⁷ Esta incidencia podría estar infra-estimada por la dificultad para diferenciar entre recaída de la enfermedad

original del paciente y la aparición de NHCD, con las técnicas moleculares clásicas que se empleaban para el estudio del quimerismo.

La etiología de la NHCD no está clara, se han propuesto varios mecanismos, pero los datos disponibles sobre los mecanismos de transformación de los PHs del donante son limitados y la heterogeneidad de los casos excluye la identificación de un mecanismo simple (Figura 7).

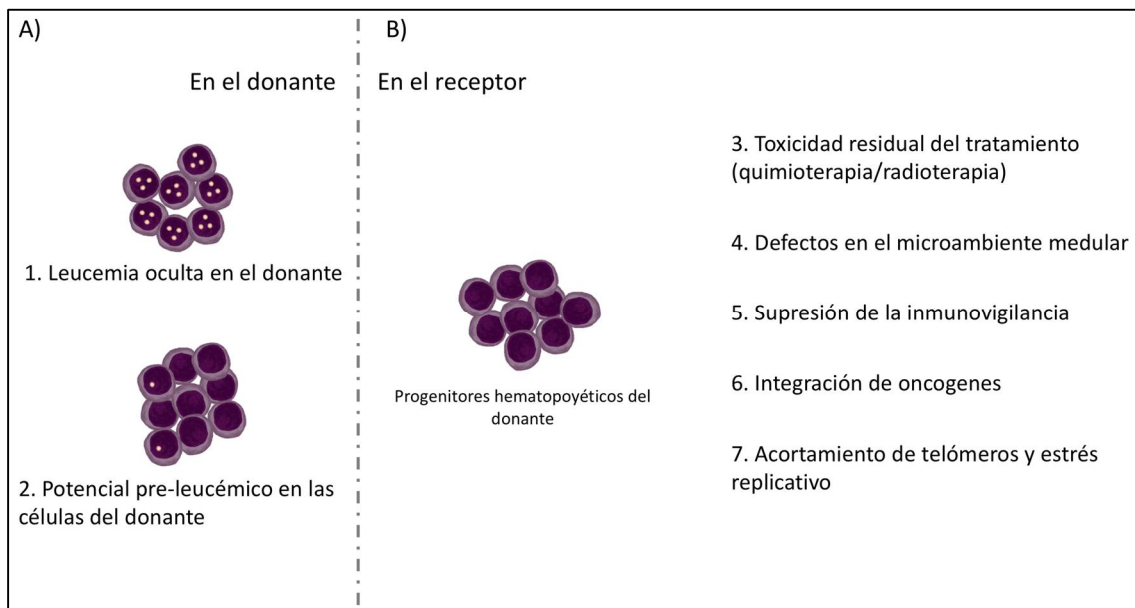


Figura 7. Mecanismos que pueden influir en el desarrollo de una NHCD ocurridos antes (A) o después (B) del trasplante.

1.- Leucemia oculta en el donante.

La explicación más sencilla de la NHCD sería la existencia de un clon maligno presente en el donante en el momento de la extracción de los progenitores hematopoyéticos que posteriormente se van a infundir en el receptor. Niederwieser *et al.*³⁸ reportaron un caso de transmisión inadvertida de leucemia mieloide aguda (LMA) en un paciente con leucemia mieloide crónica, desde el donante que no tenía leucemia en el momento de la donación, pero desarrolló una LMA franca poco tiempo después. Seis meses después de la infusión del injerto contaminado, el receptor desarrolló una LMA con idénticas características morfológicas, fenotípicas y citogenéticas a la LMA diagnosticada en el donante.³⁸ Existen otros casos de NHCD en los cuales el donante también desarrolla una NH, de características similares a la diagnosticada en el receptor, después de la donación

de progenitores hematopoyéticos.^{39,40} No obstante, en aquellos casos de NHCD, en los que se ha podido realizar un seguimiento de los donantes, la mayor parte de los mismos está sana en el momento del diagnóstico de la NHCD en el receptor.

2.- *Potencial pre-leucémico en las células del donante.*

El cáncer es una enfermedad que tiende a ocurrir en individuos genéticamente predispuestos. Numerosos estudios epidemiológicos indican de forma consistente que los familiares de primer grado de pacientes afectados de cáncer tienen un riesgo de desarrollar la enfermedad 2 o 3 veces superior a la población general, lo que parece implicar un importante componente de susceptibilidad genética al cáncer. Por lo que, un donante de precursores hematopoyéticos supuestamente sano, puede tener una dotación genética heredada con un potencial premaligno.

Históricamente, las NHs han sido consideradas como eventos esporádicos, que ocurrían de manera aleatoria en la población general. Únicamente los síndromes relacionados con fallo de MO, enfermedades teloméricas y el síndrome de Down se asociaban con predisposición al desarrollo de síndrome mielodisplásico (SMD) y/o LMA. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito un subgrupo de mutaciones constitucionales en genes como *RUNX1*, *CEBP α* , *ETV6*, *ANKRD26*, *DDX41*, *GATA2*, *TP53*, etc., que le otorgan al individuo una susceptibilidad al desarrollo de neoplasias mieloides. Este grupo de síndromes de predisposición al desarrollo de neoplasias mieloides forman parte de una nueva entidad en la última revisión de la clasificación de las neoplasias hematológicas realizada por la Organización Mundial de la Salud.⁴¹ Estos casos se asocian con la existencia de alteraciones genómicas en línea germinal, heredadas o *de novo*, que se comportan como rasgos mendelianos y que predisponen al individuo al desarrollo de una neoplasia hematológica a lo largo de su vida.⁴² En líneas generales estos síndromes tienen una penetrancia incompleta y expresividad variable, por lo que es posible que el donante sea portador de una mutación en uno de los genes de predisposición al cáncer aunque no se detecten alteraciones hematológicas en él, ni en otros miembros de la familia. De la misma manera, las estas mutaciones pueden originarse *de novo* en los primeros estadios del desarrollo embrionario, por lo que no se detectará agregación familiar de neoplasia hematológicas en estos casos.

Por otro lado, los donantes también pueden tener una dotación genética con potencial pre-maligno adquirida. En los últimos años se ha detectado la presencia de hematopoyesis clonal (HC), en personas sanas que no tienen otros signos de enfermedad, especialmente en personas mayores. La existencia de HC se describió por primera vez en estudios que demostraron que aproximadamente el 25% de las mujeres sanas, mayores de 65 años tenían un patrón no aleatorio de inactivación del cromosoma X en las células sanguíneas,⁴³ el cual en muchos casos se asociaba con mutaciones en el gen *TET2*.⁴⁴ Hoy, sabemos que el 10% de las personas sanas mayores de 70 años son portadoras de mutaciones somáticas que producen un crecimiento clonal de las células hematopoyéticas. Estas mutaciones se denominan mutaciones iniciadoras y el número de sujetos portadores de las mismas aumenta con la edad.⁴⁵ Los genes relacionados con neoplasias mieloides más comúnmente mutados en sujetos sanos son *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *TP53*, *JAK2* y *SF3B1*. Sin embargo, en estos sujetos sanos sólo se detecta una mutación somática, al contrario de lo que ocurre en los pacientes con LMA o SMD, en lo que se detectan 2 o más genes causales mutados, hallazgos que son consistentes con la hipótesis de que estas personas tienen clones solamente portadores de la lesión iniciadora y es por ello que sus células hematopoyéticas mantienen la capacidad de diferenciarse normalmente. Aquellos sujetos que tienen una HC tienen un riesgo aumentado de desarrollar una NH y el empleo de donantes con mutaciones pre-leucémicas, potencialmente malignas, podría favorecer el desarrollo de una segunda NH en el receptor derivada de las células del donante.

3.- Toxicidad residual de la quimioterapia y/o radioterapia

La mejoría en las indicaciones y en el procedimiento del TPH ha permitido aumentar el número de supervivientes a largo plazo. No obstante, estos pacientes tienen mayor riesgo de presentar complicaciones tardías, entre ellas se encuentra el desarrollo de segundas neoplasias. Los estudios realizados han documentado que los supervivientes al TPH, tanto autólogo como alogénico, tienen un mayor riesgo de presentar una neoplasia secundaria con respecto a la población general, con una incidencia acumulada que oscila entre el 5 y el 21% a los 10 años,^{46,47,48} y que aumenta en los estudios a más largo plazo. Se han descrito varios factores que contribuyen al aumento de la incidencia

de neoplasias secundarias, entre ellos, la edad avanzada en el momento del TPH, la irradiación corporal total como parte del régimen de acondicionamiento, los tratamientos citostáticos empleados antes y durante el TPH y la EICR y su tratamiento inmunosupresor mantenido, entre otros.^{46,49}

En el caso de las NHCD, las células del donante no han tenido un contacto directo con los agentes terapéuticos administrados previos al alo-TPH (quimioterapia y radioterapia). Sin embargo, es posible que exista, como consecuencia de la toxicidad residual del tratamiento de acondicionamiento, un efecto citotóxico directo sobre los nuevos PHs del donante o a través de los elementos del estroma en el nicho en el que se van a albergar.

4.- Defectos en el microambiente medular

El estroma de la MO es un microambiente en el que se encuentran fibroblastos, adipocitos, osteoblastos, macrófagos y células endoteliales embebidas en una matriz insoluble de proteínas, la relación entre dichos componentes del estroma y los progenitores hematopoyéticos está mediada por numerosas citocinas o quimiocinas. Para el desarrollo de una correcta hematopoyesis es necesario un adecuado equilibrio de interacciones complejas entre los componentes del estroma y la alteración de este equilibrio puede tener un papel importante en la transformación leucémica.⁵⁰ El estroma de la MO se encarga de la recuperación de la hematopoyesis después del alo-TPH, por lo que, alteraciones en el microambiente medular del receptor, ya sea por características inherentes al receptor o como resultado de un efecto de la quimioterapia o de la radioterapia administrada, pueden facilitar el desarrollo de malignidad tras el alo-TPH.

5.- Supresión de la inmunovigilancia

Diariamente se generan en el organismo células con transformaciones potencialmente malignas que, debido a un proceso de inmunovigilancia, son eliminadas sin llegar a evolucionar como tumores establecidos. Una evidencia clínica de este fenómeno es la

alta frecuencia de tumores que se desarrollan en personas que presentan algún tipo de inmunodeficiencia.⁵¹ El paciente sometido a un alo-TPH padece una profunda inmunodepresión a la que contribuyen diversos factores tales como, el tratamiento de acondicionamiento, la enfermedad de base y la EICR y su tratamiento. A las 24-48 horas de finalizar el régimen de acondicionamiento se infunden en el receptor los progenitores hematopoyéticos del donante. De forma muy precoz post-alo-TPH se observan algunas células hematopoyéticas en la MO del receptor, si el injerto es eficaz en dos semanas ocurre el prendimiento. Entre los días +30 y +100 post alo-TPH, la función medular suele estar recuperada, alcanzando cifras normales de granulocitos y plaquetas; sin embargo, persiste una profunda depresión de la inmunidad adquirida, tanto humoral como celular, debido a que la recuperación de cifras y sobre todo de la funcionalidad normal de los linfocitos es más lenta. Los linfocitos T son los principales efectores de la respuesta inmune adaptativa y permanecen cuantitativa y cualitativamente suprimidos durante largos periodos de tiempo tras el alo-TPH. La reconstitución de células T es altamente variable y está influenciada por diversos factores. Así mismo, el número de linfocitos T del donante presente en las diferentes fuentes de PHs es variable, siendo significativamente menor en la SCU y en la MO con respecto a la SP, es por ello que la reconstitución inmune es más lenta en los pacientes que son trasplantados con SCU. Además, en los casos en los que suele aparecer la EICR aguda, que precisa de un tratamiento inmunosupresor, aumenta el tiempo y la profundidad de la situación de inmunosupresión. Así mismo, la EICR crónica se ha relacionado directamente con una peor reconstitución inmune y una mayor tasa de infecciones en el paciente.

Durante el periodo post alo-TPH, la inmunovigilancia del receptor está disminuida, por lo que es posible que, durante este tiempo, en el que existe una alta tasa de replicación celular, se adquieran mutaciones oncogénicas en algunas células del donante, que no son detectadas por el sistema inmune y que por lo tanto no son eliminadas.

6.- Integración de oncogenes

Algunos autores han especulado sobre la existencia de material leucemogénico en el nicho medular, oncogenes que provendrían de células leucémicas residuales en la MO y

que después del alo-TPH se integran directamente en el genoma de las células del donante. Esta hipótesis ha sido refutada ya que varios estudios han demostrado que las mutaciones detectadas en las células del donante son diferentes a las mutaciones detectadas en la enfermedad hematológica primaria por la cual el paciente había sido sometido al alo-TPH.

7.- Acortamiento de telómeros y estrés replicativo

Los extremos de los cromosomas se conocen como telómeros y son estructuras de cromatina especializadas que tienen una función protectora. La secuencia de ADN telomérico es específica y está compuesta de múltiples repeticiones en tándem bicatenario (TTAGGG). Esta secuencia tiene típicamente unos 10-15 kb de longitud en las células humanas y está unida por proteínas específicas. Es también el sustrato para la telomerasa, una enzima que alarga los telómeros en las células en las que se expresa. Cada división celular puede dar como resultado la pérdida de las repeticiones TTAGGG porque la polimerasa de ADN convencional no puede replicar un cromosoma lineal en su totalidad, lo que se conoce como problema de replicación del extremo. Cuando los telómeros alcanzan una longitud mínima crítica por su acortamiento, hay una pérdida de protección y, como consecuencia, una inestabilidad genómica.

En el periodo post-trasplante, los PH están sometidos a una tasa de replicación mayor de la habitual, ya que tienen que reponer por completo el sistema linfohemopoyético del receptor. Varios estudios documentan que existe un acortamiento significativo y acelerado de los telómeros tras el trasplante de PHs, especialmente durante el primer año.^{52,53} La combinación del estrés replicativo, junto con la alteración del mantenimiento de los telómeros y la inestabilidad genómica que esto genera, podría favorecer la aparición de una hematopoyesis clonal temprana en las células del donante.

Debido a la rareza de las NHCDs se conoce poco acerca de los factores de riesgo que inducen a su aparición, el pronóstico y el tratamiento óptimo de estos pacientes.

Por otro lado, como hemos comentado previamente, la NHCD presenta una oportunidad única para estudiar la dinámica de aparición de mutaciones tempranas que conducen al desarrollo de una neoplasia hematológica ya que, a diferencia de lo ocurrido en las leucemias *de novo*, en las que sólo se dispone de muestras susceptibles de análisis genómico a partir del momento del diagnóstico, en el caso de las NHCD, las muestras obtenidas para en el seguimiento genético del paciente trasplantado y previas al desarrollo de la neoplasia hematológica permiten analizar, de forma retrospectiva los sucesos que conducen a su desarrollo

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as bright red, oval shapes with a darker center. They are scattered across the lower half of the image.

Hipótesis

2. HIPÓTESIS

La NHCD es una complicación poco frecuente del alo-TPH de etiología e incidencia desconocida. Los casos descritos muestran elevada heterogeneidad, lo que ha provocado que se propongan diversos mecanismos para su gestación. Por otro lado, esta entidad presenta una oportunidad única para estudiar prospectivamente los cambios genómicos experimentados por los progenitores hematopoyéticos que conducen a la transformación maligna, ya que, en la población general la leucemia aparece normalmente de manera esporádica e impredecible, mientras que de aquellos pacientes que han sido sometidos a un alo-TPH se dispone de muestras seriadas post alo-TPH susceptibles de ser analizadas.

En este escenario, se plantearon las siguientes hipótesis:

1. La revisión sistemática de los casos de NHCDs descritos en la literatura permite identificar variables clínicas y biológicas (especialmente genéticas) de los pacientes y características del alo-TPH asociadas con la aparición de NHCD.
2. El estudio de las muestras secuenciales post alo-TPH de pacientes con NHCD, permite la detección de cambios experimentados en el genoma de los PHs del donante que conducen a la transformación maligna.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as bright red, oval shapes with some showing a central indentation. They are scattered across the lower half of the image.

Objetivos

3. OBJETIVOS

En el presente trabajo se plantean dos objetivos globales:

1. Identificar las características clínicas de los pacientes, las características del alo-TPH y las características biológicas (especialmente genéticas) implicadas en la patogénesis de la NHCD mediante una revisión sistemática de los casos reportados en la literatura.
2. Estudiar la dinámica de adquisición y pérdida de alteraciones genómicas en el proceso de leucemogénesis, que conduce a la NHCD.

Para abordar este segundo objetivo global, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- I. Analizar muestras secuenciales desde el momento del alo-TPH hasta el desarrollo de la NHCD en la cohorte nacional de NHCD mediante secuenciación del exoma completo.
- II. Estudiar el genotipo de los donantes mediante secuenciación del exoma completo.
- III. Estudiar la heterogeneidad intratumoral y definir un modelo de evolución clonal a lo largo del proceso de leucemogénesis.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as lighter red, oval shapes with some showing their characteristic indentation. They are scattered across the lower half of the image.

Material y métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Revisión sistemática de la literatura

Se realizó una búsqueda bibliográfica en Pubmed y Embase empleando los términos: “*donor cell leukemia*”, “*donor cell origin leukemia*” y “*donor cell-derived leukemia*” para identificar todas las citas desde enero de 1971 hasta marzo de 2017 que describen los casos de NHCD. También se examinaron manualmente las referencias bibliograficas de los artículos recuperados para complementar manualmente la búsqueda inicial.

Se incluyeron en el estudio todos los casos de NHCD publicados en inglés siempre y cuando el origen de la célula del donante estuviese bien documentado mediante citogenética convencional, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en pacientes de sexo opuesto y/o técnicas moleculares (microsatélites, repeticiones cortas en tándem (STR) o minisatélites, número variable de repeticiones en tándem (VNTR)).

En las búsquedas iniciales en Pubmed y Embase se obtuvieron 574 publicaciones no duplicadas y tras la búsqueda manual se añadieron 31 artículos adicionales (Figura 8). Finalmente, se seleccionaron para la revisión sistemática 101 publicaciones con un total de 137 casos de NHCD (Anexo III).

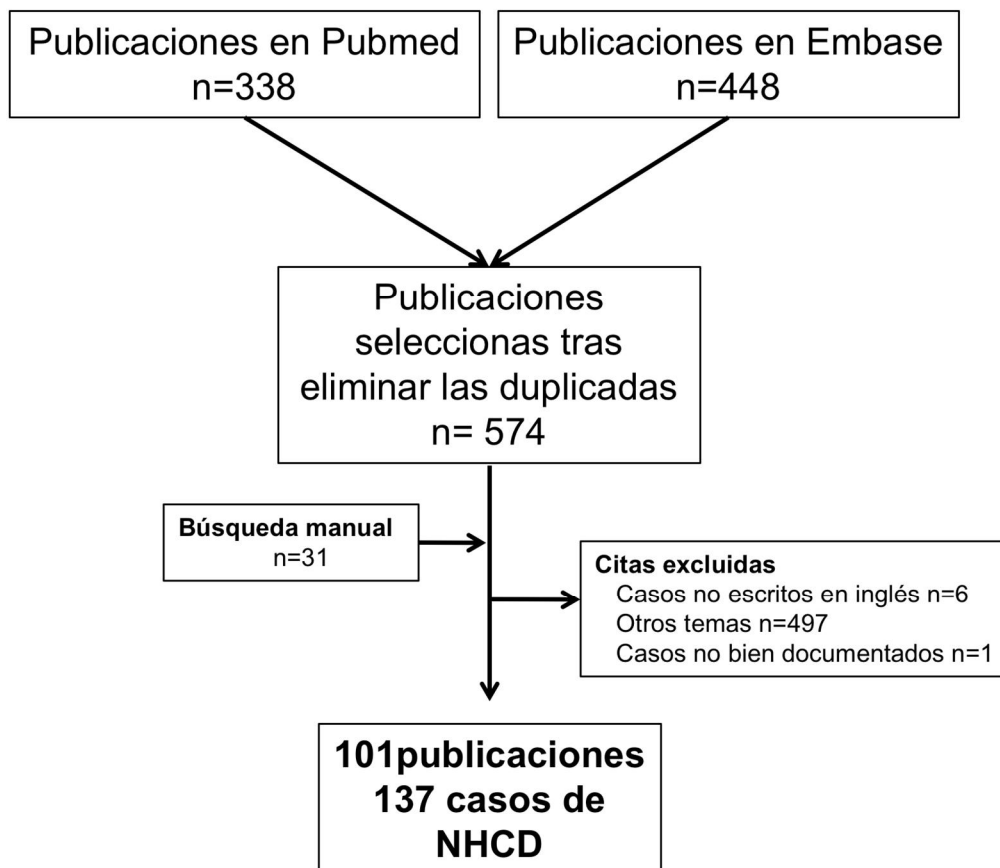


Figura 8. Proceso de búsqueda de casos y publicaciones de NHCD en la revisión sistemática realizada.

Se recogieron los datos más relevantes que incluyen características del receptor y del donante (edad, sexo), enfermedad hematológica primaria, estado previo al trasplante, fuente de PH, tipo de donante, régimen de acondicionamiento (mieloablatoivo, no mieloablatoivo), complicaciones postrasplante (EICR, infecciones), tipo de neoplasia hematológica derivada de las células del donante, citogenética de la enfermedad primaria y de NHCD y método empleado en el estudio del quimerismo.

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como mediana o media y rango, mientras que las variables cualitativas se expresaron como frecuencia y porcentaje. Se utilizaron las pruebas U de Mann Whitney e incidencia acumulada para identificar diferencias en el tiempo desde el momento del alo-TPH hasta el diagnóstico de NHCD según la fuente de PH empleada (SCU, SP, MO), el tipo de NHCD (LLA, LMA y SMD) y la edad del donante. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico R Studio v3.2.4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) y se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

4.2. Estudio genómico de una amplia cohorte de pacientes con NHCD

4.2.1. Pacientes y muestras analizadas

Se planteó un estudio multicéntrico retrospectivo en el que se incluyeron 9 pacientes provenientes de 4 hospitales españoles pertenecientes al Grupo Español de Trasplante Hematopoyético (GETH).

Las principales características clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

MATERIAL Y MÉTODOS

UPN	E/S	Enfermedad primaria	Donante E/S	Estado pre-TPH	Tipo de donante	PH	Tipo de NHCD	Citogenética de NHCD	Meses de TPH a NHCD	Tto.	Donante
1	56/V	LM	72/V	2ªRC	E-id	SP	SMD	45,XY,-7,del(12)(p12)	57	AZA + TPH	Displasia MO
2	26/M	LLA	64/V	2ªRC	E no-id*	MO	SMD	46,XY,del(5q),del(7q)	34	-	Sano
3	39/V	LMC-FC	49/V	NRC	E-id	MO	SMD	45,XY,-7	249	AZA + TPH	Sano
4	60/V	LMA	55/M	1ªRC	E-id	SP	LMA	45,XX,t(3;16)(q21;q22),-7[16] 90-130,XXXX,t(3;16) (q21;q22),t(3;16)(q21;q22),-7,-7,+2-5 marc[2], 46,XX[2]	19	AZA + TPH	Sano
5	55/V	LM	59/V	1ªRC	E-id	SP	LMA	46,XY,del(7)(q31q36)// 47,XY,+1,der(1;7)(q10;p10)	67	AZA + TPH	Sano
6	46/M	LLA	0/M	1ªRC	DNE	SCU	LMA	46,XX	24	AZA + TPH	-
7	46/V	LLA	63/M	1ªRC	E no id*	MO	SMD	46,XX,t(10;11)(q24;p15)[13] 45,sl,-13,16,+mar[2] 46,sl,del(7)(q22)[5]	5	HDX	Sano
8	43/M	LLA	0/V	1ªRC	DNE	SCU	LMA	46,XY	16	Etoposido	-
9	56/V	LMA	59/V	3ªRC	HAPLO	SP	LMA	46,XY	42	-	Sano

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con NHCD. (Abreviaturas: NHCD: Neoplasia hematológica en células del donante, E/S: Edad y Sexo V: Varón, M: Mujer, LM: Linfoma del manto, LLA: Leucemia linfoblástica aguda, LMA: Leucemia mieloides aguda. LMC-FC: Leucemia mieloides crónica BCR-ABL1 positivo – fase crónica, RC: Remisión completa, complete remission, NRC: No respuesta citogenética, SMD: Síndrome mielodisplásico, E-id: Emparentado HLA-idéntico, E no-id: Emparentado no HLA-idéntico, DNE: Donante no emparentado, HAPLO: Haploidéntico, PH: Progenitores hematopoyético, SP: Sangre periférica, MO: Médula ósea, SCU: Sangre de cordón umbilical, Tto: Tratamiento, AZA: Azacitidina, TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos, HDX: Hidroxiurea. (*) HLA no idéntico una diferencia. Los pacientes se trasplantaron entre el año 1994 y 2015. Los donantes estaban sanos en el momento del diagnóstico de NHCD). Todos los pacientes fallecieron excepto el paciente #3 que está vivo tras recibir un 2º trasplante de otro donante.

El estudio incluyó un total de 40 muestras de MO correspondientes a diferentes tiempos post alo-TPH (Figura 9), así como una muestra de SP de cada donante (más una muestra de SCU del segundo donante en un caso que recibió un trasplante alogénico dual (Haplo-cord), que proporcionó un total de 50 muestras. La mediana del número de muestras fue de 4 por paciente (rango 3-9).

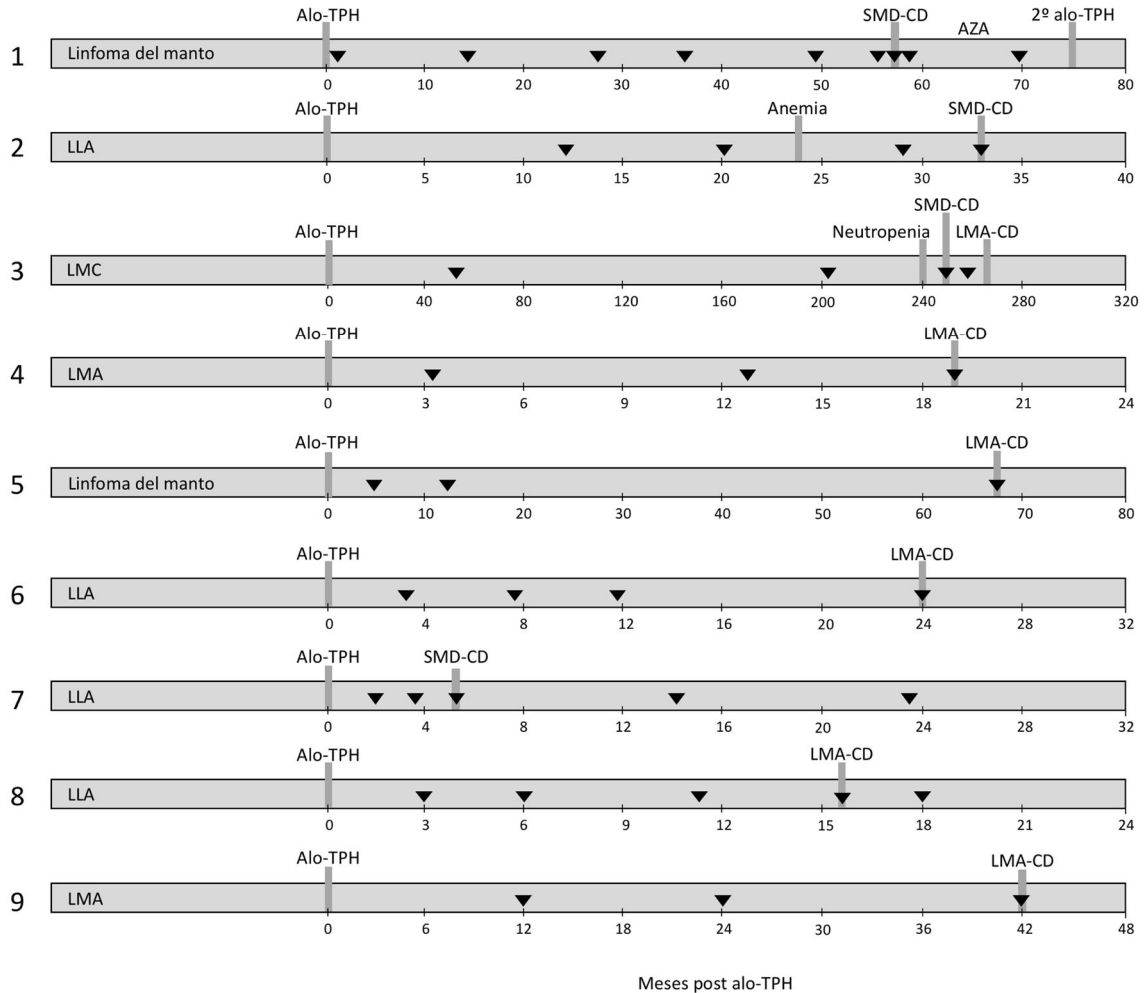


Figura 9. Muestras de MO del periodo de seguimiento post-TPH analizadas en los pacientes con NHCD. (Los triángulos negros simbolizan el momento en el que se toma cada una de las muestras (n=40)).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y todos los sujetos a estudio dieron su consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki. La información de pacientes y donantes se recogió de sus registros médicos.

4.2.2. Secuenciación del exoma completo

Se obtuvo el ADN genómico de las muestras de SP y MO. Se confirmó en nuestro laboratorio el origen de las células del donante (QC) en todos los casos de NHCDs mediante análisis de quimerismo mediante PCR-STR (AmpFISTR SGM plus; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). La preparación de las librerías de exoma completo e indexado de las mismas se realizó empleando el kit de enriquecimiento por captura SureSelect-XT Human exon 50Mb (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Las librerías se secuenciaron en la plataforma HiSeq (2x101 - paired-end; Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

4.2.3. Análisis de las variantes genómicas en las muestras del receptor post-TPH

Los datos de secuenciación se alinearon frente al genoma humano de referencia (GRCh38/hg38) usando la herramienta de alineación de Burrows Wheeler (BWA) v0.7.15-r1140⁵⁴ y las secuencias marcadas como duplicados de PCR se eliminaron utilizando los métodos Samtools v1.2⁵⁵ y Picard Tools v2.12.1. Posteriormente, se realizó la identificación o llamada de las variantes usando una combinación de dos algoritmos diferentes (VarScan,⁵⁶ GATK⁵⁷).

Para la anotación de las variantes se emplearon bases de datos poblacionales como *The Exome Aggregation Consortium* (ExAC) y *1000 Genomes*.⁵⁸ Para la obtención de información detallada de las mutaciones encontradas se utilizaron Ensembl,⁵⁹ PubMed y *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM). Para reportar las variantes patológicas se consultaron las bases de datos *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC),⁶⁰ ClinVar y *Human Gene Mutation Data* (HGMD)⁶¹ y para la predicción de patogenicidad se emplearon los programas SIFT,⁶² Polyphen 2.0⁶³ y Condel que evalúan los efectos que producen las mutaciones sobre la conformación proteica y el grado de conservación del aminoácido afectado. El análisis de los cambios en el número de copia (CNV) se realizó utilizando algoritmos de CNVkit, v0.7.7.dev0.⁶⁴

Para identificar la adquisición de mutaciones a lo largo del período post-alo-TPH, los datos de secuenciación del exoma de las muestras de MO post-trasplante del receptor se compararon con la muestra de SP de su donante y frente a las muestras de MO anteriores. Del total de variantes detectadas, se seleccionaron las variantes no sinónimas localizadas en regiones codificantes o regiones de *splicing* (posición $\pm 1, 2$ pares de bases) en la isoforma canónica y variantes con una frecuencia poblacional (Minor Allele Frequency, MAF) $<1\%$. Se eliminaron todas las variantes identificadas en zonas de homopolímeros con una longitud de secuencia ≥ 10 con el fin de eliminar falsos positivos. Las variantes restantes se filtraron aún más para retener las variantes informadas en la literatura asociadas con el desarrollo del cáncer, las variantes

informadas en COSMIC o las variantes identificadas como perjudiciales por tres plataformas de análisis *in silico* (SIFT, Polyphen y Condel). Finalmente, las variantes seleccionadas se examinaron visualmente en el programa Integrative Genomics Viewer (IGV), descartando así los posibles artefactos de secuenciación.

4.2.4. Análisis de las variantes genómicas en las muestras del donante.

Se analizaron las muestras de SP de donantes con el objetivo de detectar condiciones subyacentes de predisposición al cáncer. El análisis bioinformático se realizó de la forma descrita para las muestras post alo-TPH.

Debido al amplio número de alteraciones detectadas en las muestras de SP de donantes, se compiló una lista de genes asociados con el cáncer (2197 genes; Anexo IV), dicha lista incluye genes asociados a diferentes vías funcionales relacionadas con el cáncer, como la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa-Akt (PI3K-Akt), vía de la rapamicina (mTOR), señalización de Janus tyrosine quinasa - Señalización del transductor de señal y activador de la transcripción (JAK-STAT), interacción del receptor de citocina-citoquina, cascada de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), señalización de los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR), señalización del ciclo celular, señalización de p53, vía de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), apoptosis, uniones adherentes, señalización Wnt, señalización AMP cíclica (AMPC), adhesión focal, interacción receptor de matriz extracelular (receptor ECM) y señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGFB), componentes del spliceosoma; genes implicados en el desarrollo del linaje de células hematopoyéticas, fallos de regulación de la transcripción en el cáncer, vías de señalización que regulan la pluripotencialidad de las células madre, genes asociados con el desarrollo de neoplasias mieloides, genes conocidos de predisposición al cáncer, genes asociados con inmunodeficiencia primaria y genes asociados a evasión de la respuesta inmune. De las variantes detectadas en estos genes se retuvieron sólo aquellas que tenían una MAF <1% y que estuviesen recogidas en la base de datos HGMD o reportadas en la literatura como responsables o predisponentes al desarrollo de cáncer.

El análisis de los cambios en el número de copia (CNV, del inglés *copy number variation*) se realizó utilizando algoritmos de CNVkit, v0.7.7.dev0.

4.2.5. Validación de las variantes genómicas mediante secuenciación dirigida

Con el objetivo de validar las variantes identificadas como causales mediante la secuenciación del exoma completo, se diseñó un panel de genes de enriquecimiento por captura (IDT, Coralville, Iowa, EE. UU.) para posterior secuenciación masiva (ciclos de

lectura 2x150 pares de bases) en la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) con los reactivos V2-300. En el panel se incluyeron, además de las regiones en las que se encontraban las variantes detectadas, 17 genes frecuentemente mutados en neoplasias mieloides y descritos en pacientes con hematopoyesis clonal (*NRAS*, *WT1*, *KRAS*, *FLT3*, *IDH2*, *SRSF2*, *TP53*, *CEBPA*, *SF3B1*, *IDH1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TET2*, *NPM1*, *JAK2*).

Se volvieron a secuenciar todas las muestras de MO post-TPH y las muestras de SP de los donantes con este panel. Se obtuvo una profundidad de lectura >1000x en todas las muestras con el fin de alcanzar una sensibilidad del 1%.

4.2.6. Análisis de la evolución clonal

Para reconstruir y visualizar la arquitectura clonal y su evolución en el tiempo, así como con el fin de comprender la heterogeneidad tumoral, se aplicó el paquete Fishplot⁶⁵ R v.3.2.2 (The R Foundation). Dicho paquete estadístico estima la prevalencia subclonal en diferentes puntos de tiempo, que representan con precisión las relaciones subclonales y sus proporciones relativas, en base a la FAV de las variantes detectas en las muestras.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as bright red, oval shapes with a darker center. They are scattered across the lower half of the image.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Revisión sistemática de la literatura.

Se seleccionaron 101 publicaciones que comprendían un total de 137 casos de NHCD publicadas entre los años 1971 y 2017.

Se estima que la incidencia de esta complicación está en torno al 0,12-0,13%^{35,37} de los pacientes que reciben un alo-TPH. Sin embargo, la incidencia real es difícil de estimar a partir de una revisión sistemática, ya que no se tienen en cuenta el total de trasplantes alogénicos realizados en los distintos centros durante el periodo en el que se reportaron los casos recogidos en el estudio. Además, la falta de censura de los pacientes recaídos o fallecidos por causas asociadas con el trasplante en el periodo temprano post-trasplante, conduciría a una subestimación de la incidencia de esta entidad.

5.1.1. Principales características de los pacientes con NHCD.

La mediana de edad de los pacientes en el momento en el que se diagnostica la enfermedad primaria fue de 32 años (rango: 6 meses-70 años), la mayoría de los pacientes (25%, 33/131) habían sido diagnosticados de LMA o de LLA (23% (30/131); Tabla 2). La fuente de progenitores hematopoyéticos empleada en la mayoría de los casos fue la MO (55%, 65/118), seguida de la SCU (25%, 29/118). El tipo de donante más frecuente fue el donante emparentado HLA-id (59%, 80/136; Tabla 2).

Los pacientes pediátricos (≤ 16 años) representan el 23% (31/133) de los pacientes incluidos en el estudio, con una edad media de 6 años (0,5-16) en el momento del diagnóstico de la enfermedad primaria. La LLA se diagnosticó como enfermedad primaria en el 43% (13/30) de los niños y la MO se empleó como fuente de PH en la mayoría de estos casos (73%, 19/26; Tabla 2).

<i>Características</i>	<i>Pacientes totales</i>		<i>≤16 años</i>	
	<i>n*</i>	<i>n (%)</i>	<i>n*</i>	<i>n (%)</i>
<i>Edad del receptor (años)</i>	133		31	
mediana (rango)		32 (0,5-70)		6 (0,5-16)
>16		102 (77)		-
<i>Sexo del receptor</i>	136		31	
Varón/Mujer	73/63		13/18	
<i>Edad del donante (años)</i>	35		14	
mediana (rango)		33 (1-68)		11,5 (1-45)
<i>Sexo del donante</i>	133		31	
Varón/Mujer	68/65	68 (51)	15/16	15 (48)
<i>Enfermedad primaria</i>	131		30	
LMA		33 (25,1)		6 (20)
LLA		30 (23)		13 (43,4)
LMC-FC		21 (16)		1 (3,3)
EH-no maligna		12 (9)		6 (20)
SMD		10 (8)		0(0)
LNH		7 (5)		0(0)
MM		6 (4,5)		0(0)
LMC-CB		5 (4)		1 (3,3)
LMMC		2 (1,5)		2 (6,7)
HCL		2 (1,5)		1 (3,3)
LLC		1 (0,8)		0(0)
LH		1 (0,8)		0(0)
Sarcoma granulocítico		1 (0,8)		0(0)
<i>Régimen de acondicionamiento</i>	88		24	
-MA		57 (65)		18 (75)
<i>Tipo de donante</i>	136		31	
-Emparentado HLA-id		80 (59)		22 (71)
-SCU		29 (21)		5 (17)
-No emparentado HLA-id		12 (9)		1 (3)
-Emparentado no HLA-id		9 (6,5)		2 (6)
-No emparentado no HLA-id		4 (3)		1 (3)
-Haploidentico		2 (1,5)		0(0)
<i>Fuente de progenitores</i>	118		26	
-MO		65 (55)		19 (73)
-SCU		29 (25)		5 (19)
-SP		24 (20)		2 (8)

Tabla 2. Características clínicas y del alo-TPH en pacientes con NHCD. ((*) La descripción de los casos fue muy heterogénea, el número de casos (n) para los que se disponía información de los datos recogidos en la tabla es diferente para cada característica. Abreviaturas: LMA: Leucemia mieloide aguda, LLA: Leucemia linfoblástica aguda, LMC-FC: Leucemia mieloide crónica en fase crónica, EH: enfermedad hematológica, SMD: Síndrome mielodisplásico, LNH: Linfoma no-Hodgkin, LMC-CB: LMC en crisis blástica, MM: Mieloma múltiple, LMMJ: Leucemia mielomonocítica juvenil, HCL: Histiocitosis de células de Langerhans, LH: Linfoma de Hodgkin, LLC: Leucemia linfocítica crónica, MA: Mieloablático, HLA-id: HLA idéntico, MO: Médula ósea, SP: sangre periférica, SCU: Sangre de cordón umbilical).

Además de los 29 casos en los que se utilizó SCU como fuente de PH, en otros 35 casos se recogió la edad de los donantes. La mediana de edad de los mismos fue de 33 años (rango 1-68 años; Figura 10).

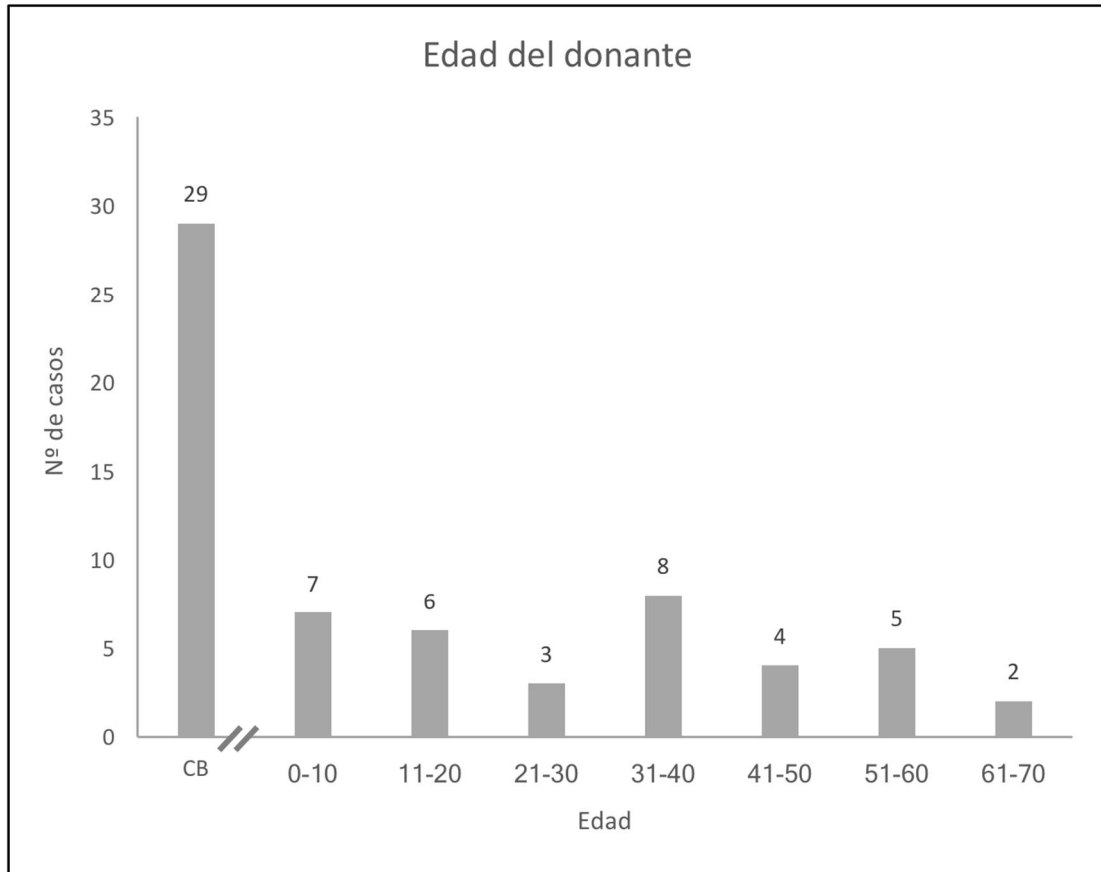


Figura 10. Distribución de los donantes por rangos de edad.

El 65% (57/85) de los pacientes recibieron ICT en el acondicionamiento.

El metotrexato y/o la ciclosporina se usaron como profilaxis estándar de la EICR en 87/93 casos. Como complicaciones post-TPH, el 63% (59/94) desarrolló EICR y el 71% (27/38) de los pacientes presentaron eventos infecciosos.

El tiempo medio desde el alo-TPH hasta el diagnóstico de NHCD fue de 26 meses (rango 1-312 meses). Interesantemente, si clasificamos a los pacientes en tres grupos, según la fuente de PH empleada el tiempo medio en el cual se desarrolla la NHCD difiere entre los grupos. En aquellos pacientes que utilizaron PH provenientes de SCU, el tiempo medio de diagnóstico de NHCD fue de 15 meses (rango 2-47 meses); en los que emplearon PH movilizados de SP el tiempo medio fue de 24 meses (rango: 1-193 meses) y en los que emplearon la MO como fuente de PH el tiempo medio fue de 36 meses (1-312 meses). Estas diferencias en el tiempo en el cual se desarrolla la NHCD son estadísticamente significativa (SCU vs MO vs SP $p = 0,008$, MO vs SP $p = 0,5$, SP vs SCU $p = 0,04$ y MO vs SCU $p = 0,002$; Figura 11).

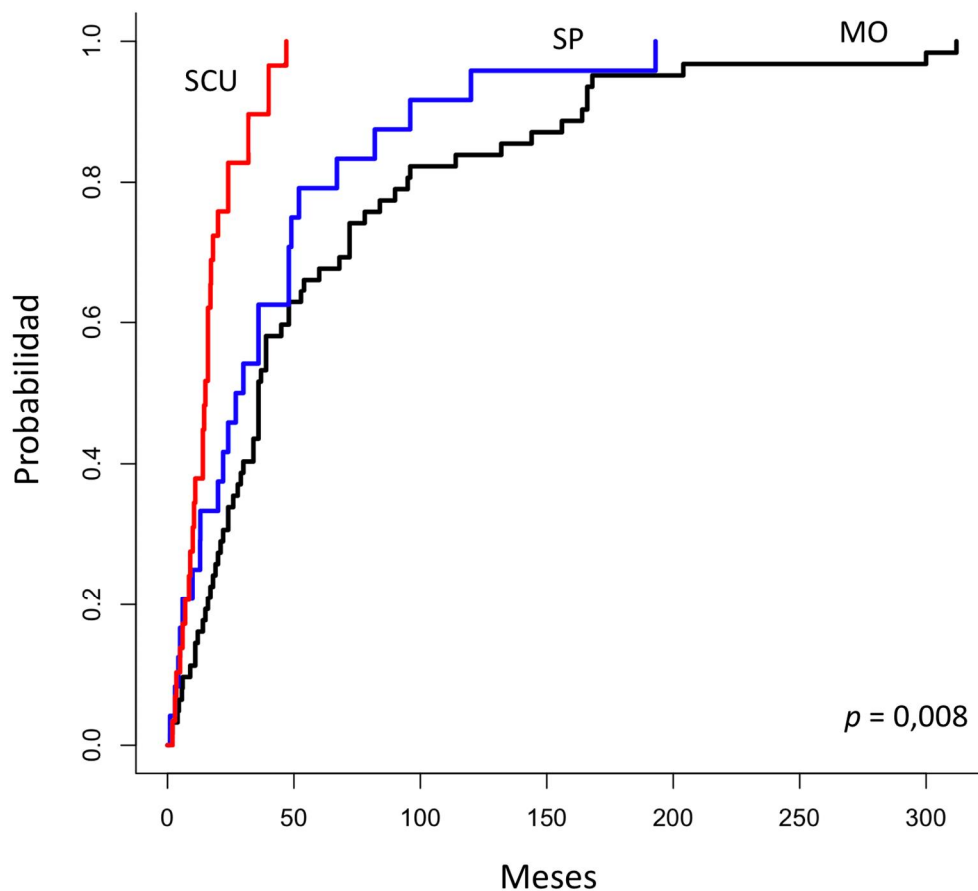


Figura 11. Tiempo de aparición de las NHCD tras el alo-TPH según la fuente de progenitores hematopoyéticos empleada.

La mayoría de los casos de NHCD fueron LMA (50%, 69/137), LLA (23%, 32/137) o SMD; 20%, 27/137, estas tres neoplasias abarcan el 93% (128/137) de todos los casos reportados (Figura 12). La mediana del tiempo desde el alo-TPH hasta el inicio de la NHCD en estas tres entidades fue similar, siendo 20,5 meses (rango: 1-300 meses) para la LLA, 28,9 meses (rango: 1-204 meses) para la LMA y 29 meses (rango: 1-312 meses) en los pacientes que desarrollan un SMD ($p = 0,9$). El tiempo medio para el desarrollo de la LLC derivada de células donadoras (155 meses ($n = 2$)) o LNH (90 meses ($n = 1$)) fue mucho más prolongado. La edad del donante no tuvo ningún impacto en el tiempo hasta el desarrollo de la NHCD ($p = 0,2$).

En el 67% de los casos (88/131) la enfermedad desarrolla en las células del donante fue diferente a la enfermedad primaria para la cual se indicó el alo-TPH (Figura 12).

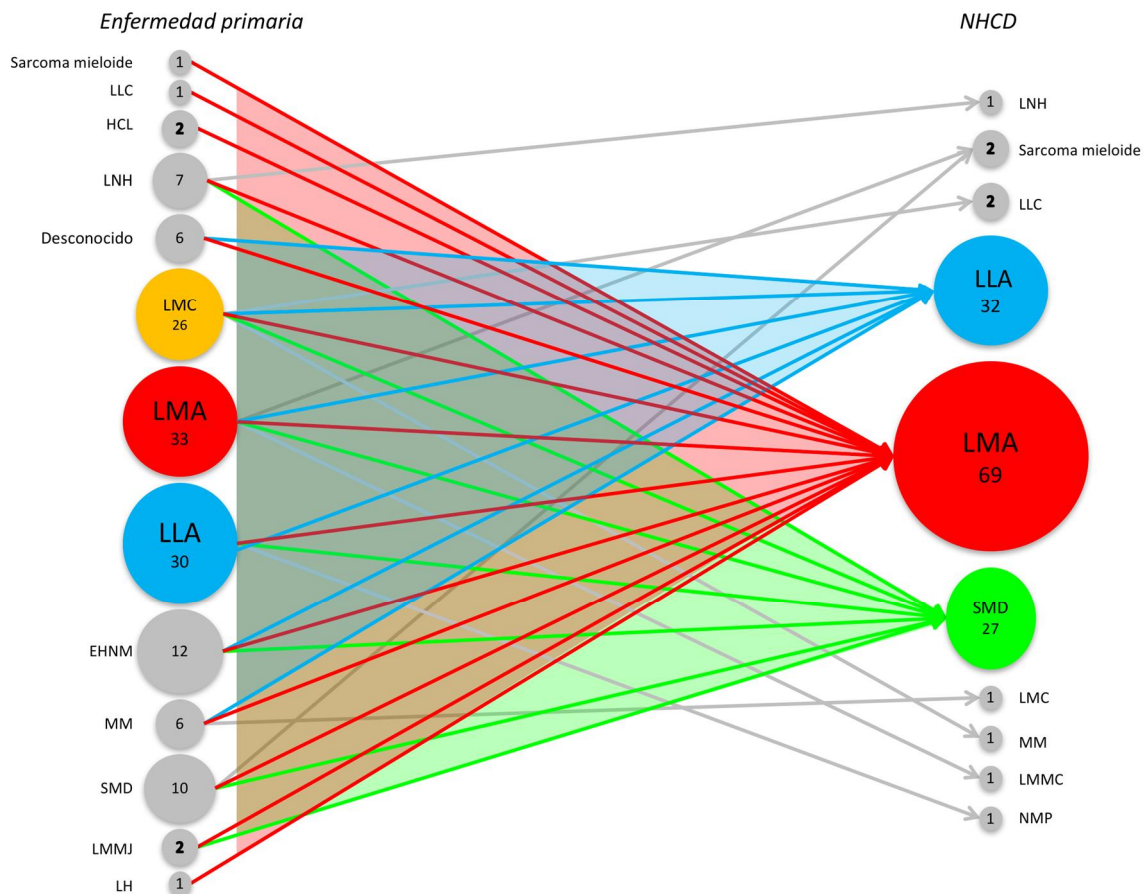


Figura 12. Enfermedad primaria diagnosticada en el receptor (n = 131) y tipo de neoplasia hematológica derivada en las células donantes (n = 137). (Abreviaturas: LLC: leucemia linfocítica crónica, HCL: histiocitosis de células de Langerhans, LNH: linfoma no Hodgkin, LMC: leucemia mieloide crónica, LMA: leucemia mieloide aguda, LLA: leucemia linfoblástica aguda, EHNM: Enfermedad hematológica no maligna, MM: mieloma múltiple, SMD: síndrome mielodisplásico, LMMJ: leucemia mielomonocítica juvenil, LH: linfoma de Hodgkin, LMMC: leucemia mielomonocítica crónica, NMP: neoplasia mieloproliferativa).

La serie actual incluye 114 casos para los cuales se disponía de información del cariotipo, el 28% (32/114) de los pacientes con NHCD tenían un cariotipo normal en el momento del diagnóstico y el 72% (82/114) mostró un cariotipo alterado, con translocaciones cromosómicas equilibradas, translocaciones cromosómicas desequilibradas, ganancias y pérdidas cromosómicas y como cariotipos complejos. Las anomalías citogenéticas más recurrentes fueron el cromosoma 7 (27%; 31/114), el cariotipo complejo (9%; 10/114) y los reordenamientos de *MLL* en el cromosoma 11q23 (7%; 8/114).

Entre los casos de SMD derivados de las células del donante, la información del cariotipo estaba disponible en 26 de los 27 casos de SMD. En estos casos, se observó una alta proporción de los pacientes con alteraciones en el cromosoma 7 (61%, 16/26), mientras que dichas anomalías sólo se detectaron en una minoría de los casos de LMA derivados

de las células del donante (22%; 13 de los 60 casos; en 9 casos de LMA no se disponía de información del cariotipo; Figura 13).

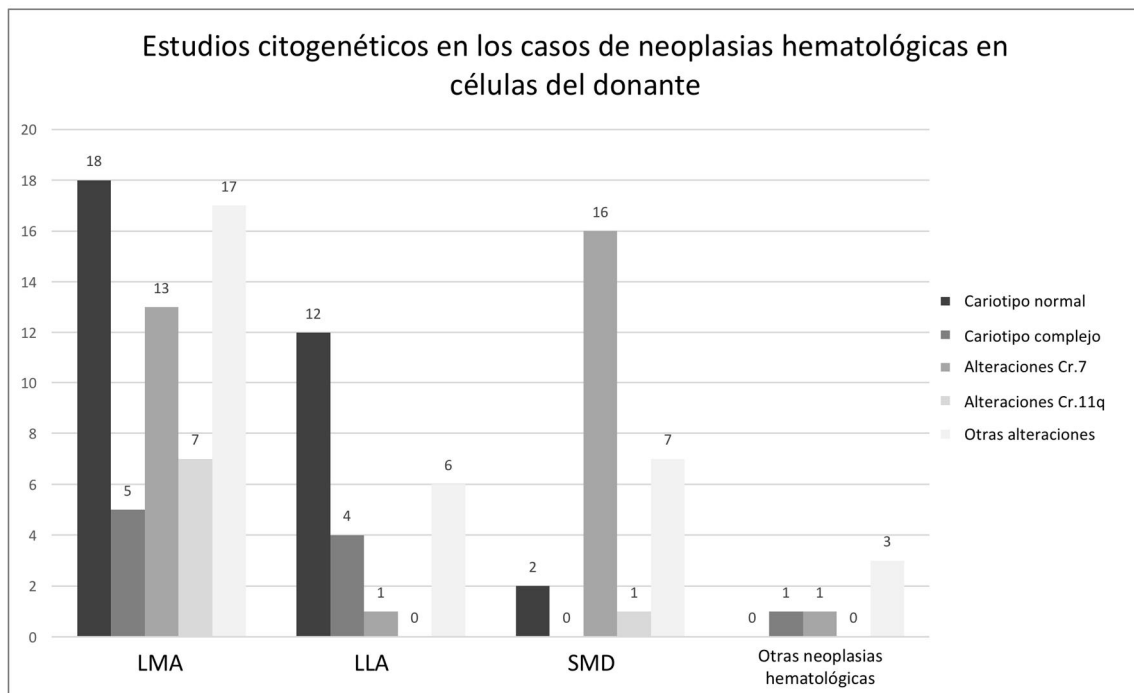


Figura 13. Estudios citogenéticos en los pacientes con NHCD. (Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda, LLA: leucemia linfoblástica aguda, SMD: síndrome mielodisplásico).

5.1.2. Estado de salud de los donantes en el momento del diagnóstico de la NHCD.

El estado del donante en el momento del diagnóstico de la NHCD en el receptor se incluyó en 73 de los casos de la presente cohorte. El 85% de los donantes (n=62) estaban sanos, 9 donantes (12%) habían desarrollado neoplasias hematológicas y 2 donantes (3%) otros cánceres no hematológicos (carcinoma de mama y pulmón).

Sólo un pequeño número de casos de NHCD (11 de 137)^{39,40,66,67,68,69,70,71,72,73} incluían estudios moleculares detallados en donantes y receptores (Tabla 3). Curiosamente, en estos casos, al menos una de las mutaciones detectadas en células leucémicas en el momento del diagnóstico de NHCD también se encontró en el donante. Sin embargo, sólo 2 de estos donantes desarrollaron una neoplasia hematológica. Además, en otros 7 casos en los que el donante desarrolló una neoplasia hematológica, pero no se habían realizado estudios moleculares, el tipo de neoplasia hematológica (3 LMA, 1 LLA, 1 LLC, 1 linfoma y 1 MM) fue idéntico en ambos, donante y receptor.

	NHCD	Mutaciones en NHCD	Donante pre-TPH	Estado del donante (seguimiento)	Mutaciones en el donante	Técnica molecular
Xiao <i>et al.</i> 2011	LMA	<i>CEBPβ</i> (c.147dupC, c.584_589dup(*), c.914_916dup)	<i>CEBPα</i> (c.584_589dup(*))	Sano (13 meses)	-	Secuenciación Sanger (<i>FLT3-TKD</i> , <i>NRAS</i> , <i>CEBPβ</i> , <i>NPM1</i>) y electroforesis en gel de agarosa (<i>FLT3-ITD</i> , <i>MLL-PTD</i>)
Diamond <i>et al.</i> 2011	LMA	<i>XPD</i> , <i>XRCC3</i>	<i>XPD</i> , <i>XRCC3</i>	Sano (10 meses)	-	RFLP (<i>XPA</i> , <i>XPD</i> , <i>XRCC1</i> , <i>XRCC3</i> , <i>RAD51</i>)
Ho <i>et al.</i> 2012	LMA	<i>SALL1</i> , <i>UGT1A5</i> , <i>SPEG</i> , <i>TMC6</i> , <i>SCN3A</i> , <i>MYH10</i> , <i>RAVER1</i> , <i>WNT7A</i> , <i>APLF</i> , <i>PRPF8</i> , <i>ZNF518B</i> , <i>MKRN3</i>	<i>SALL1</i> , <i>UGT1A5</i> , <i>SPEG</i> , <i>TMC6</i> , <i>SCN3A</i> , <i>MYH10</i> , <i>RAVER1</i> , <i>WNT7A</i> , <i>APLF</i> , <i>PRPF8</i> , <i>ZNF518B</i> , <i>MKRN3</i>	Desconocido	-	SGC
Yasuda <i>et al.</i> 2013	LMA	<i>IDH2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>CCDC168</i> , <i>GAL3ST1</i> , <i>MYO7B</i> , <i>NFATC1</i> , <i>PSMB8</i> , <i>TCAIM</i> , <i>TMEM132A</i> , <i>UBA2</i> , <i>NRAS</i>	<i>IDH2</i> (2,3%), <i>DNMT3A</i> (1,1%)	Sano (120 meses)	-	SEC
Liu <i>et al.</i> 2015	LMA	<i>ASXL1</i>	<i>ASXL1</i>	LMA (84 meses)	<i>ASXL1</i> , <i>FLT3-ITD</i>	(<i>CEBPβ</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ETV6</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>FLT3-TKD</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>NPM1</i> , <i>NRAS</i> , <i>PHF6</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RUNX1</i> , <i>TET2</i> , <i>TP53</i>)
Hirsch <i>et al.</i> 2016	LMA	<i>JAK2</i> , <i>EZH2</i> , <i>CHEK2</i> , <i>DSCAM</i> , <i>IKZF1</i>	<i>JAK2</i>	Desconocido	-	Panel de genes 122
Gondek <i>et al.</i> 2016	LMA	<i>DNMT3Ax2</i> , <i>ATM</i> , <i>IKZF1</i> , <i>SETBP1</i> , <i>CSF3R</i> , <i>CIITA</i> , <i>G6PD</i> , <i>CBFB</i> , <i>SIPR2</i> , <i>LIFR</i> , <i>MA2K4</i> , <i>PRDM1</i> , <i>AKAP9</i> , <i>HSP90AAI</i> , <i>TNFAIP3</i> , <i>MAP3K6</i> , <i>ACVR1B</i>	<i>DNMT3A x2</i> , <i>ATM</i>	Sano (60 meses)	-	Panel de genes 637
Gondek <i>et al.</i> 2016	SMD	<i>U2AF1</i> , <i>EP300</i> , <i>MYH9</i> , <i>GUCY1A2</i> , <i>CSMD3</i> , <i>MPL</i> , <i>SETBP1</i>	<i>U2AF1</i> , <i>EP300</i> , <i>MYH9</i>	Sano (24 meses)	-	Panel de genes 637
Suarez-Gonzalez <i>et al.</i> 2016	LMA	<i>SH2B3</i> , <i>NRAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>NPM1</i> , <i>CA9</i> , <i>POU4F1</i> , <i>NOTCH1</i>	<i>SH2B3</i>	Desconocido	-	SEC
Kobayashi <i>et al.</i> 2017	LMA	<i>DDX41</i> , <i>CENPN</i> , <i>BRF2</i> , <i>SNAPC4</i> , <i>GAS6</i> , <i>IL32</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>NOTCH3</i> , <i>LFNG</i>	<i>DDX41</i>	Sano (56 meses)	-	SEC
Herold <i>et al.</i> 2017	LMA	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2 x2</i> , <i>NPM1</i> , <i>FLT3</i> , +10	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2 x2</i>	LMA (90 meses)	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2 x2</i> , <i>IDH1</i> , <i>PHF6</i> , <i>CBL</i> , <i>SMC1A +10</i>	SEC

Tabla 3. Estudios moleculares realizados en los casos de DCHN (Abreviaturas: NHCD: Neoplasias hematológicas en células del donante, LMA: leucemia mieloide aguda, SMD: Síndrome mielodisplásico, RFLP: Restriction fragment length polymorphism, SGC: Secuenciación del genoma completo, SEC: Secuenciación del exoma completo).

5.1.3. Pronóstico de los pacientes con NHCD.

En el momento en que se publicaron los casos, el 44% (46/104) de los pacientes estaban vivos y el 56% (58/104) había muerto por diferentes causas, principalmente por progresión de la NHCD (43%, 25/58), por citopenias severas tras la administración de quimioterapia, por sepsis o por las complicaciones derivadas de un segundo alo-TPH. La mediana de tiempo de seguimiento en los pacientes vivos fue de 8 meses (rango: 1-98 meses), pero sólo se incluyó este dato en 14 de los 46 casos. El tiempo desde el diagnóstico de la NHCD y el fallecimiento fue de 10,6 meses (rango: 1-263 meses), este dato se incluyó en 30 de los 58 casos de *exitus*.

En el momento del diagnóstico de la NHCD la mayoría de los pacientes se trataron inicialmente con quimioterapia de inducción y en 22 casos se realizó un segundo alo-TPH, cuatro de los cuales se realizaron con el mismo donante. Once pacientes fallecieron como consecuencia de la toxicidad asociada al trasplante o debido a la progresión de la enfermedad. Sin embargo, 11 de estos pacientes estaban vivos en el momento en el que se publicó el caso, incluidos los cuatro pacientes que recibieron un segundo trasplante del mismo donante.

5.2. Estudio de la cohorte de pacientes con NHCD.

5.2.1. Primer estudio de secuenciación de exoma completo en una cohorte de NHCD.

En el estudio se incluyeron 9 casos de NHCD, en los que se realizó secuenciación del exoma completo en 50 muestras, 40 muestras de MO de seguimiento post alo-TPH y 10 muestras de la fuente de progenitores hematopoyéticos de los donantes. Se obtuvo una profundidad de secuenciación de 60x (rango 30x-186x), se identificó una mediana de 155.949 variantes (rango: 150.477-194.363 variantes) en cada una de las muestras.

El desarrollo de una NHCD es una complicación post alo-TPH extremadamente inusual. Este estudio recopila la primera cohorte en la que se realizan estudios de secuenciación del exoma completo en diferentes muestras de MO del periodo post-TPH (Figura 9). La mediana de edad de la enfermedad primaria en el momento del diagnóstico fue de 46 años (rango 26-60). Cuatro pacientes habían sido diagnosticados con LLA, 2 con LMA, 2 con linfoma del manto y 1 con leucemia mieloide crónica como la enfermedad primaria para la cual estaba indicado el alo-TPH. El tipo de donante más frecuente fue el donante familiar (7/9; Tabla 1). El tiempo medio desde el alo-TPH al diagnóstico de NHCD fue de 34 meses (rango 5-249 meses). Aquellos pacientes en los que se empleó SCU como fuente de PH desarrollaron la NHCD antes (mediana de tiempo desde el trasplante hasta la NHCD: 1,6 años) que los pacientes que emplearon MO (mediana de tiempo desde el

trasplante hasta la NHCD: 2,8 años) o SP (mediana de tiempo desde el trasplante hasta la NHCD: 4,7 años). Las NHCD diagnosticadas en el receptor fueron LMA (5/9) y SMD (4/9) y las alteraciones cromosómicas más comunes fueron alteraciones en el cromosoma 7 (6/9).

5.2.2. Alteraciones somáticas adquiridas en el periodo post alo-TPH

Los perfiles mutacionales obtenidos a partir de muestras secuenciales post alo-TPH demostraron una alta heterogeneidad genética intratumoral y dinámica clonal en los 9 casos de NHCD (Figura 9). El número de variantes detectadas es creciente a lo largo del periodo post alo-TPH en todos los casos.

En el momento del diagnóstico de la NHCD, la mediana del número de variantes por muestra fue de 28 variantes (rango 18-92 variantes). Además, en 4 casos (1, 3, 7 y 8) se obtuvieron muestras posteriores al diagnóstico de NHCD. En los casos 7 y 8, en los que se produjo una progresión de la enfermedad sin tratamiento, el número de variantes adquiridas se vió aún aumentado en las muestras de MO de la progresión. Por otro lado, en los casos 1 y 3, en los que los pacientes con NHCD fueron tratados, se observó estabilidad (caso 1) o una modesta disminución (caso 3) en el número de variantes adquiridas. Ambos pacientes obtuvieron una respuesta parcial inicial seguida de una nueva progresión posterior.

Entre los genes alterados, se encontraron 50 variantes en 44 genes candidatos con potencial oncogénico (Tabla 4). En el análisis del exoma completo se detectaron 30 variantes en genes asociados con el procesamiento y el metabolismo del ARN (*LUC7L2*, *NOP14*), la diferenciación celular (*LAMA5*, *SKOR2*, *EML1*), la transducción de señales (*SNX13*, *IRS1*, *TENM2*), incluida la vía de señalización notch (*NOTCH1*, *NOTCH4*, *DTX1*), ERBB2 vía de señalización (*GRB7*), señalización RET (TLR9) y la vía de señalización Ras-MAP-Kinasa (*NRAS*, *PTPN11*, *MAP2K1*, *CAD*), reguladores de inmunidad (*MEFV*, *IKZF1*, *CD40*), anhidrasa carbónica asociada a tumor (*CA9*), organización del citoesqueleto (*FMN2*), histona desacetilasa (*GSE1*, *HDAC10*), respuesta al daño del ADN (*PNKP*), modificaciones post-traduccionales (*SENP7*), factores de transcripción (*TAF1L*, *ZKSCAN2*, *ZNF461*, *POU2F2*, *ELF5*) y apoptosis (*MEGF10*, *HIP1*). Adicionalmente, se observaron 14 mutaciones en 10 genes que aparecen comúnmente alterados en LMA o SMD de adultos (*SETBP1*, *DNMT3A*, *TET2* (2 variantes), *RUNX1* (3 variantes), *CSF3R*, *EP300*, *IDH2*, *NRAS*, *PTPN11* y *IKZF1*). Todas estas mutaciones fueron confirmadas con el panel de genes dirigido, el cual permitió a su vez identificar 7 mutaciones en los genes *CSF3R*, *NPM1*, *TP53*, *ASXL1* y *CEBP α* . A pesar del aumento en la profundidad de lectura con la resecuenciación dirigida del panel de genes diseñado *ad-hoc*, ninguna de las variantes detectadas por secuenciación del exoma completo se encontró en las muestras previas post alo-TPH a aquellas en las que ya la secuenciación del exoma completo había hecho.

Gen	Cr	Descripción del gen	Nombre_HGVSc	Nombre_HGVSp	Efecto	Meses post alo-TPH (FAV)									
						2	15	30	37	50	58	58.5	59	60	
Paciente 1						2	15	30	37	50	58	58.5	59	60	
LUC7L2	7	LUC7 like 2, pre-mRNA splicing factor	c.568TG>CT	p.Cys190Leu	missense	-	-	-	-	-	0,28	0,4	0,22	0,38	
SETBP1	18	SET binding protein	c.2612T>C	p.Ile871Thr	missense	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	
Paciente 2						12	20	29	34						
DNMT3A	2	DNA methyltransferase 3 alpha 5	c.893G>A	p.Gly298Glu	missense	-	0,32		0,51				0,44		
TP53*	17	Tumor protein p53		p.Gly302AlafsTer42	frameshift	-	0,49		0,53				0,64		
LAMAS	20	Laminin subunit alpha 5	c.3407delA	p.Gln1136ArgfsTer38	frameshift	-	0,32		0,40				0,54		
Paciente 3						53	203	248	256						
CSF3R*	1	Colony stimulating factor 3 receptor	c.2296C>T	p.Gln766Ter	stop gained	-	-		0,15				0,08		
TET2	4	Tet methylcytosine dioxygenase	c.4594C>T	p.Gln1532Ter	stop gained	-	-		0,27				0,13		
TET2	4	Tet methylcytosine dioxygenase	c.5230_5246del	p.Leu1744GlyfsTer3	frameshift	-	-		0,21				0,14		
SNX13	7	Sorting nexin 13	c.2366G>C	p.Arg789Thr	missense	-	-		0,28				0,15		
MEFV	16	MEFV, pyrin innate immunity regulator	c.1937C>T	p.Pro646Leu	missense	-	-		0,11				0,18		
SKOR2	18	SKI family transcriptional corepressor 2	c.194C>T	p.Ala65Val	missense	-	-		0,18				0,20		
ASXL1*	20	Additional Sex Combs-like 1	c.1888_1910del	p.Glu635ArgfsTer15	frameshift	-	-		0,08				0,10		
RUNX1	21	Runt related transcription factor 1	c.876dupC	p.Ser293LeufsTer307	frameshift	-	-		0,18				0,05		
Paciente 4						3	13	19							
GSE1	16	Gse1 coiled-coil protein	c.366dupC	p.Val123ArgfsTer17	frameshift	-	-		-				0,16		
Paciente 5						4	12	67							
CSF3R	1	Colony stimulating factor 3 receptor	c.2433dupC	p.Lys812GlnfsTer4	frameshift	-	-		-				0,2		
EML1	14	echinoderm microtubule associated protein like 1	c.632G>A	p.Arg211His	missense	-	-		-				0,12		
Paciente 6						3	8	12	24						
IRS1	2	Insulin receptor substrate 1	c.32C>A	p.Ser11Ter	stop gained	-	-		-				0,20		
SENP7	3	SUMO1sentrin specific peptidase 7	c.478G>T	p.Glu160Ter	stop gained	-	-		-				0,19		
NPM1*	5	Nucleophosmin	c.860_863dupTCTG	-	frameshift	-	-		-				0,1		
NOTCH4	6	notch 4	c.1040G>T	p.Trp347Leu	missense	-	-		-				0,24		
TAF1L	9	TATA-box binding protein associated factor 1 like	c.3313G>T	p.Asp1105Tyr	missense	-	-		-				0,17		
DTX1	12	deltex E3 ubiquitin ligase 1	c.1245G>T	p.Met415Ile	missense	-	-		-				0,16		
TP53*	17	Tumor protein p53	C.824G>T	P.Cys275Phe	missense	-	-		-				0,13		
GRB7	17	growth factor receptor bound protein 7	c.748G>T	p.Gly250Cys	missense	-	-		-				0,15		
EP300	22	E1A binding protein p300	c.3728+1G>T	-	splicing	-	-		-				0,19		
Paciente 7						2	3	5	14	24					
ZKSCAN2	16	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 2	c.2461C>A	p.His821Asn	missense	-	-		-			0,09	0,3		
PNKP	19	Polynucleotide kinase 3-phosphatase	c.298C>A	p.His100Asn	missense	-	-		-			0,13	0,38		
NOP14	4	NOP14 nucleolar protein	c.2382C>A	p.His794Gln	missense	-	-		-			-	0,2		
MEGF10	5	Multiple EGF like domains 10	c.1418G>T	p.Cys473Phe	missense	-	-		-			-	0,26		
TENM2	5	Teneurin transmembrane protein 2	c.1381G>T	p.Gly461Cys	missense	-	-		-			-	0,35		
IDH2	15	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2	c.418C>T	p.Arg140Trp	missense	-	-		-			-	0,14		
ZNF461	19	Zinc finger protein 461	c.1021G>T	p.Gly341Cys	missense	-	-		-			-	0,3		

Paciente 8						3	6	11	16	18
<i>POU2F2</i>	19	POU 2 Homeobox class 2	c.1329G>T	Leu443Phe	missense	0,48	0,44	0,52	0,5	0,49
<i>CA9</i>	9	Carbonic anhydrase 9	c.248T>C	Leu83Pro	missense	0,32	0,19	-	0,2	0,24
<i>NOTCH1</i>	9	notch 1	c.1045A>C	Thr349Pro	missense	0,24	0,24	0,25	0,19	0,13
<i>NRAS</i>	1	Proto-oncogen NRAS	c.181C>A	Gln61Lys	missense	-	-	0,09	0,12	-
<i>FMN2</i>	1	Formin 2	c.660_661insTAG	Gln220*	frameshift	-	-	-	0,16	0,41
<i>MAP2K1</i>	15	Mitogen activated protein kinase kinase 1	c.670G>C	Val224Leu	missense	-	-	-	0,34	-
<i>PTPN11</i>	11	Protein tyrosin phosphatase, non-receptor type 11	c.214G>A	Ala72Thr	missense	-	-	-	0,3	0,41
<i>NPM1*</i>	5	Nucleophosmin	c.863_864insTCTG	-	Stop-lost	-	-	-	0,33	-
<i>TLR9</i>	3	Toll like receptor 9	c.2518G>T	Gly840Cys	missense	-	-	-	0,4	0,38
<i>ELF5</i>	11	E74 like ETS transcription factor 5	c.259_260insCA	Ile87Thrfs*17	frameshift	-	-	-	-	0,34
Paciente 9						12	24	42		
<i>HIP1</i>	7	Proteína de interacción con Huntintina 1	c.1375+2T>G	-	splicing	-	-	-	0,14	
<i>RUNX1</i>	21	Runt related transcription factor 1	c.421T>C	p.Ser141Pro	missense	-	-	-	0,3	
<i>RUNX1</i>	21	Runt related transcription factor 1	c.837G>A	p.Trp279Ter	stop-gained	-	-	-	0,26	
<i>CD40</i>	20	CD40 molecule	c.216C>A	p.Asn72Lys	missense	-	-	-	0,2	
<i>HDAC10</i>	22	Histona Deactilasa	c.529C>A	p.Gln177Lys	missense	-	-	-	0,3	
<i>CAD</i>	2	Carbamoil-fosfatasa sintetasa 2	c.941A>G	p.Asn314Ser	missense	-	-	-	0,29	
<i>IKZF1</i>	7	Familia de dedos de zinc IKAROS 1	c.476A>G	p.Asn159Ser	missense	-	-	-	0,1	
<i>CEBPα*</i>	19	CCAAT enhancer binding protein α	c.869G>T	p.Glu290Ter	missense	-	-	-	0,07	

Tabla 4. Variantes somáticas deletéreas adquiridas en el periodo post alo-TPH en pacientes con NHCD. Las frecuencias alélicas de las variantes detectadas en el momento del diagnóstico de NHCD están marcados en gris. La frecuencia poblacional de las variantes detectadas es 0, excepto por la variante detectada en el gen *SKOR2* que es igual a 0,0002. (*) Variantes detectadas con el panel de genes. (Abreviaturas: NHCD: Neoplasia hematológica en células del donante, FAV: Frecuencia alélica de la variante, Cr: cromosoma, alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos).

5.2.3. Estudio de adquisición de variaciones en el número de copia (CNVs)

El análisis de los CNVs reveló alteraciones numéricas en las muestras post alo-TPH en los pacientes 1, 2, 3, 4, 5 y 7. Las alteraciones detectadas mediante secuenciación masiva del exoma completo habían sido previamente detectadas mediante estudios citogenéticos, FISH o CGH array.

Las alteraciones cromosómicas más comunes en los casos de NHCD fueron la monosomía del cromosoma 7 (-7) y otras anomalías del cromosoma 7, las cuales se detectaron en 6 de los 9 pacientes (Figura 14).

Los CNVs se detectaron en las muestras correspondientes al momento del diagnóstico de NHCD en los casos 3, 4 y 5. En el caso 1, además, se detectó la monosomía del cromosoma 7 en la muestra del donante pre-trasplante; en el caso 2, se detectaron las anomalías citogenéticas una muestra previa al diagnóstico del SMD en las células del donante (día +609) y en el caso 7, se observaron en la muestra correspondiente a la progresión del SMD en células del donante (día +728).

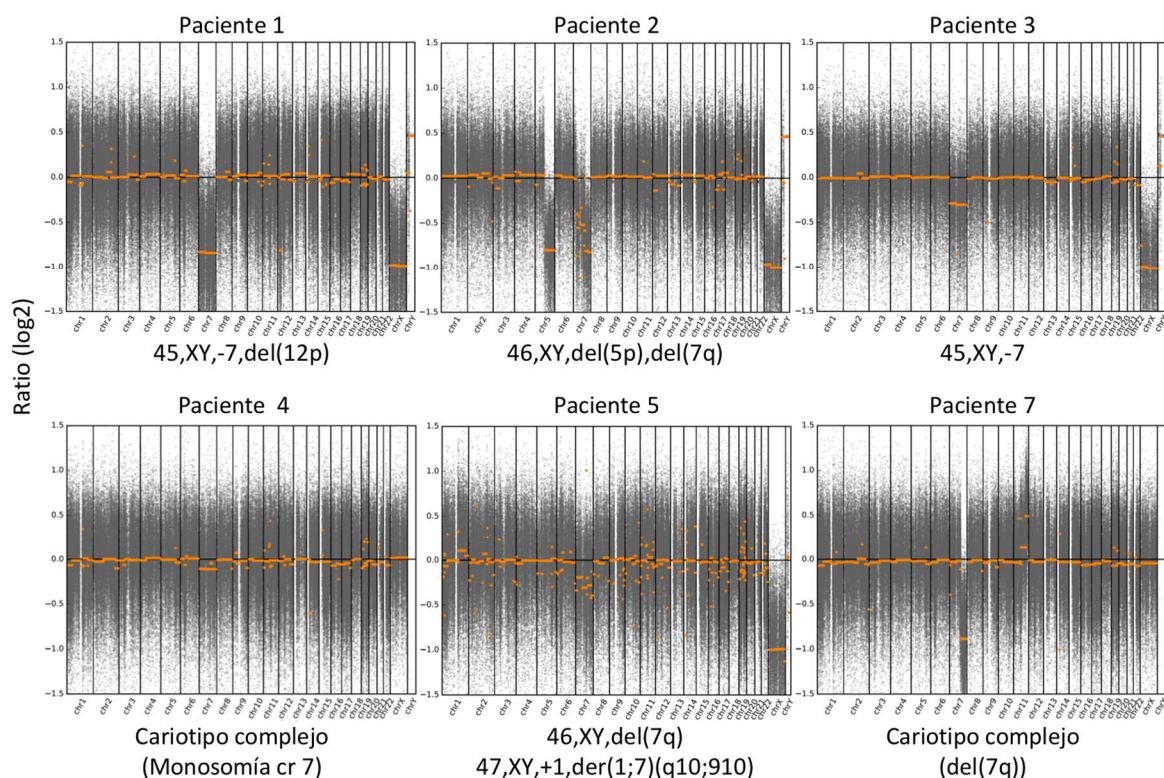


Figura 14. Análisis de las CNVs en las muestras del momento del diagnóstico de NHCD en los pacientes con cariotipo alterado. (Los pacientes 6, 7 y 8 presentaban cariotipo normal).

5.2.4. Análisis de las muestras de los donantes

La mediana de edad de los donantes en el momento de la recolección de los PHs fue de 59 años (rango 49-72 años; Tabla 1).

El análisis retrospectivo de la aféresis de PHs del donante 1, como ya se ha comentado, reveló la existencia de la monosomía del cromosoma 7. El receptor desarrolló, tras cuatro años, un SMD en las células del donante, que mostró una monosomía del cromosoma 7 junto con otras alteraciones moleculares y citogenéticas post alo-TPH. El donante estaba sano en el momento del diagnóstico del SMD en el receptor, pero se le realizó un aspirado de MO que mostró un 5% de blastos con características displásicas (Figura 15, Tabla 5).

Los otros 8 donantes presentaron variantes patógenas o probablemente patógenas en genes implicados en el desarrollo de tumores hematológicos o sólidos (caso 2: *KLLN*, caso 3: *HOXD4*, caso 4: *MSR1*, caso 5: *HOXD12* y *MOS* caso 6: *SETBP1*, caso 7: *MAD1L1*, caso 8: *SH2B3* y caso 9: *ATM*; Tabla 5)^{74,75,76,77,78,79}

D	Cr/Gen	Cambio de nt	Cambio proteico	Asociación con cáncer	FAV	Frec. poblac
1	-7	-	-	Neoplasia hematológica	-	-
2	<i>KLLN</i>	c.445T>A	p.Trp149Arg	Mama	0,48	0,009
3	<i>HOXD4</i>	c.242A>T	p.Glu81Val	LLA	0,48	0,0008
4	<i>MSR1</i>	c.877C>T	p.Arg293X	Próstata	0,44	0,007
5	<i>HOXD12</i>	c.213T>C	p.Leu77Pro	LLA	0,48	0,001
	<i>MOS</i>	c.426_432dup	p.Val145TrpfsTer17	-	0,4	-
6	<i>SETBP1</i>	c.3962G>A	p.Arg1321His	Neoplasia hematológica	0,42	0,0004
7	<i>MAD1L1</i>	c.851A>G	p.Glu284Gly	Linfoma y próstata	0,44	0,000008
8	<i>SH2B3</i>	c.238C>T	p.R80C	NMP	0,45	0,001
9	<i>ATM</i>	c.1229T>C	p.V410A	Linfoma y melanoma	0,48	0,002

Tabla 5. Variantes identificadas en los donantes. (Abreviaturas: D: Donante, Cr: cromosoma, nt: nucleótido, FAV: Frecuencia alélica de la variante, LLA: Leucemia linfoblástica aguda, NMP: neoplasia mieloproliferativa, Frec. Poblac: Frecuencia poblacional).

Cabe destacar que las variantes mencionadas anteriormente, presentes en las muestras de PHs, también se detectaron en todas las muestras de seguimiento post alo-TPH en los 9 casos.

En base a la frecuencia alélica de la variante, tanto en los resultados de secuenciación del exoma completo como en los datos de resecuenciación con el panel de genes, todas las variantes parecen tener un origen germinal, excepto la variante detectada en el gen *MOS* en el donante 5 y la observada en el gen *SETBP1* en el donante 6 que de probable origen somático. Desafortunadamente, no disponíamos de una muestra de origen germinal de estos pacientes.

Curiosamente, aunque en todos los donantes se observaron alteraciones genéticas adquiridas o heredadas, que parecen estar relacionadas con una predisposición al desarrollo de cáncer, ninguno de ellos había desarrollado una neoplasia manifiesta en el momento del diagnóstico de la NHCD en los receptores.

5.2.5. Evolución clonal en los pacientes con NHCD

El análisis seriado de las muestras provenientes de los donantes y de las muestras de MO de los pacientes correspondientes al periodo post alo-TPH mostró diferentes modelos de evolución clonal (Figura 15). Para cada uno de los casos estudiados elaboramos un modelo plausible de leucemogénesis, en los cuales se observa una adquisición progresiva de alteraciones genómicas en las células del donante, relacionadas con el desarrollo de LMA o SMD tras el alo-TPH. En el caso 1, la frecuencia del clon portador de la monosomía del cromosoma 7, transferido del donante al receptor, se mantuvo constante durante dos años, hasta que se adquirieron otras alteraciones en el mismo clon (del (12p) y mutación en el gen *LUC7L2*) que conllevó a la aparición del SMD en el receptor en dos meses.

En los casos 2, 4, 6, 7 y 8 el tiempo medio del diagnóstico de la NHCD fue de 19 meses (rango 5-34 meses), y en todos ellos la adquisición de mutaciones y la evolución del clon leucémico se producen desde el comienzo del post alo-TPH (Figura 15). Estos cinco pacientes habían recibido regímenes de acondicionamiento basados en quimioterapia combinada con irradiación corporal total (ICT) ya que la enfermedad primaria era una LLA o timoglobulina en el caso de la LMA (paciente 4). Finalmente, en los casos 3, 5 y 9, el diagnóstico de la NHCD fue 20, 5 y 3,5 años respectivamente, después del alo-TPH (tiempo medio al diagnóstico 9,5 años) y en estos casos no se detectaron mutaciones somáticas en las primeras muestras de MO disponibles post alo-TPH (Figura 15).

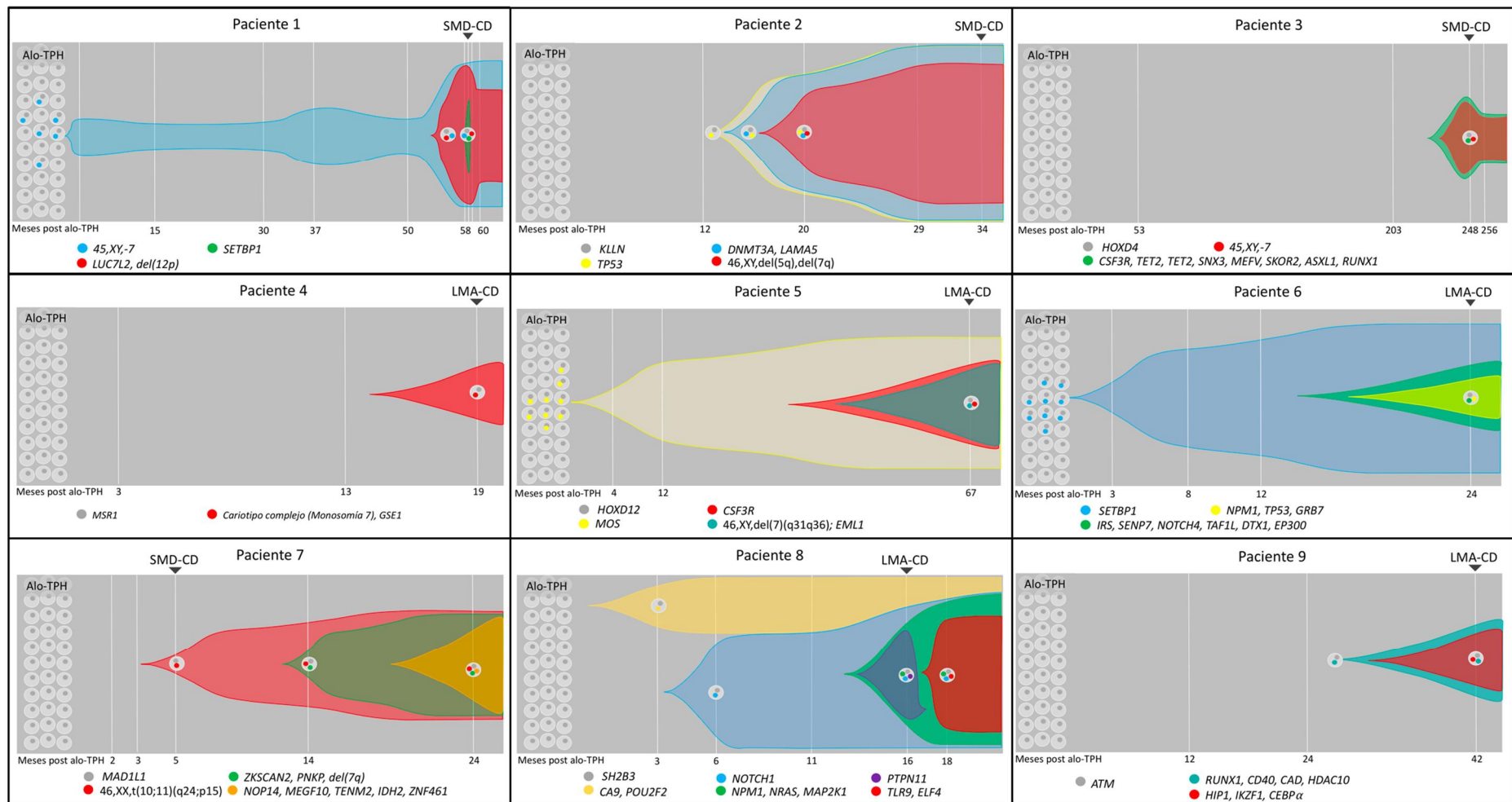


Figura 15. Modelos de evolución clonal para cada uno de los casos de NHCD elaborados con el paquete estadístico Fisplot.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as lighter red, oval shapes with some showing their characteristic indentation. They are scattered across the lower half of the image.

Discusión

6. DISCUSIÓN

El alo-TPH es un procedimiento ampliamente establecido para varias enfermedades congénitas o adquiridas del sistema hematopoyético, entre las que se incluyen las NHs. Gracias a los avances en el conocimiento de la fisiopatología del alo-TPH, el número de pacientes que se someten a dicho procedimiento como tratamiento con potencial curativo de una enfermedad onco-hematológica, es creciente. El alo-TPH ofrece la posibilidad de obtener una mayor supervivencia a largo plazo en aquellos pacientes que tienen una enfermedad de riesgo intermedio o alto y como tratamiento de rescate en pacientes con enfermedad recidivante. Sin embargo, es un procedimiento complejo y gran parte de los pacientes presentan complicaciones derivadas del mismo, siendo las más frecuentes la EICR y la recaída de la enfermedad, esta última representa la causa principal del fracaso del tratamiento y hasta el 50% de los pacientes con LMA finalmente recaen después del alo-TPH.⁸⁰ En este contexto, lo más habitual es que el paciente sufra una recaída de su enfermedad original como consecuencia de la expansión clonal de algún subclon que no había sido erradicado por el tratamiento quimioterápico. Adicionalmente, en raras ocasiones también puede ocurrir que se desarrolle una nueva NH en las células derivadas del donante. Ésta es una complicación poco frecuente del, pero muy severa, del alo-TPH. Se han descrito varios casos de NHCD desde 1971, año en el que Fialkow *et al.*³³ describieron el primer caso. A pesar de ser una patología conocida desde hace varias décadas, ha habido un aumento en el número de casos reportados en los últimos años.⁸¹ Este aumento del número de casos, está directamente relacionado con la elevación en el número de alo-TPHs realizados en el mundo. En el año 2000 se han llevado a cabo cuatro veces más alo-TPHs que en los años previos.^{82,83,84,85,86,87} Del mismo modo, se han producido mejoras en los esquemas de tratamiento de inducción e intensificación con quimioterapia, en la profilaxis y tratamiento de las infecciones y en el manejo de la EICR; que han mejorado la seguridad del trasplante, lo que supone un descenso de la tasa de mortalidad de estos pacientes. Todos estos avances, hacen que actualmente, la probabilidad de desarrollar un NHCD esté aumentada, ya que la supervivencia global a largo plazo está aumentada en los pacientes sometidos a un trasplante. Por otro lado, las técnicas moleculares empleadas para el estudio del quimerismo post trasplante también han mejorado sustancialmente en los últimos años

y actualmente, gran parte de los laboratorios de genética hematológica realizan esta determinación de manera rutinaria, dando lugar a una mejor detección del origen celular de los PH tras el alo-TPH.⁸⁸ A pesar de los avances en los métodos de detección, la incidencia real de las NHCDs es difícil de calcular ya que el número de casos reportados por centro es muy bajo. En el último estudio realizado por el grupo europeo de trasplante de médula ósea (*European Society for Blood and Marrow Transplantation, EBMT*) en el año 2018 sobre las NHCDs, participaron 80 centros y se detectaron un total de 38 casos de NHCDs en 46.051 alo-TPHs, por lo que se estima una prevalencia de 80 casos por 100.000 alo-TPHs y una incidencia acumulada de 0,067%, 0,132% y 0,363% a los 5, 10 y 25 años post-trasplante respectivamente.⁸⁹

Revisión sistemática de los casos de NHCD descritos en la literatura

Con el fin de conocer e identificar algunas características comunes de los pacientes diagnosticados de esta patología tan infrecuente o factores de riesgo que predispongan al desarrollo de la misma, decidimos realizar una revisión sistemática de todos los casos reportados en la literatura desde 1971 como punto de partida del estudio. En dicha revisión sistemática se objetiva que los pacientes que desarrollan una NHCD tienen características muy heterogéneas en cuanto a la edad y sexo del receptor y del donante y el régimen de acondicionamiento del TPH, heterogeneidad que, es similar a lo reportado en la población general de pacientes sometidos a un alo-TPH. Sin embargo, se observa en el conjunto de casos algunas características comunes como la enfermedad primaria por la cual los pacientes se someten a un alo-TPH, el tipo de enfermedad hematológica desarrollada en las células del donante, la fuente de PHs empleada en el trasplante y las alteraciones citogenéticas detectadas en las NHCDs. Estas características difieren de las esperadas si las comparamos con las de los alo-TPHs realizados en Europa y descritos por el EBMT entre 1990 y 2014.^{82,83,84,85,86,87}

Con respecto al tipo de enfermedad primaria por la cual los pacientes son sometidos a un alo-TPH en la cohorte analizada, los casos de leucemia mieloide crónica en fase crónica (LMC-FC) y los pacientes diagnosticados de LLA están aumentados con respecto a lo que cabría esperar para estas patologías. La LMC se origina por la formación del gen

quimérico *BCR-ABL1* en las células hematopoyéticas como resultado de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. El tratamiento actual de estos pacientes se realiza mediante fármacos orales denominados inhibidores de tirosín-cinasa (ITCs), que son inhibidores enzimáticos que bloquean de manera específica la proteína de fusión BCR-ABL con muy buenas respuestas y muy buen perfil de toxicidad. El desarrollo de estos fármacos ha supuesto un cambio radical en el pronóstico y tratamiento de esta enfermedad, ya que el único tratamiento potencialmente curativo hasta ese momento era el alo-TPH. Los casos de LMC-FC reportados, que han desarrollado una NHCD tras alo-TPH, son previos a la aparición de los ITCs, por lo que el porcentaje de pacientes trasplantados como consecuencia de esta patología es acorde con el porcentaje de pacientes con LMC que se trasplantaban anterior a la existencia del tratamiento con ITCs. Por otro lado, la elevación observada de casos de LLA no se explican por una sobrerrepresentación de pacientes pediátricos, pues en la cohorte descrita hay un 23% de pacientes menores de 16 años, ligeramente superior a lo reportado por el EBMT.⁸⁵ Este leve aumento de pacientes pediátricos en la cohorte analizada no es suficiente para explicar la mayor incidencia de casos de LLA como enfermedad primaria. Sin embargo, la elevación en la incidencia de NHCD en los casos de LLA, podría ser consecuencia del tratamiento de acondicionamiento pre-trasplante realizado habitualmente en estos pacientes; ya que, a diferencia de otras leucemias, las LLAs suelen recibir radioterapia además de quimioterapia.

En cuanto al tipo de enfermedad que se desarrolla en las células del donante, en la mayoría de los casos analizados la revisión sistemática (73%), los pacientes son diagnosticados de leucemias agudas (LMA y LLA) y las neoplasias mieloides son más frecuentes que las linfoides. Actualmente, es conocido que la transformación leucémica de las células hematopoyéticas tiene lugar a través de un proceso evolutivo, que requiere de la adquisición de alteraciones genómicas a lo largo del tiempo.²⁸ Las leucemias agudas necesitan un menor número de mutaciones para desarrollarse (8 en LMA y 11 en LLA) comparado con otras NHs que necesitan un mayor número de ellas, como por ejemplo los linfomas no Hodgkin que tienen en torno a 74 mutaciones.¹⁵ Esto hace que la probabilidad de desarrollar una leucemia aguda *de novo* en las células del donante como consecuencia de la acumulación de mutaciones sea mayor que la de

desarrollar un trastorno mieloproliferativo o linfoproliferativo crónico. De la misma manera, la alta frecuencia de neoplasias mieloides en estos pacientes puede ser debida a que el linaje mieloide tiene una vida media más corta que el resto de células hematopoyéticas, por lo que requieren reponerse de manera constante en el individuo, lo que podría favorecer la acumulación de mutaciones en este linaje con respecto al linaje linfoide que no necesita un recambio constante. Esta observación se asemeja con lo detectado en los casos de HC en adultos, en los que la HC suele observarse más frecuentemente en las células nucleadas de linaje mieloide.⁹⁰

Por otro lado, en la cohorte descrita se observa que el empleo de SCU como fuente de PHs en el trasplante está especialmente incrementado, seguida de la MO y la SP, que es la fuente menos empleada en estos pacientes. Esta observación no está relacionada con la evolución natural de procedimiento de trasplante en los últimos años, es decir, los casos en los que se realizó un trasplante de SCU no tuvieron lugar en el periodo de tiempo en los que se realizaba fundamentalmente SCU-TPH, sino que se observa una mayor incidencia de esta complicación en pacientes sometidos a SCU-TPH desde el inicio del trasplante como terapia con potencial curativo de las NHs hasta nuestros días, en los que la fuente de PHs empleada principalmente es la SP. Esta misma observación ha sido descrita recientemente por Kato y colaboradores,³⁷ que demuestran que el empleo de la SCU es un factor de riesgo para el desarrollo de NHCD comparado con las otras fuentes de progenitores hematopoyéticos, ya que, en su cohorte, la incidencia de NHCD tras trasplante de SCU es significativamente mayor que la incidencia de esta enfermedad tras trasplante de MO o de SP. Concretamente, la incidencia a los 5 años de NHCD es de 0,09% (n=23.431) en pacientes con MO como fuente de PHs, de 0,02% en los casos en los que se emplea SP (n=7.210) y 0,35% cuando se emplea SCU como fuente de PHs (n=6.012, $p=0,004$).³⁷

El producto infundido en el trasplante, además de los PHs, también incluye otras células como son los linfocitos T, células *natural killer* (NK), monocitos y células dendríticas. Las características de las células que componen el injerto constituyen el principal factor que determina la velocidad y la robustez de la reconstitución hematopoyética post-trasplante. Las reacciones más importantes que presentan los pacientes, después del alo-TPH, están fuertemente influenciadas por el número y el tipo de células que

componen el injerto, de tal manera que las reacciones aloinmunes más frecuentemente observadas; como la EICR, la EICT, la consecución de un quimerismo completo del donante y la recuperación inmunológica post-trasplante varían en función de la fuente de progenitores empleada, entre otros factores.⁹¹ El sistema inmune reconoce y destruye permanentemente células alteradas que tienen el potencial de convertirse en células cancerosas. Los injertos de SCU contienen células madre más inmaduras y la dosis total de células es menor que la que contienen los injertos de MO y de SP, características que afectan a la reconstitución del sistema inmunológico del receptor en el periodo post alo-TPH, haciendo que sea más lenta que cuando se emplea otra fuente de PHs.

En aquellos casos en los que la vigilancia del sistema inmune está disminuida, bien por el tratamiento inmunosupresor post-TPH o por la inmadurez del nuevo sistema inmune, el riesgo de desarrollar una NHCD puede estar aumentado. Las células inmunocompetentes y las células cancerosas coexisten en un equilibrio dinámico y las complejas alteraciones entre los tumores crecientes y el sistema inmune pueden determinar el curso de la enfermedad. Las neoplasias que aparecen en las células del donante también han sido descritas después del trasplante de órgano sólido y se atribuyen a la terapia inmunosupresora que se administra en estos casos.⁹²

En la revisión sistemática de los casos reportados en la literatura, las NHCDs no sólo tienen una incidencia mayor en los casos en los que se emplea SCU como fuente de PHs, sino que también la enfermedad aparece antes. En estos casos, la mediana del tiempo de aparición de la enfermedad es de 15 (rango 2-47) meses, comparada con la de los pacientes que reciben un trasplante de MO o de SP, en los que la mediana de aparición de la enfermedad es de 36 (rango 1-312) y 24 (rango 1-193) meses respectivamente. Esta observación parece indicar que un prendimiento temprano del injerto y el estado del sistema inmune son factores relevantes en el proceso de leucemogénesis.

De acuerdo con estos hallazgos, el EBMT a través de un estudio multivariable de casos y controles, en el que se compararon 38 casos frente a 67 controles, demostró que la depleción *in vivo* de linfocitos-T con globulina anti-timocito (ATG) o alemtuzumab es un factor de riesgo para el desarrollo de NHCDs (Hazard Ratio (HR): 2,59; $p = 0,014$).⁸⁹ Estos resultados apoyan la teoría de que un sistema inmune deteriorado o la consecución tardía de un sistema inmune competente podría favorecer el desarrollo de una NHCD,

ya que la prevención de la expansión de un clon tumoral habitualmente es prevenida por el sistema inmune y está mediada por los linfocitos T citotóxicos.

Por último, en el estudio también se observa que las alteraciones citogenéticas más frecuentes en las NHCDs son aquellas que involucran al cr 7 (27,6% de los casos). Estas alteraciones cromosómicas suelen estar asociadas con las neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento (NM-t). Hoy sabemos, que existen casos de LMAs y SMDs que son complicaciones tardías derivadas de quimioterapias citotóxicas, como por ejemplo los agentes alquilantes, los inhibidores de la topoisomerasa II, tiopurinas, fludarabina, micofenolato de mofetilo, etc., y/o radioterapia administradas como tratamiento de una neoplasia previa o enfermedades no neoplásicas. Estas neoplasias forman una entidad única denominada NM-t. Más del 90% de los pacientes diagnosticados de NM-t presentan cariotipo complejo, aproximadamente el 70% portan alteraciones cromosómicas desbalanceadas como la pérdida parcial del brazo largo del cr. 5 (-5q) o t(5q), monosomía del cr. 7 o deleción del brazo largo del cr. 7 (-7q). Algunos casos de NHCDs podrían ser consecuencia de la toxicidad residual que exista en el receptor, derivada de los tratamientos previos. Sin embargo, el hecho de que sólo una proporción de los pacientes tratados con protocolos idénticos desarrolle una NM-t sugiere que es posible que algunos pacientes tengan una predisposición heredada como consecuencia de mutaciones en genes relacionados con los mecanismos de reparación del ADN o polimorfismos en genes que afectan al metabolismo o transporte de fármacos. Así mismo, se ha descrito que el haber recibido un trasplante alogénico previo es un factor de riesgo para el desarrollo de NHCDs (HR: 4,08, $p = 0,012$),⁸⁹ resultados que apoyan la toxicidad en el receptor como posible mecanismo para el desarrollo de NHCDs.

Existen otros mecanismos posibles por los cuales aparece una NH en las células del donante, como la posibilidad de que exista una leucemia oculta en el donante. En aquellos casos en los que el donante desarrolla también una NH, el tipo y las características de la NH son similares a las detectadas en el receptor, lo que sugiere que ambas neoplasias, donante y receptor, tienen un origen común.⁴⁰ Dos de los donantes de la cohorte de casos analizada en la revisión sistemática han sido estudiados por técnicas de biología molecular y en ambos se detectan la existencia de una leucemia

oculta previa al alo-TPH. Sin embargo, en la mayoría de los casos (85%) el donante está sano en el momento en el que se diagnostica la NHCD. A pesar de ello, en 8 casos en los cuales se realizaron estudios moleculares detallados en el donante y en el receptor, al menos una de las mutaciones leucemogénicas detectadas en el receptor en el momento de la NHCD, fue también detectada en el donante.⁸¹

Independientemente de la fuente de PH empleada, la mediana del tiempo en el cual las células del donante se vuelven leucemogénicas es de 36 meses, mayor que la mediana de tiempo de las recaídas tempranas de la leucemia post alo-TPH, que ocurren principalmente en los primeros 18 meses del alo-TPH y suelen ser debidas a la expansión de un subclon pre-existente en el momento del diagnóstico que no ha sido erradicado por la quimioterapia o por el EICT. Estos resultados apoyan la teoría de que, en muchos casos no existe una leucemia oculta en el donante, ya que si así fuese el tiempo que tardaría en ser diagnosticada la NHCD sería menor, más similar al tiempo en el que suelen ocurrir las recaídas tempranas. No obstante, sí es posible, que existan lesiones pre-leucémicas en el donante y que se produzca posteriormente una acumulación de mutaciones adicionales necesarias para el desarrollo de la NHCD y sería por ello que la mediana de tiempo en el cual se desarrolla esta complicación es mayor que la de la recaída.

Aunque no se ha objetivado en la revisión sistemática, se han propuesto otros mecanismos que podrían estar involucrados en el desarrollo de esta enfermedad como el estrés replicativo y el acortamiento de los telómeros. Tras el trasplante de PHs hay una fuerte demanda proliferativa sobre las células del donante con el fin de reponer el sistema linfohemopoyético del receptor, este exceso de proliferación probablemente se correlaciona con un aumento en la tasa de mutaciones y errores de replicación. De acuerdo con esta teoría, el EBMT ha demostrado recientemente que el empleo de factores estimulantes de la hematopoyesis en los primeros 100 días post-TPH es un factor de riesgo (HR: 2,43; $p = 0,020$) para el desarrollo de NHCD.⁵² También se ha visto que durante el primer año post trasplante existe un acortamiento significativo y acelerado de los telómeros en los PHs.⁵³

La contribución al desarrollo de NHCD de cada uno de los factores relacionados con el trasplante o de los factores genéticos es desconocida. Posiblemente, no existe un

mecanismo único que sea el responsable del desarrollo de las NHCDs, sino más probablemente la combinación de varias condiciones las que promuevan su aparición.

Estudio genómico de la cohorte nacional de los pacientes con NHCD

Las NHCDs constituyen un campo de investigación de extraordinario interés, ya que la transformación leucémica de los PHs provenientes de un donante sano proporcionan un modelo *in vivo* para la investigación de los mecanismos genómicos de leucemogénesis. De hecho, a diferencia de lo que ocurre en una leucemia *de novo*, que aparece normalmente de forma esporádica e impredecible en la población general, en el caso de las NHCDs se puede disponer de muestras almacenadas, obtenidas a lo largo del seguimiento genético habitual del paciente trasplantado y, por tanto, previas al diagnóstico de la NHCDs. Este modelo, por tanto, presenta una oportunidad única para estudiar los cambios genómicos experimentados por los PHs que conducen a la transformación maligna. El análisis exhaustivo del periodo post-TPH de pacientes que han desarrollado una NHCD, permitirá aumentar el conocimiento del proceso dinámico que tiene lugar antes de que aparezcan los síntomas clínicos en el paciente. Es por ello, que decidimos recoger y analizar en profundidad la casuística nacional de esta patología. Se realizó un estudio multicéntrico en el que se identificaron 9 pacientes diagnosticados de NHCD, provenientes de diferentes hospitales del territorio nacional.

En estos pacientes se realizó la secuenciación del exoma completo mediante secuenciación masiva de las muestras post alo-TPH. Las plataformas de secuenciación masiva han revolucionado la investigación sobre la genómica de los tumores. Estas plataformas de extraordinaria utilidad para los estudios de mutaciones puntuales, pequeñas deleciones e inserciones, cambios en el número de copia y cambios estructurales de genomas tumorales. Así mismo, se han desarrollado aplicaciones bioinformáticas que permiten una mejor detección de las variantes y un posterior análisis funcional y biológico pormenorizado. Una de las aplicaciones principales de la secuenciación masiva en el cáncer es la comparación del genoma tumoral frente al genoma constitucional, con el propósito de identificar las mutaciones únicas del tumor, es decir, las mutaciones somáticas. En el caso de esta enfermedad se compararon los

exomas de las muestras post alo-TPH frente al exoma de la muestra de la colecta de los PHs del donante infundidos y frente a los exomas de las muestras post alo-TPH previas si las había.

La enfermedad primaria más frecuente por la cual se indicó el alo-TPH fue la LLA, al igual que se comprobó en la revisión sistemática. Así mismo, las NHCDs fueron todas neoplasias mieloides, 4 pacientes desarrollaron una LMA y 4 pacientes un SMD.

La mediana de tiempo de aparición de la NHCD desde el alo-TPH en nuestra cohorte es de 29 meses (rango 5-249), observándose un menor tiempo de aparición de la enfermedad en aquellos casos que habían recibido ICT y/o ATG, con la intención de disminuir linfocitos T, junto con la quimioterapia durante el régimen de acondicionamiento, frente a aquellos pacientes que reciben un régimen de acondicionamiento únicamente basado en quimioterapia. Los efectos adversos de la radioterapia a largo plazo han sido ampliamente reconocidos durante años en pacientes sometidos a alo-TPH.⁹³ El riesgo de desarrollar neoplasias secundarias está aumentado en pacientes que han recibido altas dosis de radioterapia, siendo los tumores cerebrales los más comunes y los más fuertemente asociados con la irradiación cráneo-espinal.⁹⁴ Es conocido que el tratamiento recibido antes del trasplante parece ser un factor importante en el desarrollo de NHCD. En este sentido y de acuerdo con lo descrito previamente en la literatura, en nuestra cohorte se objetiva que las principales alteraciones citogenéticas detectadas en los pacientes en el momento del diagnóstico de la NHCD son aquellas que afectan al cr 7 (6 de los 9 pacientes tenían alteraciones que involucraban a dicho cr). Estas alteraciones citogenéticas detectadas en los casos de NHCDs son similares a las detectadas en las NM-t. Por lo tanto, es posible que, en el nicho hematopoyético en el que se van a desarrollar los nuevos PHs, exista una toxicidad residual como consecuencia de la quimioterapia y/o radioterapia administrada previamente, así como daños en el estroma de la MO que pueden influir en la aparición de alteraciones aberrantes en las nuevas células progenitoras. Por otro lado, el tratamiento con ATG conlleva a un retraso en la reconstitución de los linfocitos T del sistema inmune, la ATG es un anticuerpo policlonal contra múltiples antígenos que se expresan en las células T, B, NK y células dendríticas entre otras. El ATG tiene diversos efectos sobre el sistema inmune como la depleción de células T en la SP y tejidos

linfoides mediante lisis, activación de linfocitos T y apoptosis, inducción de apoptosis en células B, modulación de moléculas de superficie claves que median las interacciones de los leucocitos con el endotelio, interfieren en las propiedades funcionales de las células dendríticas e inducen a los linfocitos T reguladores y a las células NK-T.^{95,96} Estos resultados refuerzan la teoría de la importancia que tiene el sistema inmune en el control de la aparición de neoplasias secundarias. El prendimiento y desarrollo de los PHs tiene lugar en un periodo caracterizado por una alta tasa de replicación celular y un descenso de la inmunovigilancia como consecuencia del tratamiento inmunosupresor administrado a estos pacientes para evitar la aparición de la EICR. Este hecho favorece el mantenimiento y evolución de células potencialmente malignas que se generan en el periodo post alo-TPH.

A pesar de lo señalado anteriormente, no todos los pacientes que reciben un mismo acondicionamiento desarrollan NHCD, por lo que parece que existen otros factores que favorecen su desarrollo en ciertos pacientes. Uno de los factores de riesgo podría ser el uso inadvertido de donantes portadores de subclones con potencial maligno como consecuencia de la adquisición de mutaciones somáticas en sus PHs. En nuestro estudio, hemos detectado en un donante, la presencia de una monosomía del cr 7 en los PHs infundidos en el alo-TPH, esta alteración citogenética permanece latente en el receptor durante casi 5 años, hasta la adquisición de nuevas alteraciones genómicas que provocan la expansión del subclon portador de la monosomía del cr 7 y la aparición de SMD-CD. Este donante tenía 72 años en el momento del trasplante y, en el momento del diagnóstico de la NHCD en el receptor, presentó displasia y un 5% de blastos en su MO.

En la presente cohorte detectamos que los otros 7 donantes presentan variantes patogénicas o probablemente patogénicas en genes relacionados con predisposición al desarrollo de NHs o de tumores sólidos y que parecen tener un origen germinal en base a su FAV en la muestra.

Ambas observaciones indican que las alteraciones moleculares heredadas o adquiridas en los donantes pueden ser más frecuentes en estos casos que lo que se sospechaba previamente.

Los tumores hematológicos son enfermedades multifactoriales ocasionadas por el efecto combinado de factores genéticos y ambientales. Recientemente se ha demostrado que una pequeña proporción de los tumores hematológicos tienen un carácter hereditario, es decir, que se producen como consecuencia de mutaciones heredadas en genes concretos que incrementan la susceptibilidad de desarrollar una neoplasia a lo largo de la vida. Esta susceptibilidad se transmite entre los miembros de la familia de acuerdo a distintos patrones de herencia. En los últimos años se han identificado varios genes implicados en diferentes síndromes de predisposición al desarrollo de NHs, especialmente de neoplasias mieloides, y se han desarrollado técnicas para el estudio y caracterización de las mutaciones causales.

La identificación de estos pacientes con susceptibilidad heredada es crucial para el manejo clínico de los mismos. Actualmente, no es posible realizar la secuenciación del conjunto de genes relacionados con la predisposición al desarrollo de NHs de manera rutinaria en todos los donantes ya que supone un coste muy elevado, y además, no se conoce el espectro completo de genes asociados con esta predisposición. Sin embargo, muchos de los genes descritos también se encuentran mutados de forma recurrente en SMDs y/o LMAs esporádicos, como son *CEBPα*, *RUNX1*, *GATA2*, *DDX41*, *ETV6*, *TP53*, *ANKRD26*, etc.^{97,98} Esta característica, junto con el empleo creciente de las tecnologías de secuenciación masiva en la evaluación del pronóstico que confieren las alteraciones genómicas específicas en el momento del diagnóstico o recaída de una NH, hace que el análisis de un conjunto de genes en el momento del diagnóstico proporcione un enfoque eficaz para detectar variantes de posible origen germinal con importancia clínica. En aquellos casos en los que se detecta en la muestra tumoral una de estas alteraciones, con una FAV en torno a 0,5; que indica que esa variante podría tener un origen germinal, es necesario confirmar el origen de la variante mediante la detección o ausencia de la misma en otro tejido, siendo el cultivo de fibroblastos la muestra ideal para dicha confirmación. La identificación de mutaciones de origen germinal en el receptor conllevará la realización de estudios de segregación y un adecuado consejo genético a los familiares que lo deseen, especialmente a los familiares candidatos a ser donantes con el fin de evitar el empleo de donantes familiares portadores de alteraciones genéticas de predisposición al desarrollo de NHs. Adicionalmente, los familiares

portadores de estas alteraciones genéticas podrán beneficiarse de medidas eficaces, no sólo de detección precoz, sino también en la prevención de tumores.

En este contexto, también debería evitarse el empleo de donantes de edades avanzadas, ya que tienen un riesgo aumentado de haber desarrollado una HC y de ser portadores de clones con potencial pre-maligno. Se han detectado mutaciones somáticas en un 5%, 10% y 20% de individuos de 60, 70 y 80 años, respectivamente.⁴⁵ Por este motivo, sería recomendable realizar un estudio pre-trasplante de alta sensibilidad en los donantes de edades avanzadas, con el fin de detectar la existencia de poblaciones subclonales portadoras de alteraciones moleculares comúnmente detectadas en las NH.

Todos los donantes de la presente cohorte estaban sanos en el momento del diagnóstico de la NHCD en el receptor; si bien es cierto que, en uno de los donantes, el de mayor edad (72 años), se detectó un 5% de blastos y cambios displásicos en la MO, aunque el donante estaba asintomático. Los donantes portadores de mutaciones pre-leucémicas heredadas o adquiridas, tal y como se observa en la mayoría de los casos descritos, no están, sin embargo, destinados necesariamente a desarrollar una leucemia. La existencia de un clon pre-leucémico en el donante es importante pero no suficiente para desarrollar una leucemia, ya que otros factores pueden jugar un papel importante. Otros factores genéticos y ambientales relacionados con el trasplante o con el nicho en el cual se encuentran los PHs que están habitualmente alterados en el contexto del trasplante, pueden influir en el proceso de leucemogénesis, favoreciendo la adquisición de nuevas alteraciones genéticas y dando lugar a una expansión clonal. Es posible que los clones pre-malignos proliferen en el periodo post-trasplante ya que se encuentran en un nicho con una toxicidad residual, como consecuencia de la quimioterapia y/o radioterapia, y con un sistema inmune deprimido o inmaduro.

El pronóstico de los pacientes que desarrollan una NHCD es malo, la mayoría de ellos fallecen como causa de la progresión o recaída de la NHCD. En nuestra cohorte 8 de los 9 pacientes fallecieron y uno de ellos permanece vivo después de realizar un segundo alo-TPH de otro donante. Según lo reportado en la literatura, se han conseguido supervivencias a largo plazo en alguno de estos pacientes mediante la realización de un segundo alo-TPH con un donante alternativo, aunque estos pacientes tienen mayor probabilidad de fallecer por causas relacionadas con el procedimiento.⁸⁹

Una de las cuestiones más importantes para entender la progresión de un clon tumoral en las leucemias es determinar el número y la naturaleza de diferentes subclones existentes. Los resultados derivados de trabajos en los que se han secuenciado genomas, exomas completos o paneles de genes en pacientes con leucemias, determinan que la mayoría de los casos de leucemia son portadores de múltiples mutaciones que se han ido acumulando secuencialmente en una única célula hasta generar el clon leucémico dominante.⁹⁹ Una de las cuestiones más importantes en el campo de la genómica de las leucemias es identificar las mutaciones iniciadoras de la neoplasia que constituyen el clon pre-leucémico. De manera general, en todos los tipos de cáncer, el conocimiento de las mutaciones iniciadoras es limitado, ya que en estos estadios de la enfermedad suelen ser clínicamente indetectables y una vez que se ha diagnosticado la enfermedad estos clones son superados por los clones descendentes más malignos. Aunque es difícil de estudiar, la evolución temprana en la historia natural del cáncer es clínicamente relevante. Los casos de NHCD se presentan como el modelo perfecto para el estudio *in vivo* de los clones pre-leucémicos y su transformación maligna.

A través de este estudio seriado en los 9 pacientes diagnosticado de NHCDs, ha sido posible definir la arquitectura tumoral en cada una de las muestras correspondientes a la evolución de la enfermedad en todos los casos de NHCD. Se objetiva en las muestras post-TPH la aparición sucesiva de mutaciones que parecen estar asociadas con el desarrollo de la enfermedad. Las NMs en estos casos se estructuran en un único clon fundador con alteraciones genómicas que se detectan en todas las células leucémicas y varios subclones, los clones malignos evolucionan y aceleran la progresión de la enfermedad mediante la adquisición de nuevas mutaciones. Es interesante destacar que, existe una alta heterogeneidad temporal y espacial en todos los casos.

A pesar de que se observan alteraciones citogenéticas similares en varios casos, no se detectan mutaciones comunes, ni mutaciones en genes que afecten a la misma ruta celular, ni un patrón claro de adquisición de mutaciones clonales. En una primera etapa se adquieren mutaciones que afectan genes cuya función está relacionada con la regulación epigenética como *DNMT3A* y *TET2* o genes implicados en vías de señalización intracelular como *SNX13*, *RHPN2*, *IRS1* y *CSF3R*. En general, en las neoplasias mieloides,

las mutaciones en reguladores epigenéticos como *DNMT3A*, *TET2* e *IDH1/2* suelen detectarse en estadios tempranos de la enfermedad y se consideran mutaciones pre-leucémicas que favorecen la expansión clonal y bloquean la diferenciación de los PHs.^{100,101}

Alguna de las alteraciones moleculares detectadas en esta cohorte son mutaciones ampliamente estudiadas, sobre las que conocemos su papel en el desarrollo de las NMs, sin embargo, la mayoría de ellas son alteraciones que no han sido previamente descritas pero que, tras su análisis *in silico* se clasifican como mutaciones deletéreas en genes que codifican para proteínas que forman parte de rutas de señalización intracelular relacionadas con el cáncer y por lo tanto, parecen tener un papel fundamental en el desarrollo de la neoplasia.

El presente estudio demuestra que las NMs evolucionan dentro de un proceso de diversificación genética, expansión clonal y selección clonal, de acuerdo con el actual modelo de leucemogénesis que determina que la mayoría de los casos de leucemia presentan múltiples mutaciones que se han adquirido de manera secuencial en un linaje celular dando lugar un clon leucémico dominante. La transformación leucemogénica de los PHs del donante proporciona un modelo *in vivo* para el estudio de los mecanismos implicados en la leucemogénesis, teniendo en cuenta que el nicho en el que se producen todos estos cambios tiene una toxicidad residual, por la enfermedad y los tratamientos previos, que puede favorecer la inestabilidad genómica y hacer que el proceso se acelere.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as bright red, oval shapes with some showing their characteristic indentation. They are scattered across the lower half of the image.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

- 1.- Los casos descritos en la literatura y revisados sistemáticamente presentan una elevada heterogeneidad en sus características aunque comparten algunos rasgos comunes como la alta frecuencia de SCU como fuente de PHs, de leucemias agudas en las células del donante y la presencia de alteraciones citogenéticas en el cr.7
- 2.- El uso de SCU como fuente de PHs parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de NHCD comparado con otras fuentes empleadas en el alo-TPH.
- 3.- Las leucemias agudas son el tipo de NH desarrollada en las células del donante más habituales en los casos de NHCD.
4. Las alteraciones en el cromosoma 7, son las más frecuentes en la cohorte de pacientes, al igual que se objetivó en la revisión sistemática de los casos reportados.
- 5.- Todos los donantes de la cohorte presentan un clon pre-maligno o maligno, heredado o adquirido previo al alo-TPH, esto tiene un impacto clínico en los pacientes que se van a someter a un alo-TPH.
- 6.- El estudio de la cohorte demuestra la existencia de un proceso secuencial de expansiones clonales promovidas por la adquisición de mutaciones somáticas en las células hematopoyéticas del donante.
- 7.- El análisis seriado e integrado realizado en la cohorte de casos con NHCD objetiva una alta heterogeneidad intratumoral y evolutiva en todos ellos.
- 8.- Teniendo en cuenta que la gran mayoría de los donantes están sanos, es posible que clones pre-malignos proliferen con menor dificultad en el periodo post-trasplante ya que se encuentran en un nicho con una toxicidad residual, como consecuencia de la quimioterapia y/o radioterapia, y con un sistema inmune suprimido o inmaduro.

A microscopic view of numerous red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave discs, appearing as lighter red, oval shapes with some showing their characteristic indentation. They are scattered across the lower half of the image.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFIA

- 1 Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* 2012; **10**: 120–136.
- 2 Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development* 2013; **140**: 2463–2467.
- 3 Shafat MS, Gnaneswaran B, Bowles KM, Rushworth SA. The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. *Blood Rev* 2017; **31**: 277–286.
- 4 Hu D, Shilatifard A. Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. *Genes Dev* 2016; **30**: 2021–2041.
- 5 Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood* 2017; **130**: 410–423.
- 6 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2018.
- 7 Virchow R. Weisses Blut und Milztumoren. *Froriep's Not* 1845; : 151–156.
- 8 Bennet JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg J* 1845; : 413–423.
- 9 Neumann E. Uber myelogene leukamie. *Berl Klin Wochenschrift* 1878; : 69.
- 10 Bauer K. H. Das Krebsproblem. *Springer* 1949.
- 11 Dahlberg, G. *Dit min tanke natt*. Bonnier, 1943.
- 12 Nordling CO. A new theory on the cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 1953; **7**: 68.
- 13 C.O. Nordling. Evidence regarding the multiple mutations theory of the cancer-inducing mechanism. *Acte Genet* 1955; **5**: 93–104.
- 14 Peter C. Nowell. The clonal evolution of tumor cell population. *Science* 1976; **194**: 23–28.
- 15 Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* 2013; **339**: 1546–1558.
- 16 Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; **481**: 306–313.
- 17 Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009; **458**: 719–724.
- 18 Jan M, Majeti R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene* 2013; **32**: 135–140.
- 19 Warner JK, Wang JCY, Takenaka K, Doulatov S, McKenzie JL, Harrington L *et al.*

Direct evidence for cooperating genetic events in the leukemic transformation of normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 2005; **19**: 1794.

20 Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; **129**: 424–447.

21 Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood* 2017; **130**: 410–423.

22 Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016; **127**: 29–41.

23 Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R *et al.* Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2018; **379**: 1416–1430.

24 Miyamoto K, Minami Y. Precision medicine and novel molecular target therapies in acute myeloid leukemia: the background of hematologic malignancies (HM)-SCREEN-Japan 01. *Int J Clin Oncol* 2019. doi:10.1007/s10147-019-01467-1.

25 Wang B, Liu Y, Hou G, Wang L, Lv N, Xu Y *et al.* Mutational spectrum and risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia patients based on next-generation sequencing. *Oncotarget* 2016; **7**: 32065–32078.

26 Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K *et al.* Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; **366**: 1090–1098.

27 Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K *et al.* Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N Engl J Med* 2009; **361**: 1058–1066.

28 Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012; **481**: 506–510.

29 Chen J, Kao Y-R, Sun D, Todorova TI, Reynolds D, Narayanagari S-R *et al.* Myelodysplastic Syndrome Progression to Acute Myeloid Leukemia at the Stem Cell Level. *Nat Med* 2019; **25**: 103–110.

30 E. Donnall Thomas, Harry L. Lochte, Wan Ching Lu and Joseph W. Ferrebee. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; **257**: 491–496.

31 Storb R. *Edward Donnall Thomas (1920–2012)*. Nature Publishing Group, 2012.

32 Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006; **354**: 1813–1826.

33 Fialkow PJ, Thomas ED, Bryant JI, Neiman PE. Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet Lond Engl* 1971; **1**: 251–255.

- 34 Boyd CN, Ramberg RC, Thomas ED. The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Res* 1982; **6**: 833–837.
- 35 Hertenstein B, Hambach L, Bacigalupo A, Schmitz N, McCann S, Slavin S *et al.* Development of leukemia in donor cells after allogeneic stem cell transplantation - A survey of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica* 2005; **90**: 969–975.
- 36 Nagamura-Inoue T, Kodo H, Takahashi T, Mugishima H, Tojo A, Asano S. Four cases of donor cell-derived AML following unrelated cord blood transplantation for adult patients: Experiences of the Tokyo Cord Blood Bank. *Cytotherapy* 2007; **9**: 727–728.
- 37 Kato M, Yamashita T, Suzuki R, Matsumoto K, Nishimori H, Takahashi S *et al.* Donor cell-derived hematological malignancy: a survey by the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Leukemia* 2016; **30**: 1742–1745.
- 38 Niederwieser DW, Appelbaum FR, Gastl G, Gersdorf E, Meister B, Geissler D *et al.* Inadvertent transmission of a donor's acute myeloid leukemia in bone marrow transplantation for chronic myelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1794–1796.
- 39 Liu Z, Liu H, Zhang Y, Kong D, Shi J, Zhang Y *et al.* ASXL1-mutated donor HSCs evolved into FLT3-ITD positive AML in the unrelated donor and FLT3-ITD negative AML in the recipient after transplant. *Blood* 2015; **126**: 5403.
- 40 Herold S, Kuhn M, Bonin MV, Stange T, Platzbecker U, Radke J *et al.* Donor cell leukemia: evidence for multiple preleukemic clones and parallel long term clonal evolution in donor and recipient. *Leukemia* 2017; **31**: 1637–1640.
- 41 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; **127**: 2391–2405.
- 42 Tawana K, Drazer MW, Churpek JE. Universal genetic testing for inherited susceptibility in children and adults with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: are we there yet? *Leukemia* 2018. doi:10.1038/s41375-018-0051-y.
- 43 Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y *et al.* Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 1996; **88**: 59–65.
- 44 Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z *et al.* Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2012; **44**: 1179–1181.
- 45 Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG *et al.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* 2014; **371**: 2488–2498.
- 46 Rizzo JD, Curtis RE, Socié G, Sobocinski KA, Gilbert E, Landgren O *et al.* Solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009; **113**: 1175–

1183.

47 Majhail NS, Brazauskas R, Rizzo JD, Sobecks RM, Wang Z, Horowitz MM *et al.* Secondary solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation using busulfan-cyclophosphamide conditioning. *Blood* 2011; **117**: 316–322.

48 Majhail NS. Secondary cancers following allogeneic haematopoietic cell transplantation in adults: Review. *Br J Haematol* 2011; **154**: 301–310.

49 Kumar S. Second Malignant Neoplasms Following Radiotherapy. *Int J Environ Res Public Health* 2012; **9**: 4744–4759.

50 Blau O, Hofmann W-K, Baldus CD, Thiel G, Serbent V, Schümann E *et al.* Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol* 2007; **35**: 221–229.

51 Mayor PC, Eng KH, Singel KL, Abrams SI, Odunsi K, Moysich KB *et al.* Cancer in primary immunodeficiency diseases: Cancer incidence in the United States Immune Deficiency Network Registry. *J Allergy Clin Immunol* 2018; **141**: 1028–1035.

52 Notaro R, Cimmino A, Tabarini D, Rotoli B, Luzzatto L. In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**: 13782–13785.

53 Gadalla SM, Savage SA. Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. *Blood Rev* 2011; **25**: 261–269.

54 Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1754–1760.

55 Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; **25**: 2078–2079.

56 Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* 2009; **25**: 2283–2285.

57 McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A *et al.* The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; **20**: 1297–1303.

58 McVean GA, Altshuler (Co-Chair) DM, Durbin (Co-Chair) RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; **491**: 56–65.

59 Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D *et al.* Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: D84–D90.

60 Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J *et al.* COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: D777–D783.

- 61 Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S *et al.* The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 2017; **136**: 665–677.
- 62 Ng PC. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 3812–3814.
- 63 Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; **7**: 248–249.
- 64 Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLOS Comput Biol* 2016; **12**: e1004873.
- 65 Miller CA, McMichael J, Dang HX, Maher CA, Ding L, Ley TJ *et al.* Visualizing tumor evolution with the fishplot package for R. *BMC Genomics* 2016; **17**. doi:10.1186/s12864-016-3195-z.
- 66 Xiao H, Shi J, Luo Y, Tan Y, He J, Xie W *et al.* First report of multiple CEBPA mutations contributing to donor origin of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011; **117**: 5257–5260.
- 67 Hirsch P, Mamez AC, Belhocine R, Lapusan S, Tang R, Suner L *et al.* Clonal history of a cord blood donor cell leukemia with prenatal somatic JAK2 V617F mutation. *Leukemia* 2016. doi:10.1038/leu.2016.31.
- 68 Diamond HR, Ornellas MH, Orfao A, Gomes BE, Campos MM, Fernandez TS *et al.* Acute myeloid leukemia of donor origin after allogeneic stem cell transplantation from a sibling who harbors germline XPD and XRCC3 homozygous polymorphisms. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 2011; **4**: 39.
- 69 Ho ESK, Chow HCH, Chan CTL, Luo R, Leung HCM, Yiu SM *et al.* Whole genome sequencing on donor cell leukemia in a patient with multiple myeloma identified gene mutations that may provide insights to leukemogenesis. *Blood* 2012; **120**. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L70963492>.
- 70 Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H *et al.* Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2014; **28**: 426–428.
- 71 Gondek LP, Zheng G, Ghiaur G, DeZern AE, Matsui W, Yegnasubramanian S *et al.* Donor cell leukemia arising from clonal hematopoiesis after bone marrow transplantation. *Leukemia* 2016. doi:10.1038/leu.2016.63.
- 72 Kobayashi S, Kobayashi A, Osawa Y, Nagao S, Takano K, Okada Y *et al.* Donor cell leukemia arising from preleukemic clones with a novel germline DDX41 mutation after

allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 2017; **31**: 1020–1022.

73 Suárez-González J, Martínez-Laperche C, Martínez N, Rodríguez-Macías G, Kwon M, Balsalobre P *et al.* Whole-exome sequencing reveals acquisition of mutations leading to the onset of donor cell leukemia after hematopoietic transplantation: a model of leukemogenesis. *Leukemia* 2018. doi:10.1038/s41375-018-0042-z.

74 Nizialek EA, Peterson C, Mester JL, Downes-Kelly E, Eng C. Germline and somatic KLLN alterations in breast cancer dysregulate G2 arrest. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 2451–2461.

75 van Scherpenzeel Thim V, Remacle S, Picard J, Cornu G, Gofflot F, Rezsöházy R *et al.* Mutation analysis of the HOX paralogous 4-13 genes in children with acute lymphoid malignancies: Identification of a novel germline mutation of HOXD4 leading to a partial loss-of-function. *Hum Mutat* 2005; **25**: 384–395.

76 Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Hu JJ *et al.* Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002; **32**: 321–325.

77 Makishima H. Somatic SETBP1 mutations in myeloid neoplasms. *Int J Hematol* 2017; **105**: 732–742.

78 Tsukasaki K, Miller CW, Greenspun E, Eshaghian S, Kawabata H, Fujimoto T *et al.* Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene* 2001; **20**: 3301.

79 Chen Y, Fang F, Hu Y, Liu Q, Bu D, Tan M *et al.* The Polymorphisms in LNK Gene Correlated to the Clinical Type of Myeloproliferative Neoplasms. *PLoS One* 2016; **11**: e0154183.

80 Rautenberg C, Germing U, Haas R, Kobbe G, Schroeder T. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 228.

81 Suárez-González J, Martínez-Laperche C, Kwon M, Balsalobre P, Carbonell D, Chicano M *et al.* Donor Cell-Derived Hematologic Neoplasms after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2018; **24**: 1505–1513.

82 Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant* 2016. doi:10.1038/bmt.2016.20.

83 Gratwohl A. Bone marrow transplantation activity in Europe 1990. *Bone Marrow Transplant* 1991; **8**: 197–201.

84 Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P *et al.* Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow*

Transplant 2015; **50**: 476.

85 Passweg JR, Baldomero H, Peters C, Gaspar HB, Cesaro S, Dreger P *et al.* Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2014; **49**: 744.

86 Passweg JR, Baldomero H, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF *et al.* Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48**: 1161.

87 Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, Bregni M, Cesaro S, Dreger P *et al.* The EBMT activity survey: 1990–2010. *Bone Marrow Transplant* 2012; **47**: 906.

88 Pérez-Simón JA, Caballero D, Diez-Campelo M, Lopez-Pérez R, Mateos G, Cañizo C *et al.* Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia* 2002; **16**: 1423–1431.

89 for the Transplant Complications Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Engel N, Rovo A, Badoglio M, Labopin M, Basak GW *et al.* European experience and risk factor analysis of donor cell-derived leukaemias/MDS following haematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2018. doi:10.1038/s41375-018-0218-6.

90 Valent P, Kern W, Hoermann G, Milosevic Feenstra JD, Sotlar K, Pfeilstöcker M *et al.* Clonal Hematopoiesis with Oncogenic Potential (CHOP): Separation from CHIP and Roads to AML. *Int J Mol Sci* 2019; **20**. doi:10.3390/ijms20030789.

91 Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Shimabukuro-Vornhagen A, Skoetz N *et al.* Comparison of bone marrow versus peripheral blood allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in adults - a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; **94**: 179–188.

92 Morath C, Schwenger V, Schmidt J, Zeier M. Transmission of malignancy with solid organ transplants. *Transplantation* 2005; **80**: S164-166.

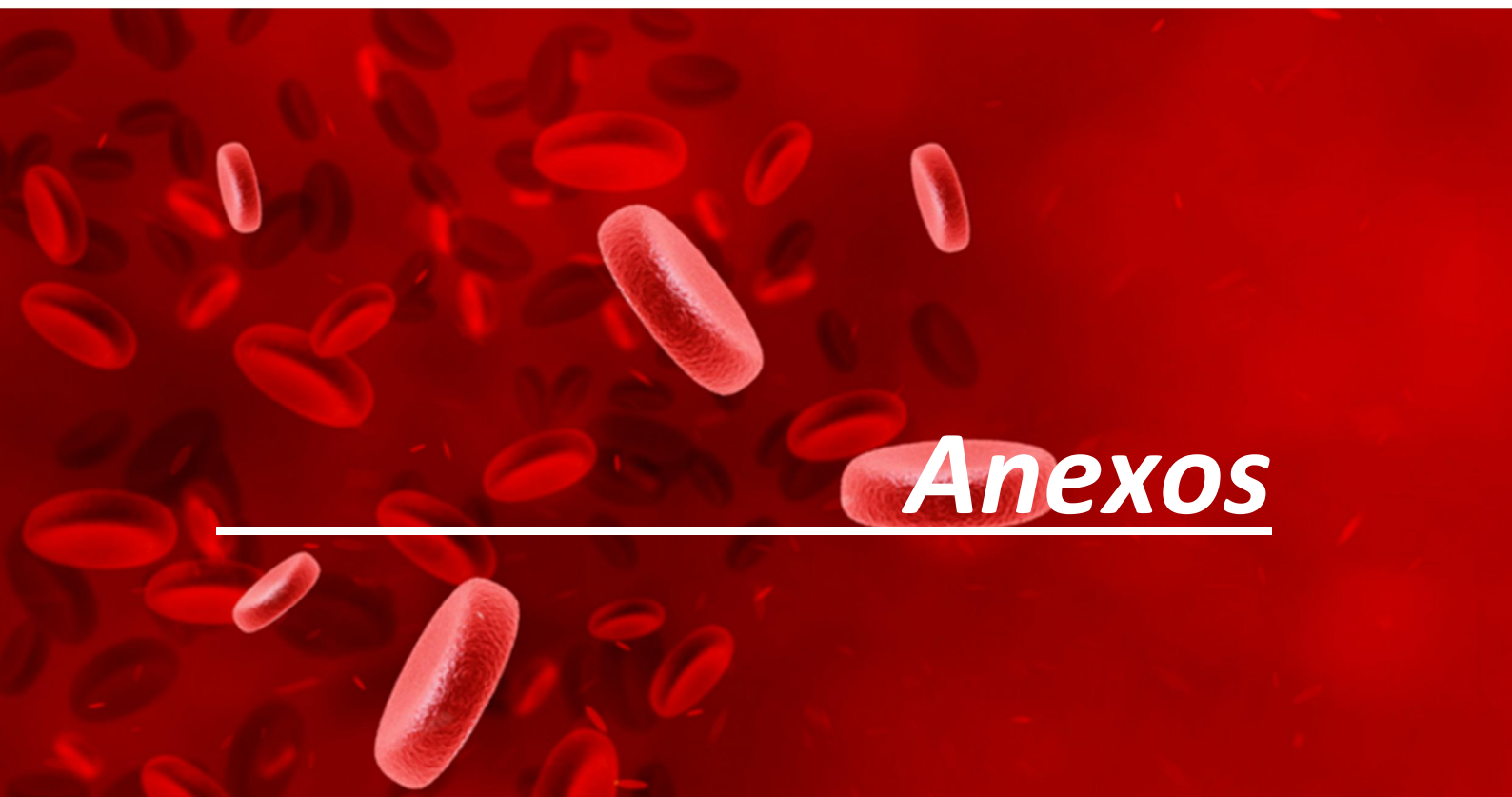
93 Bresters D, Lawitschka A, Cugno C, Pötschger U, Dalissier A, Michel G *et al.* Incidence and severity of crucial late effects after allogeneic HSCT for malignancy under the age of 3 years: TBI is what really matters. *Bone Marrow Transplant* 2016; **51**: 1482–1489.

94 Baker KS, Bresters D, Sande JE. The Burden of Cure: Long-term Side Effects Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) in Children. *Pediatr Clin North Am* 2010; **57**: 323–342.

95 Storek J, Mohty M, Boelens JJ. Rabbit Anti-T Cell Globulin in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; **21**: 959–970.

96 Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007; **21**: 1387.

-
- 97 Feurstein S, Godley LA. Germline ETV6 mutations and predisposition to hematological malignancies. *Int J Hematol* 2017; **106**: 189–195.
- 98 Akpan IJ, Osman AEG, Drazer MW, Godley LA. Hereditary Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis, Questions, and Controversies. *Curr Hematol Malig Rep* 2018. doi:10.1007/s11899-018-0473-7.
- 99 Martignoles J-A, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19123850.
- 100 Sato H, Wheat JC, Steidl U, Ito K. DNMT3A and TET2 in the Pre-Leukemic Phase of Hematopoietic Disorders. *Front Oncol* 2016; **6**. doi:10.3389/fonc.2016.00187.
- 101 Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2013; **98**: 648–657.



Anexos

9. ANEXOS

ANEXO I. Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la hematopoyesis.

Figura 2. Incidencia y mortalidad estimada de las neoplasias hematológicas en el mundo en el año 2020.

Figura 3. Modelo de evolución clonal en cáncer.

Figura 4. Modelo de evolución clonal de las células hematopoyéticas en un clon leucémico.

Figura 5. Patrones de recaída observados en la leucemia mieloide aguda.

Figura 6. Origen celular del sistema hematopoyético del receptor y alguna de las posibles complicaciones tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Figura 7. Mecanismos que pueden influir en el desarrollo de una NHCD ocurridas antes (A) o después (B) del trasplante.

Figura 8. Proceso de búsqueda de casos y publicaciones de NHCD en la revisión sistemática realizada.

Figura 9. Muestras de MO del periodo de seguimiento post-TPH analizadas en los pacientes con NHCD.

Figura 10. Distribución de los donantes por rangos de edad.

Figura 11. Tiempo de aparición de las NHCD tras el alo-TPH según la fuente de progenitores hematopoyéticos empleada.

Figura 12. Enfermedad primaria diagnosticada en el receptor (n = 131) y tipo de neoplasia hematológica derivada en las células donantes (n = 137).

Figura 13. Estudios citogenéticos en los pacientes con NHCD.

Figura 14. Análisis de los CNVs en las muestras del momento del diagnóstico de NHCD en los pacientes con cariotipo alterado.

Figura 15. Modelos de evolución clonal para cada uno de los casos de NHCD elaborados con el paquete estadístico Fisplot.

ANEXO II. Índice de tablas

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con NHCD.

Tabla 2. Características clínicas y del alo-TPH en pacientes con NHCD.

Tabla 3. Estudios moleculares realizados en los casos de DCHN.

Tabla 4. Variantes somáticas deletéreas adquiridas en el periodo post alo-TPH en pacientes con NHCD.

Tabla 5. Variantes identificadas en los donantes.

ANEXO III. Características clínicas de los casos de neoplasias hematológicas reportadas en la literatura

<i>Autor</i>	<i>Edad/Sexo</i>	<i>Enf. primaria</i>	<i>Donante Edad/Sex</i>	<i>Tipo de don.</i>	<i>Fuente de PH</i>	<i>Tipo de NHCD</i>	<i>Citogenética de NHCD</i>	<i>Tiempo desde el alo-TPH hasta NHCD (Meses)</i>	<i>Pronóst.</i>
<i>Fialkow et al.</i>	16/F	LLA	10/M	E-id	MO	LLA	46,XY	2	<i>Exitus</i>
<i>Donnall et al.</i>	7/F	LLA	-/M	E-id	MO	LLA	46,XY	4,5	<i>Exitus</i>
<i>Goh et al.</i>	4/F	LMA	-/M	E-id	MO	LMA	47,XY,+F	-	<i>Exitus</i>
<i>Elfenbein et al.</i>	22/M	LMA	-/F	E-id	MO	LMA	45,X,t(8;21)	34	Sano
<i>Newburger et al.</i>	12/M	LLA	-/M	E-id	MO	LLA	46,XY	20	<i>Exitus</i>
<i>Marmont et al.</i>	21/ F	LMC-CB	17/M	E-id	MO	LLA	46,XY,t(9;22)	5,7	<i>Exitus</i>
<i>Witherspoon et al.</i>	25/F	LLA	-/F	E-id	MO	LMA	47,XX,5p-,7p+,-8,14q+,-16,-16,-22,-22,+6?¿ // 47,XX,5p-,8,14q+,-16,-16,-20,-22,-22,+7?¿	72	-
<i>Smith et al.</i>	9/M	LMC-CB	-/F	E-id	MO	LLA	46,XX,inv(9)	21	Sano
<i>Palka et al.</i>	12/F	LLA	14/M	E-id	MO	LLA	47,XY,+8	36	Sano
<i>Schmitz et al.</i>	22/F	LLA	-/M	E-id	MO	LLA	46,XY,del(6)(q23q25) // 45,X,-4,del(6)(q23q25),+8,-15,-21,+i(21q),+mar	29	Sano
<i>Feig et al.</i>	6/F	LLA	4/M	E-id	MO	LLA	46,XY	24	Sano
<i>Stein et al.</i>	4/M	LLA	-/F	E-id	MO	LLA	92,XXXX	30	<i>Exitus</i>
<i>Niederwieser et al.</i>	29/F	LMC-FC	-/M	E-id	MO	LMA	46,XY,t(1;5)	6	<i>Exitus</i>
<i>Browne et al.</i>	19/M	EHNM	-/F	E-id	MO	LMA	46,XX t(9;11)	9	Sano
<i>Cullis et al.</i>	30/M	LMC-FC	-/F	E-id	MO	LLA	46,XX	12	Sano
<i>Mouratidou et al.</i>	16/F	LMA	-/M	E-id	MO	LLA	46,XY	11	<i>Exitus</i>
<i>Cransac et al.</i>	37/F	LMA	-/F	E-id	MO	LLA	46,XX,t(14;18)	36	<i>Exitus</i>
<i>Katz et al.</i>	5/M	EHNM	-/F	E-id	MO	LLA	46,XX	60	Sano

Lowsky <i>et al.</i>	43/M	LMC-CB	-/F	E-id	MO	LMA	45,XX,-7	36	<i>Exitus</i>
Abeliovich <i>et al.</i>	28/F	LMA	36/M	E-id	MO	SMD	45,X0	4	Sano
Saito <i>et al.</i>	42/F	LMC-FC	-/M	E-id	MO	LLA	46,XY t(9;22)	39	Sano
Cooley <i>et al.</i>	25/M	LMC-FC	-/F	E-id	MO	LMA	45,X0,t(8;21)	132	<i>Exitus</i>
Hambach <i>et al.</i>	38/M	LMC-FC	-/M	NE-id	MO	LMA	46,XY	14	Sano
Berg <i>et al.</i>	19/F	LNH	25/F	E-id	MO	LNH	-	90	<i>Exitus</i>
Brunstein <i>et al.</i>	41/M	SMD	-/M	E-id	-	LMA	46,XY,add(21)(q22)	36	<i>Exitus</i>
Lawler <i>et al.</i>	12/F	EHNM	-/F	E-id	MO	LMA	-	19	<i>Exitus</i>
Au <i>et al.</i>	51/F	LMC-FC	49/M	E-id	MO	LMA	46,XY	48	Sano
Gopsca <i>et al.</i>	50/M	LMC-FC	-/F	E-id	MO	LMA	46,XX	54	Sano
Bielorai <i>et al.</i>	-/M	LLA	4/F	E-id	MO	LMA	46,XX,inv(11)(p15q23)	45	<i>Exitus</i>
Komeno <i>et al.</i>	48/M	SMD	-/F	NE-id	MO	SMD	47,XX,+11	24	Sano
Haltrich <i>et al.</i>	2/F	EHNM	8/M	E-id	MO	SMD	46,XY,t(3;21)(q26;q21) // 47,idem,+12	156	<i>Exitus</i>
Lang <i>et al.</i>	2/F	EHNM	37/F	NE-id	MO	SMD	45,XX,-7	36	Sano
Daly <i>et al.</i>	44/F	LMA	-/F	E-id	MO	LMA	46,XX	37	Sano
Boulton <i>et al.</i>	54/m	LNH	-/F	E-id	SP	LMA	46,XX,-7,+mar // 48,idem,+16,+22 // 49,idem,+14,+16,+22	49	<i>Exitus</i>
Kraut <i>et al.</i>	35/F	LMC-CB	-/F	NE N-id	MO	SMD	46,XX	84	-
Herstenstein <i>et al.</i>	24/F	LLA	-/M	E-id	MO	LMA	46,XY t(8;21)	15	<i>Exitus</i>
Herstenstein <i>et al.</i>	16/M	LMA	-/F	E-id	MO	LLA	46,XX	164	<i>Exitus</i>
Herstenstein <i>et al.</i>	35/F	LMA	-/M	E-id	SP	LMA	46,XY add3, del12	5	<i>Exitus</i>
Herstenstein <i>et al.</i>	34/M	LMA	-/F	E-id	MO	LMA	46,XX	39	Sano
Herstenstein <i>et al.</i>	47/F	LMA	-/F	E-id	MO	LMA	46,XX	78	<i>Exitus</i>
Herstenstein <i>et al.</i>	35/M	LMC-FC	-/M	NE-id	MO	LMA	46,XY t(15;17)	39	Sano
Herstenstein <i>et al.</i>	56/F	LMC-FC	-/M	E-id	SP	LMA	45,XY,-6,-7,-11,der(17),-18	67	<i>Exitus</i>
Fraser <i>et al.</i>	0.5/M	LCH	-/M	SCU	SCU	LMA	46,XY, der(7)t(1;7)(q21.1;q22)	40	<i>Exitus</i>
Matsunaga <i>et al.</i>	57/F	LNH	-/M	SCU	SCU	LMA	46,XY,add(19)(p13)	8,5	<i>Exitus</i>

Reichard <i>et al.</i>	30/M	LLA	-/F	E-id	MO	LMA	46,XX,MLL+	16	<i>Exitus</i>
Hashino <i>et al.</i>	23/F	EHNM	-/-	E-id	SP	SMD	t(2;3),-7	24	<i>Exitus</i>
Cetin <i>et al.</i>	5/F	LMMJ	11/F	E-id	SP	LMA	CC	1	<i>Exitus</i>
Ataergin <i>et al.</i>	38/F	LMC-FC	-/M	E-id	MO	LMA	46,XY	11	<i>Exitus</i>
Ando <i>et al.</i>	32/F	LMA	-/F	SCU	SCU	LMA	46,XX	11	<i>Exitus</i>
Ruiz-Argüelles <i>et al.</i>	3/F	LLA	16/F	E-id	MO	LLA	-	12,9	Sano
Sevilla <i>et al.</i>	5/F	LMA	-/M	SCU	SCU	SMD	45, XY, -7	3	Sano
Sala-Torra <i>et al.</i>	48/M	LMC-FC	44/M	NE-id	MO	SMD	45,XY,-7	96	-
Sala-Torra <i>et al.</i>	33/F	LMC-FC	44/F	NE N-id	MO	SMD	45,XY,-7	114	-
Sala-Torra <i>et al.</i>	45/M	LMC-FC	40/F	E-id	SP	SMD	46,XX,del(20q)	48	-
Sala-Torra <i>et al.</i>	11/M	EHNM	22/F	E-id	MO	SMD	46,XX,del(5q)	312	-
Sala-Torra <i>et al.</i>	4/M	LLA	3/F	E N-id	MO	SMD	46,XX,inv(11)	72	-
Sala-Torra <i>et al.</i>	6/F	LMC-FC	45/M	NE N-id	MO	LLC	-	144	-
Sala-Torra <i>et al.</i>	45/F	LLA	36/F	E N-id	SP	LLA	46,XX	4,3	-
Havelange <i>et al.</i>	40/M	MM	-/F	E N-id	SP	LMA	-	48	Sano
Pieroni <i>et al.</i>	45/M	LMC-FC	-/M	E N-id	MO	LMA	46,XY,del(6)(q23q25), inv(16)(p13q22).	52,8	Sano
Stevens <i>et al.</i>	32/M	EHNM	-/F	E N-id	SP	SMD	45,XX,-7	9,9	Sano
Jacobs <i>et al.</i>	10/M	LLA	-/M	E N-id	MO	LMA	t(9;11)(p22;q23)	48	Sano
Inoue <i>et al.</i>	32/F	LMA	-/M	SCU	SCU	LMA	-	15	-
Inoue <i>et al.</i>	30/M	LCH	-/F	SCU	SCU	LMA	MLL+	16	-
Mitsui <i>et al.</i>	41/M	LLA	-/F	SCU	SCU	SMP	46, XX,t(7;11)(p15;p15)	9	Sano
Murata <i>et al.</i>	49/M	LMA	52/M	E N-id	SP	LMA	46,XY	27	<i>Exitus</i>
Hamaki <i>et al.</i>	31/M	LH	-/F	SCU	SCU	LMA	45,XX,add(4)(q31.1),der(6)t(6:7)(p23;q11.2),-7,del(11)(q23)	16	<i>Exitus</i>
Igarashi <i>et al.</i>	50/M	MM	-/M	NE-id	MO	LLA	46,XY	72	<i>Exitus</i>
Glasser <i>et al.</i>	42/F	LMA	53/M	E N-id	MO	LMA	46,XY,inv(3)(q21q26) // 45,XY,idem,-7	22	<i>Exitus</i>
Konuma <i>et al.</i>	34/M	LLA	-/M	SCU	SCU	SMD	45,XY,del(6q),-7	10	<i>Exitus</i>

Wiseman <i>et al.</i>	34/F	Sar.M	37/M	NE-id	MO	LMA	45,XY,-7	27,8	<i>Exitus</i>
Crow <i>et al.</i>	3/F	LMA	-/M	SCU	SCU	LMA	45,XY,-7	14,5	<i>Exitus</i>
Castleton <i>et al.</i>	32/F	LMC-FC	-/M	SCU	SCU	LMA	44,XX,-7,der(17),t(17;21)(p1?3;?),-21	17	<i>Exitus</i>
Hyun <i>et al.</i>	35/M	LMA	-/F	E-id	-	Sar. M	-	57	<i>Exitus</i>
Shono <i>et al.</i>	31/F	LLA	-/F	SCU	SCU	LLA	46,XX	7	Sano
Xiao <i>et al.</i>	36/M	LMA	-/F	E N-id	SP	LMA	45,XX,der(15;22)(q10;q10)	13	-
Gustafsson <i>et al.</i>	10/M	EHNM	-/F	SCU	SCU	LMA	46,XX,del(5)(q13q33)/46,XX,der(9)t(9;11)(q32;q3?)	24	<i>Exitus</i>
Yamazaki <i>et al.</i>	58/F	SMD	-/M	SCU	SCU	LMA	47,XY,+10,add(10)(p11.2)	14	<i>Exitus</i>
Wang <i>et. al</i>	58/M	LMC-FC	-/F	NE-id	SP	LMA	46,XX	193	<i>Exitus</i>
Wang <i>et. al</i>	53/M	SMD	-/M	E-id	SP	SMD	45,XY,-7	82	Sano
Wang <i>et. al</i>	58/M	LMC-FC	-/F	E-id	SP	SMD	46,XX,del(20q)	22	Sano
Wang <i>et. al</i>	55/M	SMD	-/M	SCU	SCU	SMD	-	6	Sano
Wang <i>et. al</i>	66/F	LMC-FC	-/M	E-id	MO	SMD	45,XY,-7	166	Sano
Wang <i>et. al</i>	44/M	LLA	-/F	E-id	MO	SMD	46,XX,del(7)(q22q32)	26	Sano
Wang <i>et. al</i>	22/F	LLA	-/M	SCU	SCU	SMD	45,XY,-7	5	Sano
Wang <i>et. al</i>	70/M	LMA	-/F	E-id	MO	SMD	46,XX,del(5)(q13q31)	1	Sano
Wang <i>et. al</i>	19/F	LMC-FC	-/M	NE-id	MO	LLC	46,XY,del(20)(q11.2q13.1)	166	Sano
Koppelle <i>et al.</i>	64/M	LMA	-/F	E-id	-	LMA	Cr.7 alteraciones	96	<i>Exitus</i>
Diamond <i>et al.</i>	54/F	LMA	-/F	E-id	-	LMA	46,XX	10	<i>Exitus</i>
Washburn <i>et al.</i>	22/M	-	-/M	NE-id	-	LLA	-	15	-
Washburn <i>et al.</i>	1/F	-	-/F	E-id	-	LMA	-	14	-
Washburn <i>et al.</i>	24/M	-	-/M	SCU	SCU	LMA	-	40	-
Washburn <i>et al.</i>	20/M	-	-/M	NE-id	-	LMA	-	5	-
Washburn <i>et al.</i>	26/M	-	-/F	SCU	SCU	LMA	-	10,5	-
Washburn <i>et al.</i>	26/M	-	-/M	SCU	SCU	LLA	-	3,5	-

Cotter <i>et al.</i>	26/M	LLA	-/M	SCU	SCU	SMD	44,XY,- 3,del(4)(q23q33),der(5;17)(p10;q10),- 7,t(8;22)(p21;q13)	47	Sano
Chonobayashi <i>et al.</i>	48/F	LNH	-/F	SCU	SCU	LMA	46,XX	18	Sano
Jimenez <i>et al.</i>	29/F	LMA	-/F	E-id	MO	LMA	del 11q23	204	Sano
Ho <i>et al.</i>	-/M	MM	-/M	E-id	SP	LMA	CC	120	-
Chan <i>et al.</i>	57/F	MM	-/M	E-id	-	LLA	43-46,XY,add(3)(p13),add(4)(q33),-8,-9 45,XY-7 //	72	Exitus
Chan <i>et al.</i>	49/M	MM	-/M	E-id	-	LLMA	46,XY,del(3)(q25),del(7)(q31q33)	108	-
Otero <i>et al.</i>	23/M	EHNM	-/F	E-id	MO	LMA	45,XX,-7	34	Exitus
Yasuda <i>et al.</i>	47/M	LMA	-/M	E-id	SP	LMA	-	27	-
Luber <i>et al.</i>	56/M	LMA	-/F	E	-	LMA	48,XX,+8,+11	30	Sano
Lee <i>et al.</i>	18/F	EHNM	-/M	E-id	MO	LLA	CC	36	Exitus
Walshouser <i>et al.</i>	56/M	SMD	-/F	E-id	MO	Sar. M	-		Exitus
Wisniewska <i>et al.</i>	0.6/M	LMMJ	-/F	SCU	SCU	SMD	45,XX,-7	2	-
Wisniewska <i>et al.</i>	18/M	SMD	-/F	E-id	MO	SMD	45,XX,-7		-
Dickson <i>et al.</i>	42/F	LMA	54/M	E-id	MO	LMA	47,XY,+11	168	Sano
Hamdi <i>et al.</i>	58/F	LNH	-/M	E-id	SP	LMA	46,XY,r(7)(p13q11.2),del(12)(p13)	52	-
Hamdi <i>et al.</i>	54/M	LNH	-/F	NE N-id	-	SMD	46,XX,r(7)(p21q11.2)	37	-
Dimitriu <i>et al.</i>	44/F	SMD	-/M	SCU	SCU	LMA	CC	32	-
Shiozaki <i>et al.</i>	52/M	LMA	-/F	SCU	SCU	LMA	46,XX,r(7)(p10p22)	24	Exitus
Bigliardi <i>et al.</i>	45/M	LMA	52/M	E-id	MO	LLA	CC	95	-
Wang <i>et al.</i>	52/M	SMD	-/F	E-id	SP	LMA	46,XX,t(15;17)	36	Exitus
Kurosawa <i>et al.</i>	21/M	LMC-FC	-/M	E-id	MO	LLA	46,XY t(9;22)	300	Exitus
Ruíz-Delgado <i>et al.</i>	3/M	LLA	1/M	E-id	-	LLA	-	6	Exitus
Ruíz-Delgado <i>et al.</i>	6/F	LLA	16/F	E-id	-	LLA	-	16	Sano
Ruíz-Delgado <i>et al.</i>	36/F	LLA	35/M	E-id	SP	LLA	-	1	Exitus
Ruíz-Delgado <i>et al.</i>	9/F	LLA	3/M	E-id	-	LLA	-	10	Exitus

Ruíz-Delgado <i>et al.</i>	16/F	LLA	12/F	E-id	-	LLA	-	32	<i>Exitus</i>
Ruíz-Delgado <i>et al.</i>	23/M	LLA	33/M	E-id	-	LLA	-	9	Sano
Hayes <i>et al.</i>	41/M	LLA	-/-	SCU	SCU	LMA	-	17,2	<i>Exitus</i>
Arnautou <i>et al.</i>	38/M	LMA	-/-	SCU	SCU	SMD	CN	32	-
Arnautou <i>et al.</i>	60/F	LMA	-/-	SCU	SCU	LMMC	-7	14	-
Bobadilla-Morales <i>et al.</i>	9/M	LMA	-/F	E-id	MO	LMA	47,XX,+10 // 47,XX,+11 // 48,XX,+10,+11	68	<i>Exitus</i>
Hindilerden <i>et al.</i>	51/F	LMA	-/M	E-id	SP	LMA	46,XY	6	<i>Exitus</i>
Brito <i>et al.</i>	48/M	MM	-/M	E-id	SP	LMC	46,XX,del(1)(p36),der(9)t(1;9)(p36;q34), der(22)t(9;22)(q34;q11.2)add(9)(q34)	3	Sano
Liu <i>et al.</i>	28/F	LLA	33/M	NE-id	SP	LMA	46,XY	20	-
Suárez-González <i>et al.</i>	43/F	LLA	-/F	SCU	SCU	LMA	46,XX,	16	<i>Exitus</i>
Hirsch <i>et al.</i>	54/M	LMA	-/M	SCU	SCU	LMA	48,XY,+6,der(13)t(13;?)(p11;?),+21	20	-
Gondek <i>et al.</i>	-/F	LMA	68/F	Haplo	SP	LMA	46,XX	36	-
Gondek <i>et al.</i>	-/-	LNH	61/F	Haplo	MO	SMD	-7	18	-
Maestas <i>et al.</i>	41/F	LMC-FC	-/M	E-id	-	MM	46,XY,t(4;14)	24	Sano
Hongbing <i>et al.</i>	25/M	EHNM	28/M	E-id	SP	LMA	47,XY,t(8;21),+8	30	Sano
Kobayashi <i>et al.</i>	49/M	SMD	-/M	E-id	MO	LMA	-	17	Sano
Herold <i>et al.</i>	43/M	LLC	54/F	E-id	-	LMA	46,XX	88	Sano

Abreviaturas: M: Masculino, F: Femenino, LLA: leucemia linfoblástica aguda, LMA: Leucemia mieloide aguda, LMC-FC: Leucemia mieloide crónica *BCR-ABL1* positiva-fase crónica, EHNM: Enfermedad hematológica no maligna, SMD: Síndrome mielodisplásico, LNH: Linfoma No-Hodgkin, LMC-CB: Leucemia mieloide crónica *BCR-ABL1* positiva-crisis blástica, MM: Mieloma múltiple, LMMJ: Leucemia mielomonocítica juvenil, HCL: Histiocitosis de células de Langerhans, LH: Linfoma Hodgkin, LLC: Leucemia linfocítica crónica, Sar. M: Sarcoma mieloide, LALM: Leucemia aguda de linaje mixto, E-id: Emparentado idéntico, NE-id: No emparentado idéntico, E N-id: Emparentado no-idéntico, NE N-id: No emparentado no-idéntico, E: Emparentado, Haplo: Haploidentico, MO: Médula ósea, SP: sangre periférica, SCU: sangre de cordón umbilical, CN: Cariotipo normal, CC: Cariotipo complejo. Pronost: Pronóstico.



Donor Cell–Derived Hematologic Neoplasms after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review



Julia Suárez-González^{1,2}, Carolina Martínez-Laperche^{2,3,*}, Mi Kwon^{2,3}, Pascual Balsalobre^{2,3}, Diego Carbonell^{2,3}, María Chicano^{2,3}, Gabriela Rodríguez-Macías³, David Serrano^{2,3}, Jorge Gayoso^{2,3}, José Luis Díez-Martín^{2,3,4}, Ismael Buño^{1,2,3}

¹ Genomics Unit, Gregorio Marañón General University Hospital, Gregorio Marañón Health Research Institute, Madrid, Spain

² Department of Translational Oncology, Gregorio Marañón Health Research Institute, Madrid, Spain

³ Department of Hematology, Gregorio Marañón General University Hospital, Madrid, Spain

⁴ Department of Medicine, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Article history:

Received 17 November 2017

Accepted 25 January 2018

Key Words:

Donor cell–derived neoplasm

Donor cell leukemia

Donor cell–derived hematologic malignancy

Leukemogenesis

Allo-SCT

Systematic review

A B S T R A C T

Development of de novo hematologic malignancies in donor cells after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) provides a useful in vivo model to study the process of leukemogenesis. A systematic analysis of the cases reported in the literature was performed to identify risk factors and mechanisms involved in the pathogenesis of donor cell–derived hematologic neoplasms (DCHN) and leukemogenic transformation. Relevant data were extracted from 137 cases. Cases of DCHN show a wide heterogeneity with regard to recipient/donor age, sex mismatch, and conditioning regimen. Some characteristics, such as the type of primary disease, the type of hematologic malignancy of the DCHN, and the stem cell source used in the transplant procedure, differ from those expected. Mechanisms involved in the pathogenesis of DCHN are complex, and several hypotheses have been proposed, such as pre-existing hematologic neoplasms or premalignant clones in the donor, decreased immune surveillance, and damage to bone marrow microenvironment in the recipient. Most likely several if not all these mechanisms play a role in DCHN development. Novel approaches, such as next-generation sequencing to study consecutive samples after allo-SCT in these patients, appear to be promising to decipher the mechanisms of leukemogenesis.

© 2018 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT) is an established treatment option for several malignant and nonmalignant hematologic disorders. Over the past decades numerous advances in the understanding of transplantation biology, refinement of conditioning regimens, and management of graft-versus-host disease (GVHD) and infections have improved the outcome of the procedure [1]. Nevertheless, a significant proportion of patients develop serious complications such as GVHD, infections, or relapse. Indeed, the most frequent cause of post-transplant mortality is disease relapse [2], in which the original disease recurs from outgrowth of residual cells having evaded eradication. On the other hand, the development of de novo hemato-

logic malignancies from cells of donor origin, the so-called donor cell–derived hematologic neoplasms (DCHN), is a rare, but severe complication.

Since the first case of DCHN was published by Fialkow et al. in 1971 [3], several cases have been reported in the literature. Although the actual incidence of DCHN is unknown, it has been reported to be 1.2% by Boyd et al. [4], .84% by the Tokyo Cord Blood Bank [5], .12% by the European Society for Blood and Marrow Transplantation [6], and .13% by the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation [7].

Mechanisms and risk factors involved in the pathogenesis of DCHN remain largely unknown. Some authors have proposed the presence of a malignant clone in the donor as the underlying mechanism. This hypothesis has been demonstrated in some cases in which donor and recipient developed leukemias with similar morphologic and immunophenotypical characteristics [8–14]. Another hypothesis is based on the existence in the donor of an inherited or acquired genetic predisposition to develop hematologic malignancies, and the acquisition of somatic mutations in a premalignant graft would produce a malignant transformation

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 1512.

* Correspondence and reprint requests: Carolina Martínez-Laperche, PhD, Hematological Genetics Laboratory, Department of Hematology, Gregorio Marañón General University Hospital, Gregorio Marañón Health Research Institute (IISGM), C/ Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid.

E-mail address: cmlaperchehgugm@gmail.com (C. Martínez-Laperche).

<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.01.033>

1083-8791/© 2018 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

in the recipient niche [15,16]. It is currently known that after allo-SCT, there are vigorous proliferative demands on the transplanted cells; a rapid proliferative rate often correlates with a higher likelihood of replication error or mutation. A preleukemic mutation may occur, and with ensuing immunosuppression and impaired immune surveillance, it may more readily result in hematologic neoplasms [17]. Furthermore, perturbations within the host bone marrow (BM) microenvironment after multiple rounds of chemotherapy or bystander radiation may contribute to damaged niche structures, and disturbances in the cross-talk between niche and the hematopoietic stem cells could contribute to leukemogenesis [18,19]. Additional mechanisms are also proposed such as viral transfection, transfer of oncogenic material from host to donor cells or telomere shortening as a consequence of proliferative stress, and potential contributor to increased replication errors and mutations after SCT [20–23].

The aim of this study was to identify common features and provide insights into the etiology and pathogenesis of leukemogenic transformation of donor cells. We performed a systematic analysis and evaluation of the DCHN cases reported in the literature considering the main characteristics of patients and donors; type of primary disease; transplant features such as conditioning regimen, donor type, and stem cell source used; DCHN type and their molecular and cytogenetics features; and patient and donor outcomes.

METHODS

A literature search was carried out to identify cases of DCHN defined as hematologic malignancy in donor cell origin. PubMed and Embase databases were searched for the following terms: "donor cell leukemia," "donor cell origin leukemia," and "donor cell-derived leukemia" to identify all citations from January 1971 through March 2017 describing cases of DCHN. Bibliographies of retrieved citations were also examined to manually complement the initial search. All DCHN cases reported in English were included in the study provided minimum requirements were met, that is, well-documented donor cell origin of a de novo neoplasia through conventional cytogenetics, fluorescent in situ hybridization and/or molecular techniques (short tandem repeats or variable number of tandem repeats), and information available on the type of hematologic malignancy derived from donor cells.

Relevant data including recipient and donor features (age, sex), primary hematologic disease, status pretransplant, stem cells source (cord blood [CB], BM, peripheral blood [PB]), type of donor (matched/mismatched related, matched/mismatched unrelated, haploidentical, CB), conditioning regimen (myeloablative, nonmyeloablative), post-transplant complications (GVHD, infections), type of donor cell-derived hematologic malignancy, cytogenetic of primary disease and DCHN, method used for chimerism analysis, treatment of DCHN, and donor and patient outcomes were extracted independently (Table 1).

The description of the cases was highly heterogeneous, so the number of patients for which data were available is different for each feature considered. The denominators for the percentages and the number of cases cited throughout the text correspond to the number of cases for which that particular feature was reported. Quantitative variables were expressed as median or mean and range, whereas qualitative variables were expressed as frequency and percentage. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests were used to identify differences in the time from allo-SCT to DCHN onset according to the stem cell source used (CB, PB, BM), type of DCHN (acute lymphoblastic leukemia [ALL], acute myeloid leukemia [AML], and myelodysplastic syndrome [MDS]), and donor age. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 21.0 (SPSS Inc, Armonk, NY), and a $P < .05$ was considered to be significant.

RESULTS

Initial PubMed and Embase searches retrieved 574 nonduplicate publications, and the manual search added 31 additional articles (Figure 1). After excluding publications that did not meet the minimum requirements established, 101 publications published from 1971 to March 2017 reporting a total of 137 cases of DCHN were selected for systematic review (Supplementary Information S11 and S12).

Table 1
Characteristics of Allo-SCT in DCHN Patients

Characteristics	All Patients		Patients Aged ≤16 Years	
	No. of Cases	Values	No. of Cases	Values
Recipient age, yr	133		31	
Median (range)		32 (.5–70)		6 (.5–16)
>16		102 (77)		—
≤16		31 (23)		—
Recipient sex	136		31	
Male		73 (54)		13 (42)
Female		63 (46)		18 (58)
Donor age, yr	35		14	
Median (range)		33 (1–68)		11.5 (1–45)
CB	29		5	
Donor sex	133		31	
Male		68 (51)		15 (48)
Female		65 (49)		16 (52)
Gender mismatched	133		31	
		81 (60)		20 (64)
Primary disease	131		30	
AML		33 (25.1)		6 (20)
ALL		30 (23)		13 (43.4)
CML-CP		21 (16)		1 (3.3)
NMHD		12 (9)		6 (20)
MDS		10 (8)		0 (0)
NHL		7 (5)		0 (0)
MM		6 (4.5)		0 (0)
CML-BC		5 (4)		1 (3.3)
JMML		2 (1.5)		2 (6.7)
LCH		2 (1.5)		1 (3.3)
CLL		1 (.8)		0 (0)
HL		1 (.8)		0 (0)
Granulocytic sarcoma		1 (.8)		0 (0)
Conditioning regimen	88		24	
MA		57 (65)		18 (75)
NMA		31 (35)		6 (25)
Donor type	136		31	
Matched related		80 (59)		22 (71)
CB		29 (21)		5 (17)
Matched unrelated		12 (9)		1 (3)
Mismatched related		9 (6.5)		2 (6)
Mismatched unrelated		4 (3)		1 (3)
Haploidentical		2 (1.5)		0 (0)
Stem cell source	118		26	
BM		65 (55)		19 (73)
CB		29 (25)		5 (19)
PB		24 (20)		2 (8)
Total body irradiation	85		20	
Yes		57 (67)		14 (70)
No		28 (33)		6 (30)

Number of cases are those with reported data for each feature. In each case the difference between 137 (total number of cases included in the study) and the number shown equals the number of missing values. Values are n (%) unless otherwise defined. CML-CP indicates chronic myelogenous leukemia-chronic phase; NMHD, nonmalignant hematologic disorders; NHL, non-Hodgkin lymphoma; CML-BC, chronic myelogenous leukemia-blast crisis; MM, multiple myeloma; JMML, juvenile myelomonocytic leukemia; LCH, Langerhans cell histiocytosis; HL, Hodgkin lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; MA, myeloablative; NMA, nonmyeloablative.

Although it is not possible to calculate the actual incidence of DCHN from a systematic review because it does not account for all transplants performed during the time period of the reported cases, even estimations would be cumbersome because the number of cases reported has increased over the years, especially from 2000, the date from which 83% of cases have been published (Figure 2). The actual incidence of this complication has been estimated to be around .12% to .13% in 2 large surveys [6,7]. Moreover, early significant relapse and mortality after allo-SCT would lead to underestimation of its occurrence.

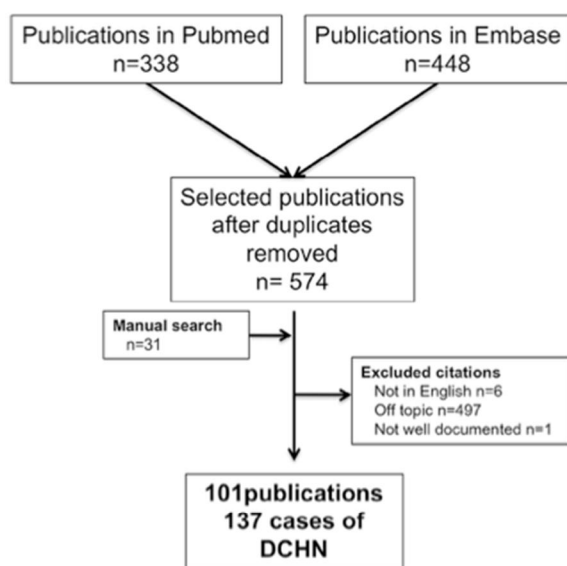


Figure 1. Search process for DCHN publications and cases.

Main Features of DCHN Cases

The median age of primary disease at diagnosis was 32 years, and most patients had been diagnosed with AML (25%, 33/131) or ALL (23%, 30/131) (Table 1). Stem cell source was BM in most cases (55%, 65/118), followed by CB (25%, 29/118). The most frequent donor type was matched related donor (59%, 80/136) (Table 1).

Children (≤ 16 years) represented 23% (31/133) of the patients reported, with a median age of 6 years (range, .5 to 16) at diagnosis of primary disease. ALL was diagnosed in 43% of children (13/30) as primary disease, and BM was used as

stem cell source in most cases (73%, 19/26) (Table 1). In addition to the 29 cases described in which CB was used as stem cell source, 35 cases reported the age of the donor used, which was distributed between 1 and 68 years (Figure 3).

The standard methotrexate and/or cyclosporine was used as GVHD prophylaxis in 87 of 93 cases, and only 2 cases reported the use of post-transplant cyclophosphamide. Regarding post-SCT complications, 63% (59/94) developed GVHD and 71% (27/38) presented infectious events post-transplant.

Median time from allo-SCT to DCHN diagnosis was 26 months (range, 1 to 312). Interestingly, when patients were categorized into 3 groups according to stem cells source used, median time to DCHN diagnosis was 15 months (range, 2 to 47) for CB, 24 months (range, 1 to 193) for PB, and 36 months (range, 1 to 312) for BM. The difference between CB versus BM or PB was statistically significant (CB versus BM versus PB, $P = .008$; BM versus PB, $P = .5$; PB versus CB, $P = .04$; and BM versus CB, $P = .002$).

Most DCHN were AML (50%, 69/137), ALL (23%, 32/137), or MDS (20%, 27/137), encompassing together 93% (128/137) of all cases reported (Figure 4). The median of time to DCHN onset in these 3 groups was similar: 20.5 months (range, 1 to 300) for ALL, 28.9 months (range, 1 to 204) for AML, and 29 months (range, 1 to 312) for MDS ($P = .9$). The median time to donor cell-derived chronic lymphocytic leukemia (155 months [$n = 2$]) or non-Hodgkin lymphoma (90 months [$n = 1$]) development was much longer.

The age of the donor did not have any impact on the time to DCHN ($P = .2$). DCHN was different from the original disease for which the SCT was indicated in 67% of cases (88/131) (Figure 4).

The current series included 114 cases for which karyotype information was available, and 28% of patients (32/114) with DCHN showed a normal karyotype and 72% (82/114) showed an abnormal karyotype, which included

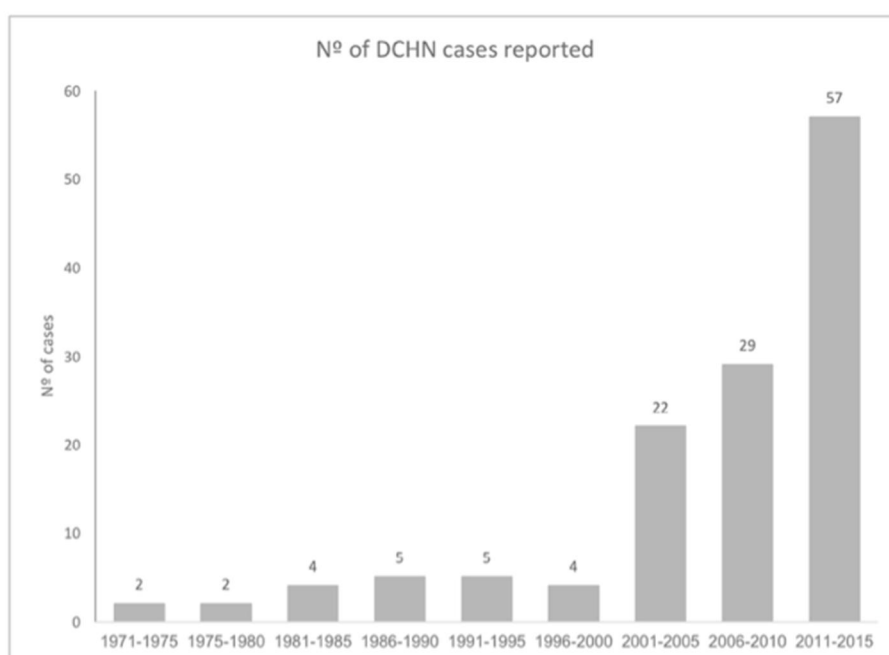


Figure 2. Number of DCHN cases reported over time.

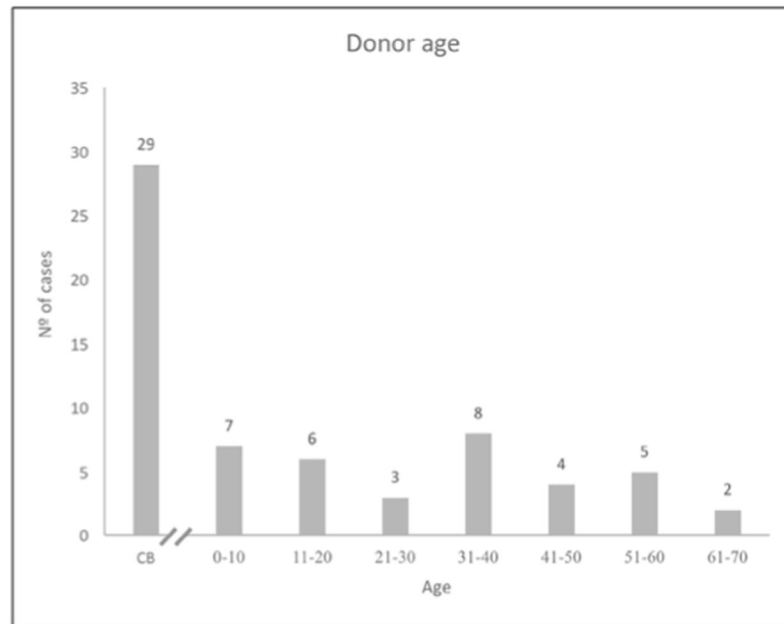


Figure 3. Donor age.

deletions, balanced chromosomal translocations, unbalanced chromosomal translocations, chromosome gains/losses, and complex karyotypes. The most recurrent cytogenetic abnormalities involved chromosome 7 (31/114), complex karyotype (10/114), and chromosome 11q23 *MLL* rearrangements (8/114).

Among the cases of donor cell-derived MDS, karyotype information was available in 26 of 27 MDS cases, a high proportion had alterations in chromosome 7 (61%, 16/26), and such abnormalities were only present in some (22%; 13/60 donor cell-derived AML cases [in 9 donor cell-derived AML cases karyotype information was not available]) donor cell-derived AML phenotypes (Figure 5, Supplementary Information S11).

Health Status of the Donors at DCHN Diagnosis

The status of the donor at the moment of DCHN diagnosis in the recipient was reported in 73 cases: 62 donors (85%) were healthy, 9 donors (12%) had developed hematologic malignancies, and 2 donors (3%) had nonhematologic cancers (breast cancer and bronchogenic carcinoma). Only a handful of DCHN cases reported (11/137) [11,12,15,16,24–29] included detailed molecular studies in both donors and recipients (Table 2). Interestingly, in these cases at least 1 of the mutations detected in leukemic cells at the moment of DCHN diagnosis was also found in the donor. However, only 2 of these donors developed a hematologic malignancy. In addition, in 7 other cases in which the donor developed a hematologic malignancy but molecular studies were not performed, the type of hematologic malignancy (3 AMLs, 1 ALL, 1 chronic lymphocytic leukemia, 1 lymphoma, and 1 multiple myeloma) was identical in both donors and recipients.

Patient Outcomes

At the time the reports were published, 44% of patients (46/104) were alive and 56% (58/104) had died from different causes, mainly from DCHN progression (43%, 25/58) and

severe cytopenias that ensued after chemotherapy, sepsis, or complications derived from a second allo-SCT. The median follow-up time in alive patients, only reported in 14 of 46 cases, was 8 months (range, 1 to 98). The time between the emergence of DCHN and death was reported in 30 of 58 cases at a median of 10.6 months (range, 1 to 263).

Most patients initially received induction chemotherapy, and in 22 cases a second allo-SCT was carried out, 4 of which were from the same donor. Eleven patients died because of retransplant toxicity or disease progression, and 11 were alive when the report was published, including those 4 patients who received a second transplant from the same donor.

DISCUSSION

We performed an analysis and evaluation of DCHN cases reported in the literature to identify risk factors and common mechanisms involved in this pathology. Although this is a rare complication, several cases have been reported over the years, most of them recently, which may be because of the increasing worldwide allo-SCT activity. Indeed, the number of allo-SCT carried out in Europe from the year 2000 is 4 times higher than the number of transplants carried out in previous years [30–52]. In the same way, further advances in chemotherapy, both induction and salvage therapies, management of GVHD and infections, have improved the safety of the procedure and the clinical outcome in patients, increasing the overall survival and therefore increasing the possibility of developing DCHN. Additionally, molecular techniques used for chimerism evaluation after allo-SCT have improved substantially in recent years, providing a better detection of cellular origin. Even so, the incidence of DCHN is difficult to calculate because the number of cases reported by centers is extremely low. The occurrence of this complication might be calculated through a multicenter registry, in which cases of DCHN with a median follow-up of 2 years among the total

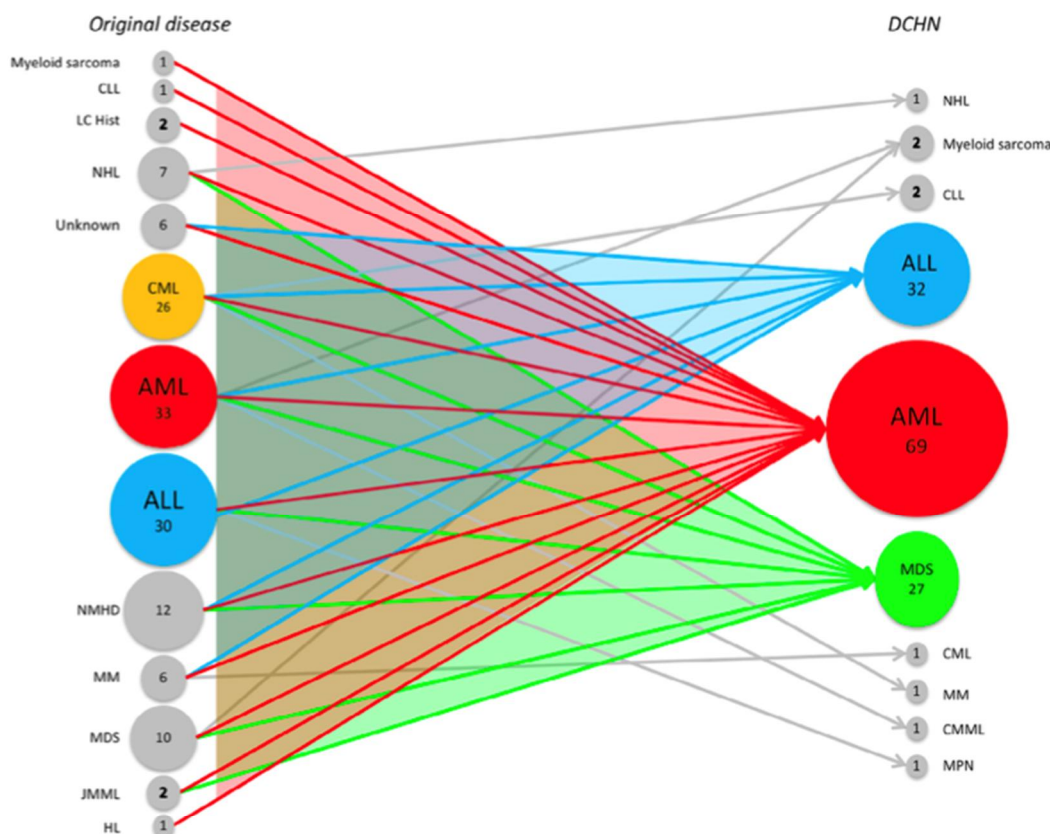


Figure 4. Primary disease of recipient (n = 131) and type of DCHN (n = 137). Hematologic diseases that took place in donor cells in NHL were 4 AML, 2 MDS, and 1 NHL; in cases of allo-SCT for CML were 12 AML, 6 MDS, 5 ALL, 2 CLL, and 1 MM; in cases of allo-SCT for AML were 20 AML, 4 MDS, 3 ALL, and 1 CMML; in cases of allo-SCT for ALL were 16 ALL, 8 AML, 5 MDS, and 1 MPN; in case of allo-SCT for NMHD were 4 AML, 4 MDS, and 2 ALL; in case of allo-SCT for MM were 2 ALL, 2 AML, and 1 acute mixed lineage leukemia (AMLL); and in case of allo-SCT for MDS were 4 MDS, 3 AML, and 1 myeloid sarcoma. CLL indicates chronic lymphocytic leukemia; LC Hist, Langerhans cell histiocytosis; NHL, non-Hodgkin lymphoma; CML, chronic myelogenous leukemia; NMHD, nonmalignant hematologic disorders; MM, multiple myeloma; JMML, juvenile myelomonocytic leukemia; HL, Hodgkin lymphoma; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; MPN, myeloproliferative neoplasm.

of procedures are recorded, censoring those patients who relapse or die in the first 2 years.

Patients who develop DCHN show a wide heterogeneity with regard to recipient and donor age and sex, sex mismatch, and conditioning regimen according to the patient population who receive an allo-SCT. Within the limitations of a systematic review of reported cases some characteristics, such as the type of primary disease and the type of donor cell-derived hematologic malignancy, differ from those expected, compared with the status of allo-SCT in Europe and affiliated countries described by the European Society for Blood and Marrow Transplantation from 1990 to 2014 [30–52]. There also appears to be a disproportionately high number of CB transplants.

Regarding the type of primary disease, there seems to be an increased number of patients diagnosed with ALL and chronic myelogenous leukemia-chronic phase (transplanted before the advent of the tyrosine kinase inhibitor era). Of note, the elevated number of patients diagnosed with ALL could not be explained by the existence of a high number of pediatric patients in this cohort (Table 1). Inherited genetic predisposition has been suggested for ALL [53], especially in pediatric cases. Possibly, apparently healthy related donors

shared predisposing traits that would lead to leukemic transformation within the transplanted patient.

Considering the type of hematologic malignancy of the DCHN, most cases were acute leukemias (AML, ALL), and myeloid malignancies are more frequent than lymphoid malignancies (Figure 4). Mutations in stem/progenitor cells, both harbored in donor cells or arising de novo after transplantation because of replicative stress, therapy-induced residual BM injury, diminished immune surveillance, and so on, would disrupt normal cell function, causing clonal expansion and initiate leukemia development. Moreover, these diseases are known to require a lower number of driver mutations (8 in AML and 11 in ALL), which would account for the relatively short time between transplantation and DCHN, compared with other hematologic cancers (eg, 74 in non-Hodgkin lymphoma) [54] that take a longer time after transplantation to appear.

Interestingly, the most common cytogenetic alteration observed in the cases reported was the complete or long arm deletion of chromosome 7. This alteration, together with anomalies of chromosome 5 or complex karyotype, is recurrently (>70%) detected in therapy-related myeloid neoplasms [14]. Several types of therapy (mutagen)-related MDS/AML

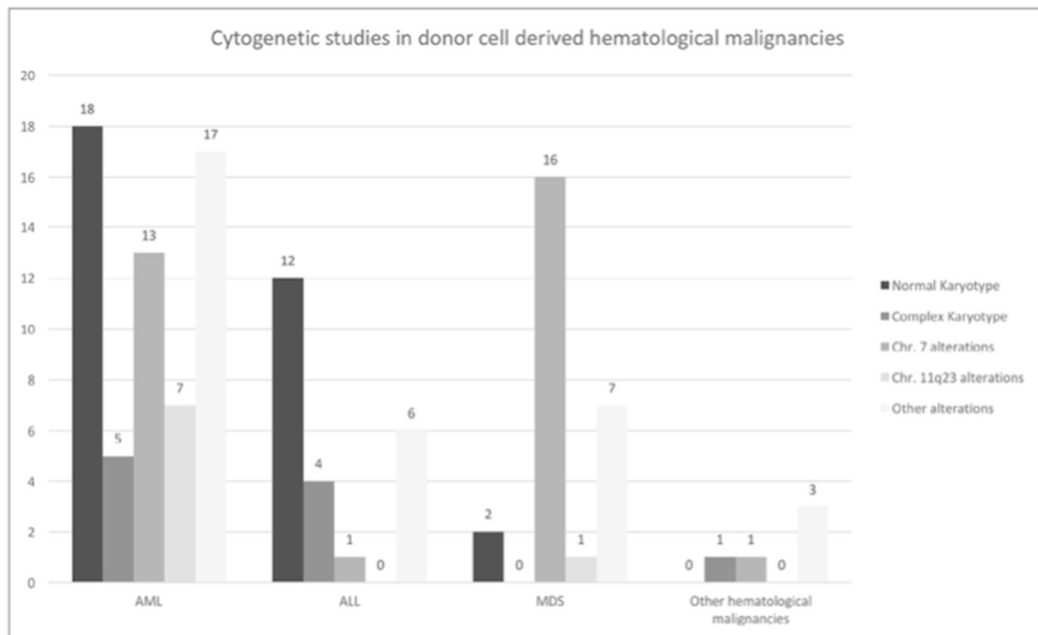


Figure 5. Cytogenetic studies in DCHN cases.

have been identified associated with exposure to alkylating agents, radiation, and selected carcinogens [15]; therefore, at least some cases of DCHN could be derived from the existence of a therapy-induced residual or long-term BM injury in recipient after the recovery from acute myelosuppression.

Also, in the cases reported there seemed to be a greatest proportion of CB as stem cell source for the transplant, followed by BM and PB. Moreover, Kato et al. [7] have recently shown that CB was a risk factor for DCHN compared with other stem cell sources, because they observed an incidence of DCHN after CB transplantation significantly higher than the incidence of DCHN after BM and PB transplantation. CB grafts are known to contain more immature stem cells and significantly lower cell doses than BM and PB grafts, features that may affect immune reconstitution after allo-SCT [21] and decreasing immune surveillance in the transplanted patient. The immune system spots and destroys altered cells with the potential to become cancerous. Immunocompetent and malignant cells often coexist in a dynamic equilibrium, and the complex interaction between growing tumors and the immune system may determine the course of disease. In those cases in which immune surveillance is decreased, the risk of development DCHN would be increased. Also, increased proliferative demand of a smaller starting number of stem cells after CB grafts may contribute to higher incidence of DCHN in this group because a replication stress during marked hematopoietic stem cell expansion may lead to higher likelihood of mutation [55].

Neoplasia arising in cells of donor origin have also been described after solid-organ transplantation, and donor-related malignancy can be due to either direct transmission of tumor or tumor developing in cells of donor origin. In some cases in which tumor was arising in donor cells, it has been attributed to the immunosuppressive therapy administered to such patients [56]. In addition, in the cases reported, DCHN appears earlier in patients transplanted with CB (15 months)

than with BM (24 months) or PB (36 months), which suggests that early engraftment and host immune status could be relevant in the process of leukemogenesis. Notably, the period in which donor stem cells become leukemogenic (median, 26 months) is longer than the median time of leukemia relapse, which occurs mainly in the first 18 months from diagnosis, usually consisting of a resistant clone that has not been removed by chemotherapy or the graft-versus-leukemia effect [57]. Therefore, this suggests that even assuming early lesions pre-existing in donor stem cells, additional lesions are required for the development of DCHN.

Although most donors from the cases reported here were healthy (85%), in those cases in which the donor also developed a hematologic malignancy, the type of hematologic neoplasia observed in the DCHN was the same as that identified in the recipient, which suggests a common origin of the disease. In this review 2 donors diagnosed with hematologic malignancies (AML) were studied by molecular techniques, and both showed leukemic mutations in a pre-allo-SCT sample (Table 2). Detailed molecular studies were also performed in both donors and recipients in another 8 cases, and at least 1 mutation detected in leukemic cells at the moment of DCHN diagnosis was also found in the donor. This observation implies that inherited or acquired genetic predisposition alterations in the donor might be more frequent than previously suspected [58]. Nevertheless, donors with such alterations are not destined to develop hematologic neoplasms because other genetic or environmental factors, which are usually altered in transplanted patients, play an important role in the development of malignant disease. On the other hand, donors may harbor preleukemic mutations that do not result in DCHN in the recipient.

It could be argued whether it is worth testing the existence of germline mutation in the donor to avoid the inadvertent use of stem cells from donors carrying a mutation in a malignancy predisposing gene (such as *CEBP α* ,

Table 2

Molecular Studies Performed in DCHN Cases

	DCHN Type	DCHN Mutation	Pre-Allo-SCT Donor Sample	Donor Status (Time of Follow-Up)	Mutations in Donors with Hematologic Malignancy	Molecular Technique
Xiao et al. 2011 [15]	AML	<i>CEBPα</i> (c.147dupC, c.584_589dup(*), c.914_916dup)	<i>CEBPα</i> (c.584_589dup(*))	Healthy (13 months)		Sanger sequencing (<i>FLT3-TKD</i> , <i>NRAS</i> , <i>CEBPα</i> , <i>NPM1</i>) and agarose gel electrophoresis (<i>FLT3-ITD</i> , <i>MLL-PTD</i>) RFLP (<i>XPA</i> , <i>XPD</i> , <i>XRCC1</i> , <i>XRCC3</i> , <i>RAD51</i>) WGS
Diamond et al. 2011 [24]	AML	<i>XPD</i> , <i>XRCC3</i>	<i>XPD</i> , <i>XRCC3</i>	Healthy (10 months)		
Ho et al. 2012 [25]	AML	<i>SALL1</i> , <i>UGT1A5</i> , <i>SPEG</i> , <i>TMC6</i> , <i>SCN3A</i> , <i>MYH10</i> , <i>RAVER1</i> , <i>WNT7A</i> , <i>APLF</i> , <i>PRPF8</i> , <i>ZNF518B</i> , <i>MKRN3</i>	<i>SALL1</i> , <i>UGT1A5</i> , <i>SPEG</i> , <i>TMC6</i> , <i>SCN3A</i> , <i>MYH10</i> , <i>RAVER1</i> , <i>WNT7A</i> , <i>APLF</i> , <i>PRPF8</i> , <i>ZNF518B</i> , <i>MKRN3</i>	Unknown		
Yasuda et al. 2014 [26]	AML	<i>IDH2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>CCDC168</i> , <i>GAL3ST1</i> , <i>MYO7B</i> , <i>NFATC1</i> , <i>PSMB8</i> , <i>TCAIM</i> , <i>TMEM132A</i> , <i>UBA2</i> , <i>NRAS</i>	<i>IDH2</i> (2,3%), <i>DNMT3A</i> (1,1%)	Healthy (120 months)		WES
Liu et al. 2015 [12]	AML	<i>ASXL1</i>	<i>ASXL1</i>	AML (84 months)	<i>ASXL1</i> , <i>FLT3-ITD</i>	(<i>CEBPα</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ETV6</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>FLT3-TKD</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>NPM1</i> , <i>NRAS</i> , <i>PHF6</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RUNX1</i> , <i>TET2</i> , <i>TP53</i>) 122 gene panel 637 gene panel
Hirsch et al. 2016 [16]	AML	<i>JAK2</i> , <i>EZH2</i> , <i>CHEK2</i> , <i>DSCAM</i> , <i>IKZF1</i>	<i>JAK2</i>	Unknown		
Gondek et al. 2016 [27]	AML	<i>DNMT3A</i> x2, <i>ATM</i> , <i>IKZF1</i> , <i>SETBP1</i> , <i>CSF3R</i> , <i>CITTA</i> , <i>G6PD</i> , <i>CBFB</i> , <i>SIPR2</i> , <i>LIFR</i> , <i>MA2K4</i> , <i>PRDM1</i> , <i>AKAP9</i> , <i>HSP90AA1</i> , <i>TNFAIP3</i> , <i>MAP3K6</i> , <i>ACVR1B</i>	<i>DNMT3A</i> x2, <i>ATM</i>	Healthy (60 months)		637 gene panel
Gondek et al. 2016 [27]	MDS	<i>U2AF1</i> , <i>EP300</i> , <i>MYH9</i> , <i>GUCY1A2</i> , <i>CSMD3</i> , <i>MPL</i> , <i>SETBP1</i>	<i>U2AF1</i> , <i>EP300</i> , <i>MYH9</i>	Healthy (24 months)		637 gene panel
Suarez-Gonzalez et al. 2018 [29]	AML	<i>SH2B3</i> , <i>NRAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>NPM1</i> , <i>CA9</i> , <i>POU4F1</i> , <i>NOTCH1</i>	<i>SH2B3</i>	Unkwon		WES
Kobayashi et al. 2017 [28]	AML	<i>DDX41</i> , <i>CENPN</i> , <i>BRF2</i> , <i>SNAPC4</i> , <i>GAS6</i> , <i>IL32</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>NOTCH3</i> , <i>LFNG</i>	<i>DDX41</i>	Healthy (56 months)		WES
Herold et al. 2017 [11]	AML	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> x2, <i>NPM1</i> , <i>FLT3</i> , +10 somatic mutations	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> x2	AML (90 months)	<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> x2, <i>IDH1</i> , <i>PHF6</i> , <i>CBL</i> , <i>SMC1A</i> +10 somatic mutations	WES

RFLP indicates restriction fragment length polymorphism; WGS, whole genome sequencing; WES, whole exome sequencing. (*):c.584_589dup/ p.His195_Pro196dup variant, today interpreted as a polymorphism.

RUNX1, *GATA2*, *DDX41*, *ANKRD26*, etc.) to prevent DCHN appearance [59]. However, the variable latency and incomplete penetrance characteristic of most of these syndromes suggest that the acquisition of additional somatic mutation is required for hematologic neoplasm initiation and DCHN development [60]. Furthermore, several studies have reported clonal hematopoiesis with somatic mutations in around 10% of elderly study participants, with increasing frequency with age [61–63]. Within this scenario screening older donors, which have an increased risk of harboring occult malignant clones, has also been recommended [64], although most such donors do not progress clinically to a hematologic malignancy.

The existence of a preleukemic clone in donors is important, but it is not enough for the development of overt leukemia. Various transplant-related factors and/or the environment in which stem cells are placed may influence this process of the acquisition of new genetic alterations and promoting clonal expansions. Premalignant clones would proliferate when they were transplanted into a permissive microenvironment, with residual BM injury derived from various cycles of chemotherapy and coexisting with an immature and/or suppressed immune system [65].

Additional mechanisms have been speculated that might influence the appearance of DCHN, such as viral transfection and oncogene integration. Oncogenic viruses or leukemogenic material may be released from residual leukemia cells and directly transfect the genome of donor stem cells [21,66]. Similarly, it has been hypothesized that progressive telomere shortening forced by excessive divisions of hematopoietic stem cells [23] might predict the early onset of clonal hematopoietic disorders in engrafted donor cells [21]. Telomeres play a critical role in the maintenance of chromosomal integrity, and a rapid clonal expansion after an allo-SCT could alter telomere maintenance, resulting in genomic instability. This effect on telomeres may be more prominent in patients who receive stem cells from elderly donors in allo-SCT [23].

Suárez-González et al. [29] reported a case in which a patient diagnosed with ALL developed a donor cell–derived AML 16 months after allogeneic transplantation from an unrelated CB. Whole-exome sequencing in the donor CB and in BM samples from the recipient at different time points after transplantation was performed. This case clearly illustrates some of the different mechanisms that may be involved in the development of this disease. The infusion of CB with preleukemic potential in the context of a post-transplant environment characterized by a decreased immune surveillance and suitable therapy-induced residual BM injury in the recipient resulted in a rapid acquisition of de novo mutations leading to the diagnosis of donor cell–derived AML.

The relative contribution of each of the genetic and transplant-related factors to DCHN is still unknown. Presumably not only a single mechanism is responsible for the leukemic transformation in donor cells but rather combinations of various conditions would contribute to the development of donor cell–derived hematologic malignancies after allo-SCT.

Leukemic transformation of otherwise healthy donor hematopoietic stem cells provides a useful *in vivo* model to study the mechanisms involved in leukemogenesis. Novel approaches based on next-generation sequencing to study consecutive samples after allo-SCT in these patients appear to be promising to decipher the mechanisms of leukemogenesis. Further studies are needed in allo-SCT patients,

including sequential chimerism monitoring, and mandatory identification of the donor or recipient cell origin in the case of relapse is suspected to drive improved identification and characterization of DCHN. Moreover, deeper studies of the donors would allow detection of underlying genetic predisposition and even their leukemogenic potential to understand the incidence of clonal donor hematopoiesis leading to DCHN and eventually contribute to the selection of the best available donor.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial disclosure: The authors have nothing to disclose.

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

Authorship statement: J.S.-G. and C.M.-L. contributed equally to this work.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbmt.2018.01.033.

REFERENCES

- Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2010;363:2091–2101.
- Kumar L. Leukemia: management of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1994;12:1710–1717.
- Fialkow PJ, Thomas ED, Bryant JI, Neiman PE. Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells *in vivo*. *Lancet*. 1971;1:251–255.
- Boyd CN, Ramberg RC, Thomas ED. The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Res*. 1982;6:833–837.
- Nagamura-Inoue T, Kodo H, Takahashi T, Mugishima H, Tojo A, Asano S. Four cases of donor cell–derived AML following unrelated cord blood transplantation for adult patients: experiences of the Tokyo Cord Blood Bank. *Cytotherapy*. 2007;9:727–728.
- Hertenstein B, Hambach L, Bacigalupo A, et al. Development of leukemia in donor cells after allogeneic stem cell transplantation—a survey of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2005;90:969–975.
- Kato M, Yamashita T, Suzuki R, et al. Donor cell–derived hematological malignancy: a survey by the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Leukemia*. 2016;30:1742–1745.
- Niederwieser DW, Appelbaum FR, Gastl G, et al. Inadvertent transmission of a donor's acute myeloid leukemia in bone marrow transplantation for chronic myelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1990;322:1794–1796.
- Berg KD, Brinster NK, Huhn KM, et al. Transmission of a T-cell lymphoma by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 2001;345:1458–1463.
- Glasser L, Meloni-Ehrig A, Greaves W, Demel KC, Butera J. Synchronous development of acute myeloid leukemia in recipient and donor after allogeneic bone marrow transplantation: report of a case with comments on donor evaluation. *Transfusion*. 2009;49:555–562.
- Herold S, Kuhn M, Bonin MV, et al. Donor cell leukemia—Evidence for multiple pre-leukemic clones and parallel long term clonal evolution in donor and recipient. *Leukemia*. 2017;31:1637–1640.
- Liu Z, Liu H, Zhang Y, et al. ASXL1-mutated donor HSCs evolved into FLT3-ITD positive AML in the unrelated donor and FLT3-ITD negative AML in the recipient after transplant. *Blood*. 2015;126:5403.
- Maestas E, Jain S, Stiff P. A 54-year-old woman with donor cell origin of multiple myeloma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of CML. *Case Rep Hematol*. 2016;2016:6751914.
- Sala-Torra O, Hanna C, Loken MR, et al. Evidence of donor-derived hematologic malignancies after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:511–517.
- Xiao H, Shi J, Luo Y, et al. First report of multiple CEBPA mutations contributing to donor origin of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117:5257–5260.
- Hirsch P, Mamez AC, Belhocine R, et al. Clonal history of a cord blood donor cell leukemia with prenatal somatic JAK2 V617F mutation. *Leukemia*. 2016;30:1756–1759.
- Flynn CM, Kaufman DS. Donor cell leukemia: insight into cancer stem cells and the stem cell niche. *Blood*. 2007;109:2688–2692.
- Testa NG, Hendry JH, Molineux G. Long-term bone marrow damage in experimental systems and in patients after radiation or chemotherapy. *Anticancer Res*. 1985;5:101–110.

19. Wang Y, Probin V, Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury. Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev.* 2006;2:271–279.
20. Cooley LD, Sears DA, Udden MM, Harrison WR, Baker KR. Donor cell leukemia: report of a case occurring 11 years after allogeneic bone marrow transplantation and review of the literature. *Am J Hematol.* 2000;63:46–53.
21. Wiseman DH. Donor cell leukemia: a review. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:771–789.
22. Mathioudakis G, Storb R, McSweeney PA, et al. Polyclonal hematopoiesis with variable telomere shortening in human long-term allogeneic marrow graft recipients. *Blood.* 2000;96:3991–3994.
23. Akiyama M, Asai O, Kuraishi Y, et al. Shortening of telomeres in recipients of both autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:441–447.
24. Diamond HR, Ornellas MH, Orfao A, et al. Acute myeloid leukemia of donor origin after allogeneic stem cell transplantation from a sibling who harbors germline XPD and XRCC3 homozygous polymorphisms. *J Hematol Oncol.* 2011;4:39.
25. Ho ESK, Chow HGH, Chan CTL, et al. Whole genome sequencing on donor cell leukemia in a patient with multiple myeloma identified gene mutations that may provide insights to leukemogenesis. *Blood.* 2012;120:21. (Abstract 2414).
26. Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, et al. Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2014;28:426–428.
27. Gondek LP, Zheng G, Ghiaur G, et al. Donor cell leukemia arising from clonal hematopoiesis after bone marrow transplantation. *Leukemia.* 2016;30:1916–1920.
28. Kobayashi S, Kobayashi A, Osawa Y, et al. Donor cell leukemia arising from preleukemic clones with a novel germline DDX41 mutation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2017;31:1020–1022.
29. Suárez-González J, Martínez-Laperche C, Martínez N, et al. Whole exome sequencing reveals acquisition of mutations leading to the onset of donor cell leukemia after hematopoietic transplantation. A model of leukemogenesis. *Leukemia.* 2018;128:2879.
30. Gratwohl A. Bone marrow transplantation activity in Europe 1990. *Bone Marrow Transplant.* 1991;8:197–201.
31. Gratwohl A. Bone marrow transplantation activity in Europe: major geographical differences. *J Intern Med.* 1993;233:333–341.
32. Gratwohl A, Hermans J. Bone marrow transplantation activity in Europe 1992: report from the European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 1994;13:5–10.
33. Gratwohl A, Hermans J. Indications and donor source of hematopoietic stem cell transplants in Europe 1993: report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Clin Transplant.* 1995;9:355–363.
34. Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Bone marrow transplantation activity in Europe 1995. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:407–419.
35. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Bone marrow transplantation activity in Europe 1996. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:227–240.
36. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Bone marrow transplantation activity in Europe 1997. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:231–245.
37. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J, Urbano-Ispizua A. Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe 1998. *Bone Marrow Transplant.* 2000;1:333–350.
38. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Urbano-Ispizua A. Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe 1999. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:899–916.
39. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J, Urbano-Ispizua A. Increasing use of reduced intensity conditioning transplants: report of the 2001 EBMT activity survey. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:813–831.
40. Gratwohl A, Schmid O, Baldomero H, Horisberger B, Urbano-Ispizua A. Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe 2002. Changes in indication and impact of team density: a report of the EBMT activity survey. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:855–875.
41. Gratwohl A, Baldomero H, Schmid O, Horisberger B, Bargetzi M, Urbano-Ispizua A. Change in stem cell source for haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:575–590.
42. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A. EBMT activity survey 2004 and changes in disease indication over past 15 years. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:1069–1085.
43. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A, Niederwieser D. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:71–87.
44. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Rocha V, Apperley J, Niederwieser D. The EBMT activity survey 2006 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on the use of cord blood products. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:687–705.
45. Gratwohl A, Baldomero H, Schwendener A, et al. The EBMT activity survey 2007 with focus on allogeneic HSCT for AML and novel cellular therapies. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:275–291.
46. Gratwohl A, Baldomero H, Schwendener A, et al. The EBMT activity survey 2008: impact of team size, time density and new trends. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46:174–191.
47. Baldomero H, Gratwohl M, Gratwohl A, et al. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46:485–501.
48. Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, et al. The EBMT activity survey: 1990–2010. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:906–923.
49. Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:1161–1167.
50. Passweg JR, Baldomero H, Peters C, et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49:744–750.
51. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:476–482.
52. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:786–792.
53. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2013;381:1943–1955.
54. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339:1546–1558.
55. Donley N, Thayer MJ. DNA replication timing, genome stability and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2013;23:80–89.
56. Morath C, Schwenger V, Schmidt J, Zeier M. Transmission of malignancy with solid organ transplants. *Transplantation.* 2005;80:S164–S166.
57. Nguyen K, Devidas M, Cheng S-C, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia.* 2008;22:2142–2150.
58. Gibson CJ, Kennedy JA, Nikiforow S, et al. Donor-engrafted CHIP is common among stem cell transplant recipients with unexplained cytopenias. *Blood.* 2017;130:91–94.
59. Churpek JE, Godley LA. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood.* 2016;128:1800–1813.
60. Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi K-L, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood.* 2015;126:2484–2490.
61. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371:2477–2487.
62. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371:2488–2498.
63. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014;20:1472–1478.
64. Niederwieser D, Gentilini C, Hegenbart U, et al. Transmission of donor illness by stem cell transplantation: should screening be different in older donors? *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:657–665.
65. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8:98–101.
66. Watanabe T. Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1 infected T cells. *Blood.* 2017;129:1071–1081.

4. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141:1117–34.
5. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012;487:500–4.
6. Casado P, Rodríguez-Prados JC, Cosulich SC, Guichard S, Vanhaesebroeck B, Joel S, et al. Kinase-substrate enrichment analysis provides insights into the heterogeneity of signaling pathway activation in leukemia cells. *Sci Signal*. 2013;6:rs6.
7. Wilkes EH, Terfve C, Gribben JG, Saez-Rodríguez J, Cutillas PR. Empirical inference of circuitry and plasticity in a kinase signaling network. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:7719–24.
8. Wang Y, Yin OQ, Graf P, Kisicki JC, Schran H. Dose- and time-dependent pharmacokinetics of midostaurin in patients with diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol*. 2008;48:763–75.
9. Leonowens C, Pendry C, Bauman J, Young GC, Ho M, Henriquez F, et al. Concomitant oral and intravenous pharmacokinetics of trametinib, a MEK inhibitor, in subjects with solid tumours. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78:524–32.
10. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, et al. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*. 2000;96:3907–14.
11. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*. 2000;19:624–31.
12. Pemovska T, Kontro M, Yadav B, Edgren H, Eldfors S, Szwajda A, et al. Individualized systems medicine strategy to tailor treatments for patients with chemorefractory acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*. 2013;3:1416–29.
13. Borthakur G, Popplewell L, Boyiadzis M, Foran J, Platzbecker U, Vey N, et al. Activity of the oral mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor trametinib in RAS-mutant relapsed or refractory myeloid malignancies. *Cancer*. 2016;122:1871–9.
14. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med*. 2017;377:454–64.
15. Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB. Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. *Mol Cell Biol*. 2002;22:2099–110.

Leukemia (2018) 32:1822–1826

<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0042-z>

Stem cell transplantation

Whole-exome sequencing reveals acquisition of mutations leading to the onset of donor cell leukemia after hematopoietic transplantation: a model of leukemogenesis

Julia Suárez-González^{1,2} · Carolina Martínez-Laperche^{2,3} · Nerea Martínez⁴ · Gabriela Rodríguez-Macías³ · Mi Kwon^{2,3} · Pascual Balsalobre^{2,3} · Diego Carbonell^{2,3} · María Chicano^{2,3} · David Serrano^{2,3} · Juan Carlos Triviño⁵ · Miguel Ángel Piris⁶ · Jorge Gayoso^{2,3} · José Luis Díez-Martín^{2,3,7} · Ismael Buño^{1,2,3}

Received: 31 July 2017 / Revised: 17 November 2017 / Accepted: 30 November 2017 / Published online: 5 February 2018

© Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature 2018

These authors contributed equally: Julia Suárez-González, Carolina Martínez-Laperche.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0042-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carolina Martínez-Laperche
cmlaperchehugm@gmail.com

¹ Genomics Unit, Gregorio Marañón General University Hospital, Gregorio Marañón Health Research Institute (IiSGM), Madrid, Spain

² Gregorio Marañón Health Research Institute (IiSGM), Madrid, Spain

³ Department of Hematology, Gregorio Marañón General University

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT) is an effective treatment for hematologic malignancies. The most frequent cause of post-transplant mortality is disease relapse, the majority of the cases present recurrence of original disease from outgrowth of residual cells having

Hospital, Madrid, Spain

⁴ Cancer Genomics, IDIVAL, Santander, Spain

⁵ Sistemas Genómicos, Valencia, Spain

⁶ Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain

⁷ Department of Medicine, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

evaded eradication. The development of *de novo* hematological malignancies in cells of donor origin is a rare but severe complication, known as donor cell leukemia (DCL).

The leukemic transformation of otherwise healthy donor stem cells provides a useful *in vivo* model to study the mechanisms involved in leukemogenesis. We report on a case of DCL [1] in which we performed whole-exome sequencing (WES) in bone marrow (BM) samples from the recipient at different time-points after unrelated cord blood transplantation (UCBT) with the objective to study the dynamics of emergence of mutations that precede the development of DCL.

A 43-year-old woman diagnosed of B-lymphoblastic leukemia (B-ALL) with t(1;19) was treated with PETHEMA high-risk protocol (ALL-AR-03) [2] and allogeneic UCBT.

The conditioning regimen included thiopeta, fludarabine, busulfan, and thymoglobulin. Sixteen months after transplantation, the patient was admitted with upper respiratory infection and fever and a BM aspiration revealed 80% of myeloid blasts. Immunophenotype was MPO+, HLA-DR+, CD11b+, CD13+, CD14+, CD15+, CD33+, CD34+, CD38+, CD56+, and CD64+. Interestingly, the blasts were negative for the lymphoid markers identified at diagnosis. Cytogenetic analysis showed a normal female karyotype (46,XX) and Fluorescence *in situ* hybridization and quantitative RT-PCR for t(1;19) were negative. PCR amplification and detection of short tandem repeat markers (STR-PCR; AmpFISTR SGM Plus; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) showed complete donor chimerism in BM and peripheral blood samples. Molecular screening for acute myeloid leukemia (AML) related mutations detected the presence of *NPM1* gene type-A mutation. Taking all these observations together, diagnosis of DCL was established. After diagnosis of DCL, qPCR was used to test with high sensitivity for the presence of *NPM1* type-A mutation in retrospective stored samples from the patient as well as in the cord blood unit (CBU) received for SCT. The result was negative in all samples except for those at and after diagnosis of DCL [1].

To identify the acquisition of mutations along the post-allo-SCT period, whole-exome capture and sequencing was performed in BM samples (+98, +189, +350, +468 (DCL onset), +569 (DCL progression) days post-transplant), as well as in the CBU. The present study was approved by the Bioethical Committee of our Institution and the patient provided signed informed consent. DNA samples were enriched in exome sequences using the SureSelect-XT Human exon capture 50 Mb kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Paired-end 76-bp WES was performed using the Illumina HiSeq2000 instrument (Illumina, San Diego, CA, USA).

To identify the somatic mutations, DNA sequencing data from post-transplant BM samples were matched against the CBU sample. Samples were aligned to the human reference

genome (NCBI build 37/hg19). Following alignment, variants with coverage $\geq 10x$, quality $\geq 30X$, allele frequency in the general population $< 0.05\%$, and non-synonymous variants located in coding sequences associated with leukemia were selected. Variants that appear transiently (Supplementary information SI1) before the development of DCL and were absent at DCL onset were excluded from the analysis. Variants meeting these criteria were retained and were evaluated with SIFT, Polyphen, and Mutation Taster software's to predict their functional effects. Variants identified as pathological by at least two of the three softwares used were finally considered.

The exome of the CBU was also aligned to the human reference genome (NCBI build 37/hg19) and analyzed using the same filters mentioned above. For the *in silico* analysis, only variants identified as pathological by all the three softwares were considered.

An enrichment-capture gene panel including genes found altered in post-allo-SCT samples from the case reported here, as well as genes frequently mutated in myeloid hematological neoplasms was designed (LMA-GeneSGKit, Sistemas Genómicos, Valencia, Spain; Supplementary Information SI2). Using this gene panel, an in-depth analysis of the CBU was performed (paired-end 101-bp, MiSeq, Illumina, San Diego, CA, USA) with the aim of increasing the chance of detecting variants present in a low frequency in the sample.

Variant allele frequency was calculated through the proportion of variant reads for a particular sequence.

A total of 563 germinal variants in cancer-related genes were identified in the CBU by WES, from which 23 variants were classified as pathogenic or likely pathogenic by the three softwares (Supplementary Information SI3). Only 1 of these 23 genes, *SH2B3*, is associated with hematological malignancies. Germ line *SH2B3* variants endow individuals with a predisposition to clonal hematopoiesis, which may foreshadow the development of an overt neoplasm and also to myeloproliferative neoplasms [3].

The *SH2B3* gene encodes for a regulatory protein of the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway, which binds to JAK2 inhibiting the activation of the pathway. Mutations in *SH2B3* disrupt the negative feedback mechanisms that attenuate proliferative signaling. Loss of *SH2B3* activity is relevant to myeloproliferative neoplasm pathobiology [4]. Interestingly, the variant found in this case, c.238C>T (p.R80C), occurs in the last aminoacidic residue of the phenylalanine zipper, which mediates dimerization of protein. The variant reported here has been described, with a heterozygosity rate of 4.8% (11/230), restricted to the African population [5], in which the known high consanguinity rate may have contributed to the high predominance of p.R80C alleles. Conversely, the prevalence of 0.0% (0/10478) among other populations, clearly indicate the rarity of this variant [5].

This single-nucleotide variant probably has an additive effect on the genetic susceptibility to myeloid neoplasms and it would be compatible with a disease model of substantially reduced penetrance. The variant was classified as “probably pathogenic” by the three algorithms used, and it has not been previously described as a disease-related variant. The presence of this variant was confirmed in all samples by Sanger sequencing.

Analysis of variants performed in follow-up samples after allo-SCT allowed to detect several somatic mutations, which might be related (driver mutations) to the development of DCL (Fig. 1). Moreover, the present study reveals a process of sequential clonal expansions, promoted by the acquisition of additional somatic mutations in donor hematopoietic cells. This sequential study shows that somatic mutations in *POU2F2* (c.1329G>T), *CA9* (c.248T>C), and *NOTCH1* (c.1045A>C) genes were related with the pre-leukemic clones but seem to be insufficient to induce leukemic transformation themselves. *POU2F2* encodes for a homeobox-containing transcription factor of the POU domain family. The encoded protein binds the

octamer sequence 5'-ATTGTCAT-3', a common transcription factor binding site in immunoglobulin gene promoters. Differences in *POU2F2* expression have been reported in AML [6]. However, the mechanisms underlying the aberrant upregulation and the potential functions of *POU2F2* remain uncertain. The protein encoded by *CA9* gene is a carbonic anhydrase that may be involved in cell proliferation and transformation and which has been linked to tumorigenesis being overexpressed in various malignancies [7]. Notch signaling is an evolutionarily conserved intracellular signaling pathway that regulates interaction between adjacent cells through binding of Notch family receptors to their cognate ligands. This receptor plays a role in the development of numerous cell and tissue types, and mutations in Notch pathway genes are associated with leukemia development [8]. Therefore, all these mutations precede the development of overt leukemia, which happens when further mutations co-occur in donor cells. Interestingly, at DCL diagnosis, mutations leading to amino-acid changes were detected in three proto-oncogenes, *PTPN11* (c.214G>A), *NRAS* (c.181C>A), *MAP2K1* (c.670G>C), the

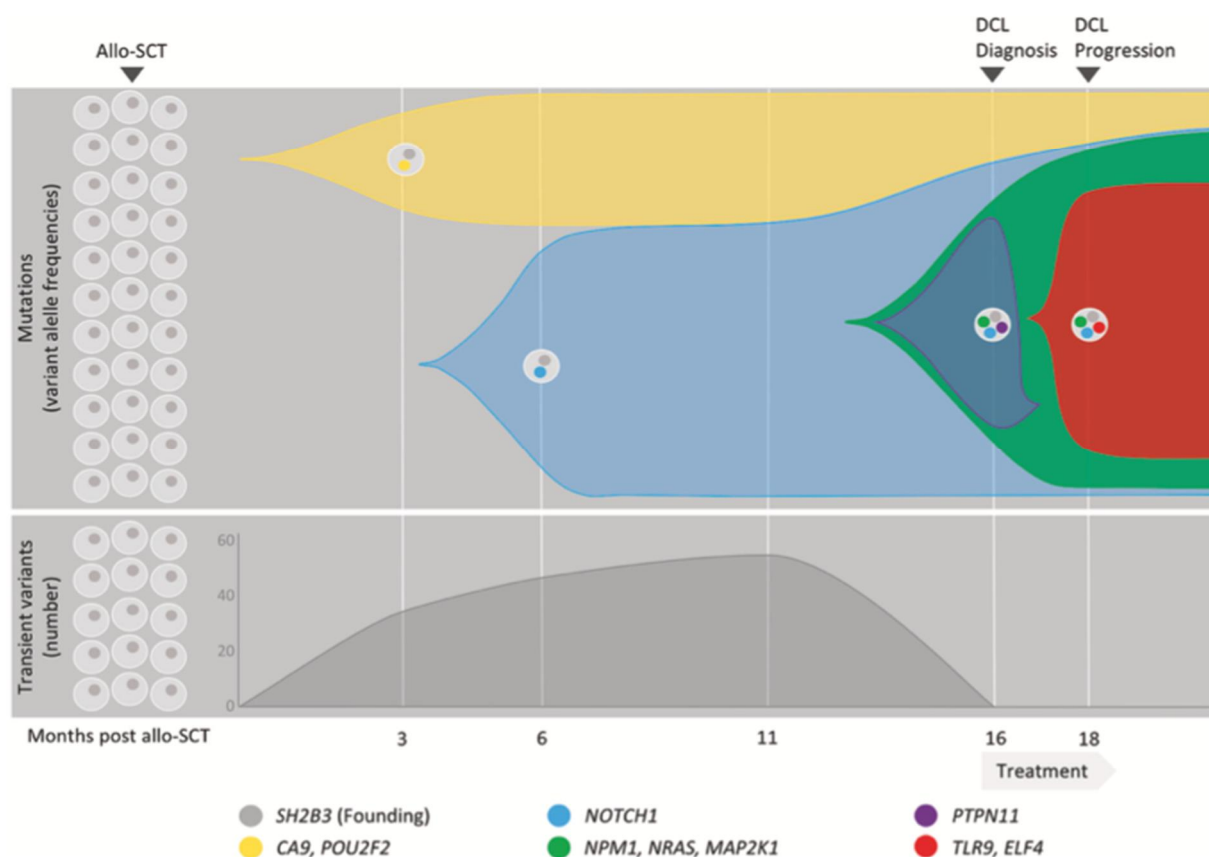


Fig. 1 (Upper panel) Dynamics of somatic mutations acquisition probably related to the onset of donor cell leukemia after hematopoietic transplantation. (DCL donor cell leukemia, allo-SCT allogeneic stem cell transplantation (unrelated cord blood transplantation). *NPM1*

was only detected by conventional and real-time qPCR as it was not covered in the WES approach performed). (Lower panel) Number of transient variants observed in each of the samples analyzed

Ras/mitogen-activated protein kinase (RAS/MAPK) signaling cascade, which have been frequently described in many tumors. The RAS/MAPK pathway is involved in homeostatic mechanisms of proliferation, differentiation, cell cycle, senescence, and apoptosis of normal cells. Somatic mutations in these genes produce constitutive activation of components of signaling circuit causing an appreciable rise in growth promoting signals, making the RAS/MAPK a critical pathway in human cancer.

Also at DCL onset, a mutant *NPM1* gene (c.863_864insTCTG) was identified, which represents the commonest AML-defining molecular lesion identified to date. *NPM1* mutation can enhance self-renewal of hematopoietic progenitors, associated with expanded myelopoiesis and lead to development of AML [9]. *NPM1* mutations have been described as initial events in leukemia development [10] and as a secondary or late event in the pathogenesis of AML [11]. In this case, *NPM1* mutation is preceded by founder mutations in genes that may be associated with preclinical states. Interestingly, the mutation appeared 16 months after UCBT, whereas it has not been reported in childhood leukemias under the age of 3 years [12]. Disrupted host environment might accelerate the acquisition of mutations, external signals from the hematopoietic microenvironment and intrinsic cell factors are known to be involved in leukemogenesis.

The existence of clonal diversity was inferred from the estimated allele frequencies of the different variants (Fig. 1; Supplementary Information SI4). Some of the somatic mutations (*PTPN11*) are present in leukemic subclones, which are detected at DCL diagnosis but disappear after chemotherapy, as well as the acquisition of new mutations (*TLR9* (c.2518G>T), *ELF5* (c.259_260insCA) promotes the appearance or expansion of resistant subclones. At DCL diagnosis, there was a minor subclone with *NOTCH1*, *CA9*, *NPM1*, *MAP2K1*, and *NRAS* mutations that acquires *TLR9* and *ELF5* mutations and it expands in the AML progression. Together with the described somatic mutations, transient variants are also observed before the development of DCL, which are absent at DCL onset (Supplementary Information SI1, Fig. 1). This could represent the appearance of small clones, which are extinguished at DCL onset due to competition with dominant leukemic clones. Considering all the described results together, a possible model of mutation dynamics leading to leukemogenesis in this case is proposed in Fig. 1. None of these changes or other leukemia-related alterations were detected in the CBU sample through exome resequencing nor by target resequencing of a 63 gene panel (total reads: 56,776,750/mean depth coverage: 800×).

Only a handful of DCL cases reported (11 out of 137) include detailed molecular studies in both donors and recipients (Supplementary Information SI5). Interestingly, in these cases, at least one of the mutations detected in leukemic cells at the moment of DCL diagnosis, was also found in the donor.

However, only two donors developed a haematological malignancy. Therefore, the existence of a pre-leukemic clone in the donor is important but might not be enough for the development of overt leukemia. It could be argued whether it is worth testing for the existence of germ line mutations in the donor, in order to avoid the inadvertent use of stem cells from donors carrying a mutation in a malignancy predisposing gene (such as *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *DDX41*, *ANKRD26*, etc.) and therefore to prevent DCL appearance. Several hypotheses have been suggested to explain the mechanism of DCL: occult leukemia in the donor, impaired immune surveillance, exposure to residual chemotherapy after allo-SCT, viral transfection, radiation damage, or oncogene integration. Probably, many of them are involved in donor-derived leukemia arising, but the contribution of each of them is still unknown. The infusion of a CBU with pre-leukemic potential in a context of residual toxicity in the recipient as a result of pre-transplant chemotherapy, together with a high rate of hematopoietic cell division in BM and a post-transplant environment characterized by a decreased immune surveillance may well have played role in the rapid acquisition of mutations in the case here reported.

Recent major advances in AML have demonstrated the emergence of subclones carrying novel mutations at different times during the evolution of leukemia [13–15] and they have provided many leukemia genes that are typically mutated, leading to the establishment of accepted classification and prognostic schemes [16]. Nevertheless, our knowledge of the ways in which mutations can cooperate to induce the development of leukemia remains incomplete considering that mutational history and evolution of AML is a complex and heterogeneous process [17]. Extending this WES analysis in a cohort of patients with DCL will provide insight into the etiology of DCL, as well as a useful framework for understanding the complex biology of hematopoietic malignancies and it will allow the detection of new genes related to the process of leukemogenesis, immune evasion, and/or drug resistance.

Acknowledgements This work was partially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness ISCIII-FIS grants PI14/01731, PI17/1880, and RD12/0036/0061, co-financed by ERDF (FEDER) Funds from the European Commission, “A way of making Europe”, as well as grants from the Fundación LAIR, Asociación Madrileña de Hematología y Hemoterapia (AMHH), Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), and Fundación Mutua Madrileña (FMM).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Rodríguez-Macías G, Martínez-Laperche C, Gayoso J, Noriega V, Serrano D, Balsalobre P, et al. Mutation of the *NPM1* gene

- contributes to the development of donor cell-derived acute myeloid leukemia after unrelated cord blood transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Hum Pathol.* 2013;44:1696–9.
- Ribera J-M, Oriol A, Morgades M, Montesinos P, Sarrà J, González-Campos J, et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. *J Clin Oncol.* 2014;32:1595–604.
 - Hinds DA, Barnholt KE, Mesa RA, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, et al. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;128:1121–8.
 - Chen Y, Fang F, Hu Y, Liu Q, Bu D, Tan M, et al. The polymorphisms in LNK gene correlated to the clinical type of myeloproliferative neoplasms. *PLoS ONE.* 2016;11:e0154183.
 - Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285–91.
 - Advani AS, Lim K, Gibson S, Shadman M, Jin T, Copelan E, et al. OCT-2 expression and OCT-2/BOB.1 co-expression predict prognosis in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2010;51:606–12.
 - Winum J-Y, Scozzafava A, Montero J-L, Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase IX: a new strategy against cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009;9:693–702.
 - Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, Oh P, Haeno H, Buonamici S, et al. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature.* 2011;473:230–3.
 - Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016;127:29–41.
 - Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood.* 2011;117:1109–20.
 - Patel JL, Schumacher JA, Frizzell K, Sorrells S, Shen W, Clayton A, et al. Coexisting and cooperating mutations in NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2017;56:7–12.
 - Hollink I, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters T, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia.* 2009;23:262–70.
 - Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi M, et al. Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2014;28:426–8.
 - Hirsch P, Mamez AC, Belhocine R, Lapusan S, Tang R, Suner L, et al. Clonal history of a cord blood donor cell leukemia with prenatal somatic JAK2 V617F mutation. *Leukemia.* 2016;30:1756–9.
 - Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366:1090–8.
 - Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374:2209–21.
 - Engle EK, Fisher DaC, Miller CA, McLellan MD, Fulton RS, Moore DM, et al. Clonal evolution revealed by whole genome sequencing in a case of primary myelofibrosis transformed to secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29:869–76.