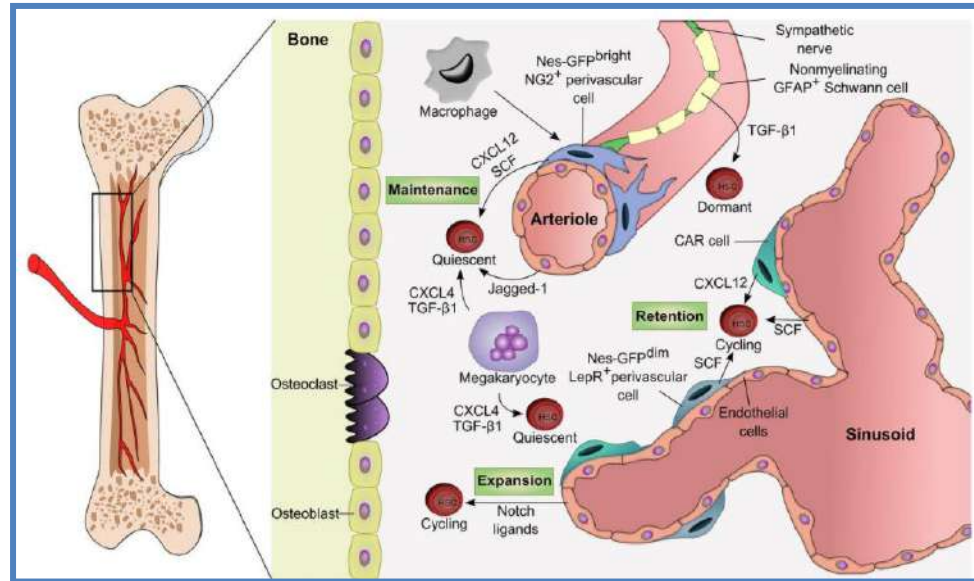
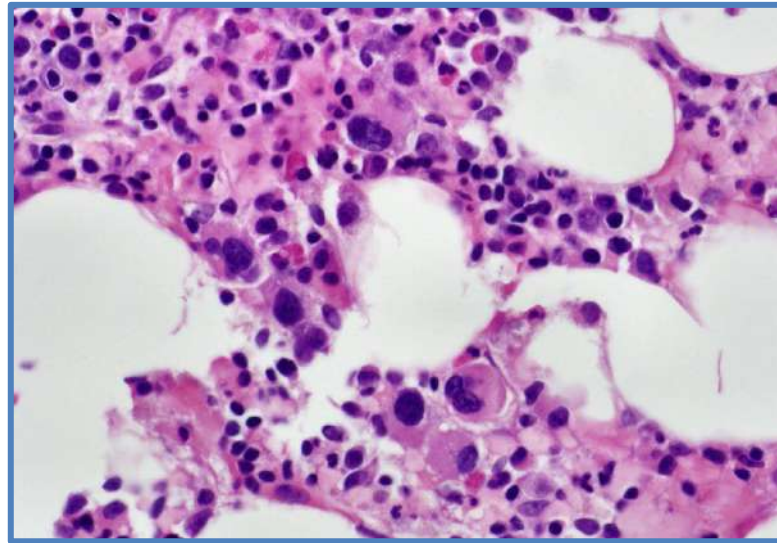


HEMATOPOYESIS CLONAL Y NMP



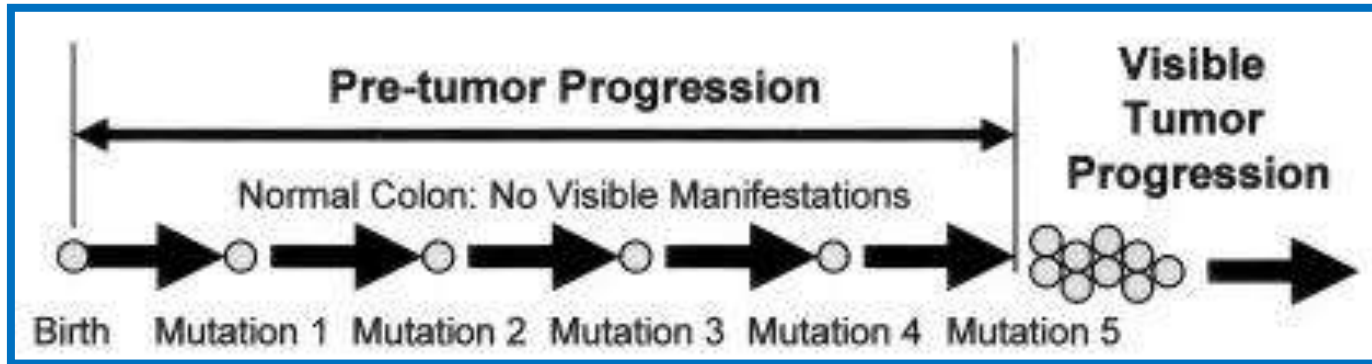
- La médula ósea produce **billones** de células todos los días.
- Estas células están producidas por las **HSC** que se estima que hay unas **11.000** a **22.000** en cada individuo.
- La progenie de estas células hematopoyéticas conocidas como **progenitores o precursores hematopoyéticos** son los que llevan el **peso** principal de la hematopoyesis.
- Las **HSC** se **dividen muy pocas veces** en su vida contribuyendo a la **estabilidad del genoma**



- Durante décadas la **presencia de mutaciones** genéticas se ha utilizado como un **marcador de desarrollo clonal** que demuestra que todas las células con una mutación proceden de **un mismo progenitor**
- En la **población normal** se cree que las **HSC** contribuyen de manera **igualitaria** a la hematopoyesis
- Sin embargo, la **leucemia** es un **caso extremo de hematopoyesis clonal** en el que **una única HSC** lleva **casi todo el peso de la hematopoyesis** en el que existe además un **desorden madurativo** (producción de blastos) y **supresión de hematopoyesis normal** (anemia, neutropenia y/o trombocitopenia).

PROGRESIÓN PRETUMORAL

Calabrese et al. Am J Pathol. 164: 1337–1346



- El **cáncer** surge como consecuencia de la acumulación de **múltiples mutaciones** que presumiblemente ocurren con el **paso de los años**
- Los **primeros pasos** pueden ocurrir **años antes** de que el cáncer sea clínicamente aparente
- En **algunos modelos tumorales** la presencia de **mutaciones tempranas** en stem cells u otros progenitores conducen a **expansiones clonales**
- Ej. El adenoma de colon, el MGUS o la linfocitosis de células B monoclonal **precede** al cáncer de colon, MM y LLC
- Estas **expansiones clonales** aumentan **considerablemente** la probabilidad de desarrollar **mutaciones adicionales** que **cooperan** con las anteriores en el proceso tumoral



The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia

Welch et al. Cell 150, 264–278, 2012

- La **edad** es el **principal factor de riesgo** desarrollo del proceso tumoral (acúmulo progresivo de mutaciones que aportan ventaja selectiva)
- Considerando la fidelidad (elevada) de la replicación de las HSC y **el número de divisiones/año** se estima que una HSC acumula entre **0.069–0.858 mutaciones exónicas/año**:
 - Recién nacidos: 0-1 mutaciones
 - 40-50 años: 4-7 mutaciones
 - 70-80 años: 8-12 mutaciones
- Sin embargo, la **expansión clonal de la HSC** ocurrirá **solo** si se ven afectados genes importantes para la hematopoyesis
- **Estrés genotóxico** (químicos, radiación) puede **aumentar el ratio de mutación**
- Fumar y riesgo de CHIP (HR 2.2; $p < 0.001$; Genovese et al. 2014)

nature
medicine

Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies

Xie et al. Nat Med; 20: 1472, 2014

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence

Genovese et al. N Engl J Med 371: 26, 2014

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes

Jaiswal et al. N Engl J Med; 371: 26, 2014

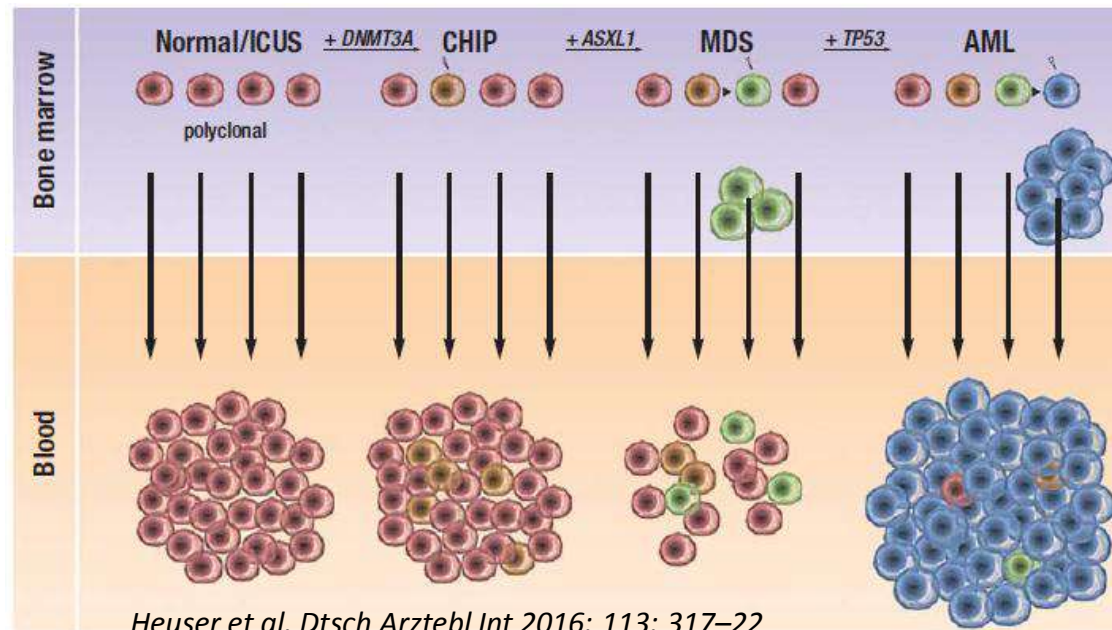
Tres estudios recientes confirmaron la presencia de expansión clonal en individuos sanos

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes

David P. Steensma,¹ Rafael Bejar,² Siddhartha Jaiswal,³ R. Coleman Lindsley,¹ Mikkael A. Sekeres,⁴ Robert P. Hasserjian,⁵ and Benjamin L. Ebert³

BLOOD, 2 JULY 2015 x VOLUME 126, NUMBER 1

- Esta entidad se ha denominado “clonal hematopoiesis of indeterminate potential” (CHIP) (**Steensma et al. Blood; 126: 9, 2015**)
- Individuos con una mutación somática en un gen asociado a patología hematológica en ausencia de cualquier criterio diagnóstico que indique la presencia de patología hematológica
- El cutoff del **VAF** para que exista CHIP se estableció en $\geq 2\%$ en sangre periférica



nature
medicine

Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies

Xie et al. *Nat Med*; 20: 1472, 2014

2728

hematologically normal controls

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence

Genovese et al. *N Engl J Med* 371: 26, 2014

12,380 Swedish adults
(unselected for cancer or hematological phenotypes)

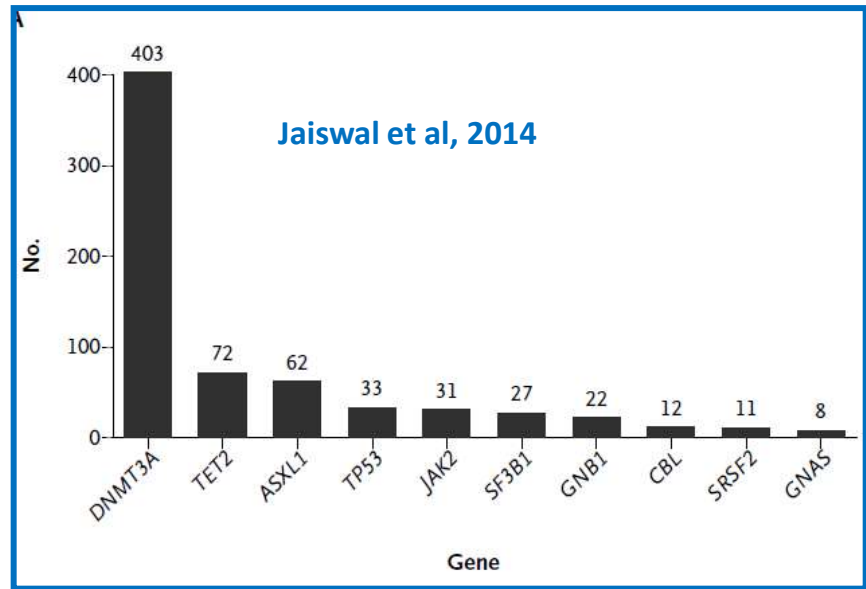
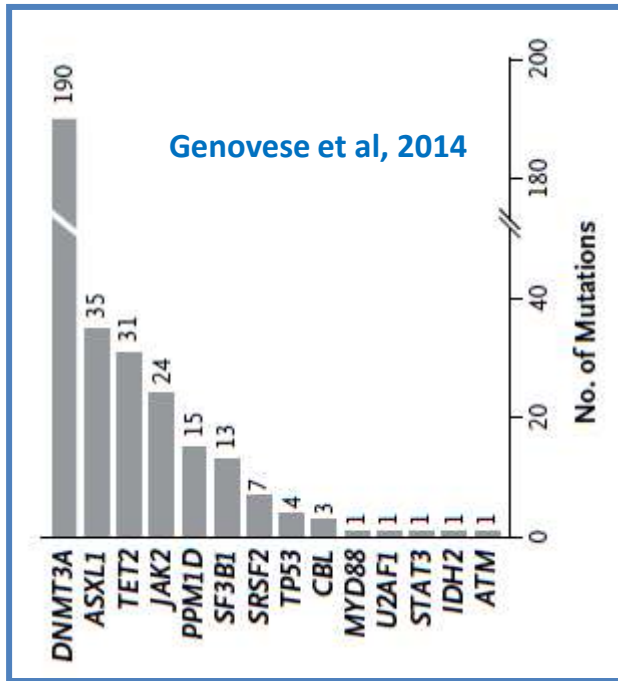
The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes

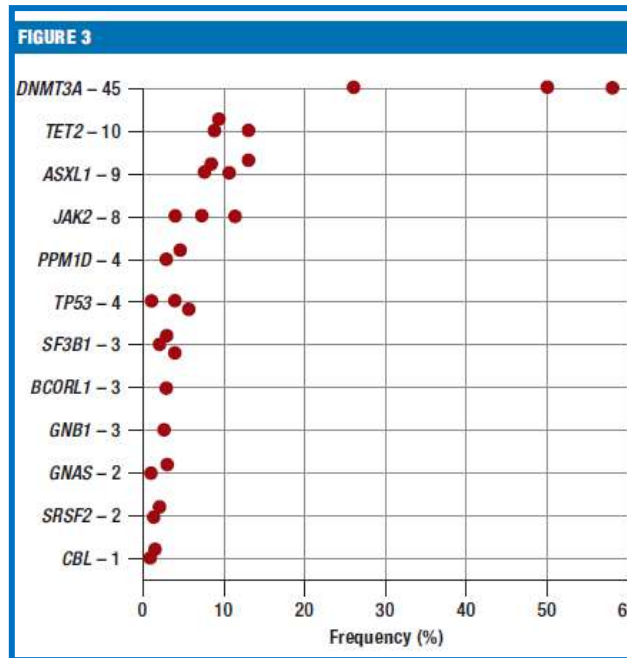
Jaiswal et al. *N Engl J Med*; 371: 26, 2014

17,128 hematologically unselected persons

Tres estudios recientes analizaron mediante técnicas de “whole exome sequencing” la presencia de mutaciones en genes asociados a patologías hematológicas y confirmaron la presencia de expansión clonal en individuos sanos

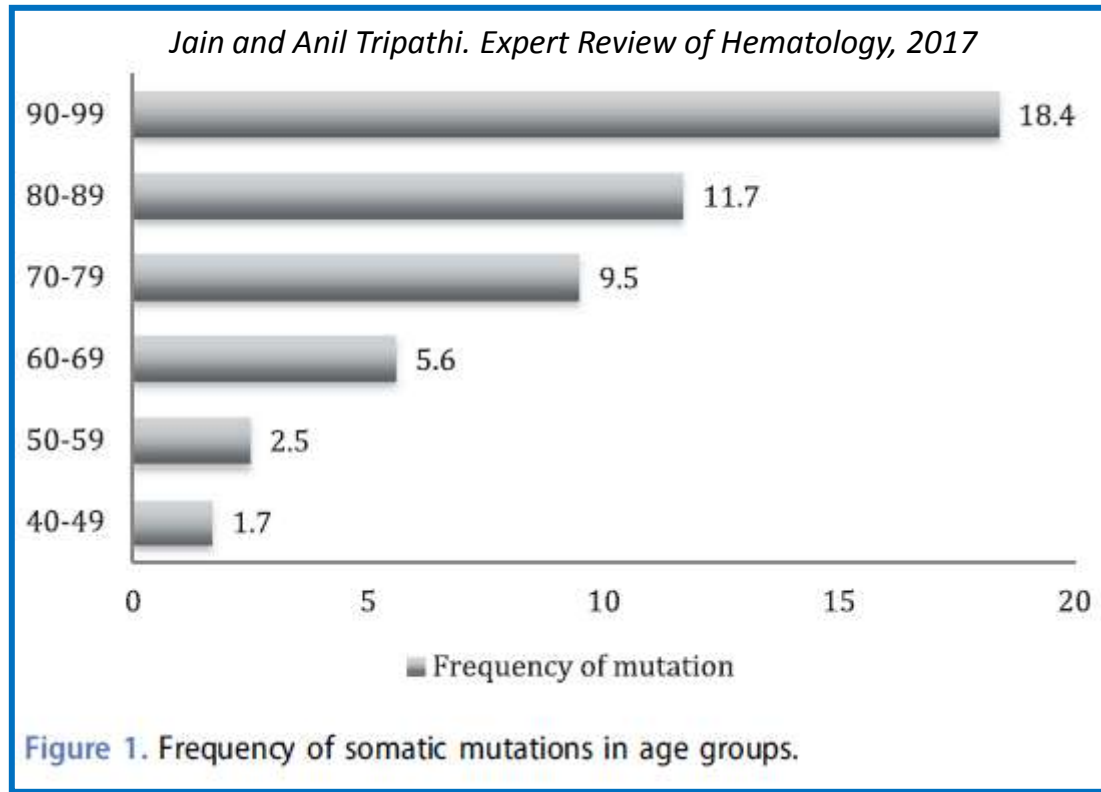


- Los genes más frecuentemente mutados fueron los más frecuentemente mutados en AML y MDS
- DNMT3A fue el más mutado (26% to 58%).



Heuser et al. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 317–22

DISTRIBUCIÓN DE CHIP POR EDAD



- Se detectó CHIP en menos de un 1% de los pacientes <40 años y en un 10% de entre 70-80 años
- De acuerdo con la distribución de edad en Alemania se ha estimado que unos 2.75 millones de personas estarían afectadas
- Los hombres lo padecen 1.3 veces más que las mujeres

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence

Genovese et al. N Engl J Med 371: 26, 2014

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes

Jaiswal et al. N Engl J Med; 371: 26, 2014

- El riesgo de desarrollar una **patología hematológica** se incrementa de **11 to 13 veces** (60% mieloide, 40% linfoide)
- El riesgo de desarrollar patología hematológica es especialmente significativo si la **VAF de la mutación >10%** (Kwok et al. Blood 2015 126:2355-2361).
- El riesgo de desarrollar **enfermedad coronaria** es **2 veces superior**
- Riesgo de **mortalidad** (cualquier causa): **1.4 veces**
- A pesar de ello: es una **entidad benigna**
- El **riesgo absoluto de transformación a neoplasia hematológica** mieloides/linfoides de un individuo con CHIP es de **1% al año**

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence

Genovese et al. N Engl J Med 371: 26, 2014

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes

Jaiswal et al. N Engl J Med; 371: 26, 2014

- Similar a otras entidades como MGUS o la linfocitosis B monoclonal que no causan morbilidad en sí pero están asociadas a un riesgo de transformación a mieloma múltiple o LLC respectivamente de un 1-2%
- Sin embargo el MGUS y la LBM representan expansiones de líneas celulares ya comprometidas, mientras que el CHIP implica la expansión de progenitores más inmaduros o HSC
- Por ellos el CHIP es precursor de un amplio rango de patologías hematológicas

Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential

A Risk Factor for Hematologic Neoplasms

Michael Heuser, Felicitas Thol, Arnold Ganser

Deutsches Ärzteblatt International | Dtsch Arztebl Int 2016; 113: 317–22

- At the present time, screening for CHIP should not be carried out in healthy people with normal blood values
- As (1) the risk of hematologic neoplasm is low and (2) currently no intervention is available.
- When CHIP is an incidental finding in patients with normal blood counts, we recommend a differential blood count 3 months later, and after that every 12 months, in order to identify any development/progression of cytopenia or the appearance of blasts in the blood.

Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence

Genovese et al. N Engl J Med 371: 26, 2014

- La mayoría de los casos con CHIP afecta a un subgrupo específico de conocidos **drivers** de cánceres hematológicos: *DNMT3A*, *ASXL1*, and *TET2*
- Sin embargo, **otros drivers** comunes como *FLT3* y *NPM1* no han aparecido mutados en CHIP
- Lo que sugiere que las mutaciones en *DNMT3A*, *ASXL1*, y *TET2* son mutaciones **iniciadoras** que pueden permanecer subclínicas durante largo tiempo
- Mientras que mutaciones en *FLT3* y *NPM1* pueden ser eventos **cooperativos** posteriores
- *DNMT3A*: experimentos funcionales en ratones muestran la mutación en afecta a la **diferenciación** de las HSC provocando un **aumento en su número** en la BM (*Challen et al. Nat Genet 2012; 44:23*)
- *TET2*: su inactivación aumenta la **tasa de autorenovación** de las HSC (*Busque et al. Nat Genet 2012;44:1179*)

En definitiva, a una expansión de la HSC que lleva una mutación de este tipo

Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence

Genovese et al. N Engl J Med 371: 26, 2014

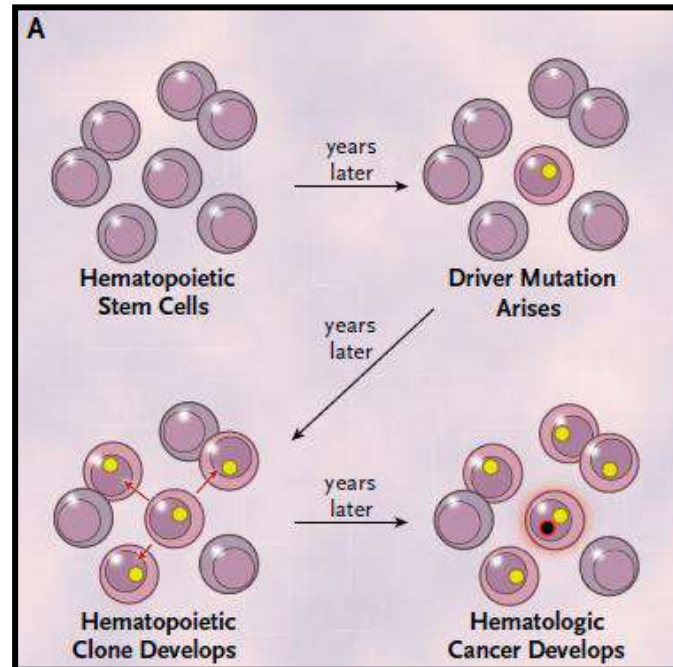
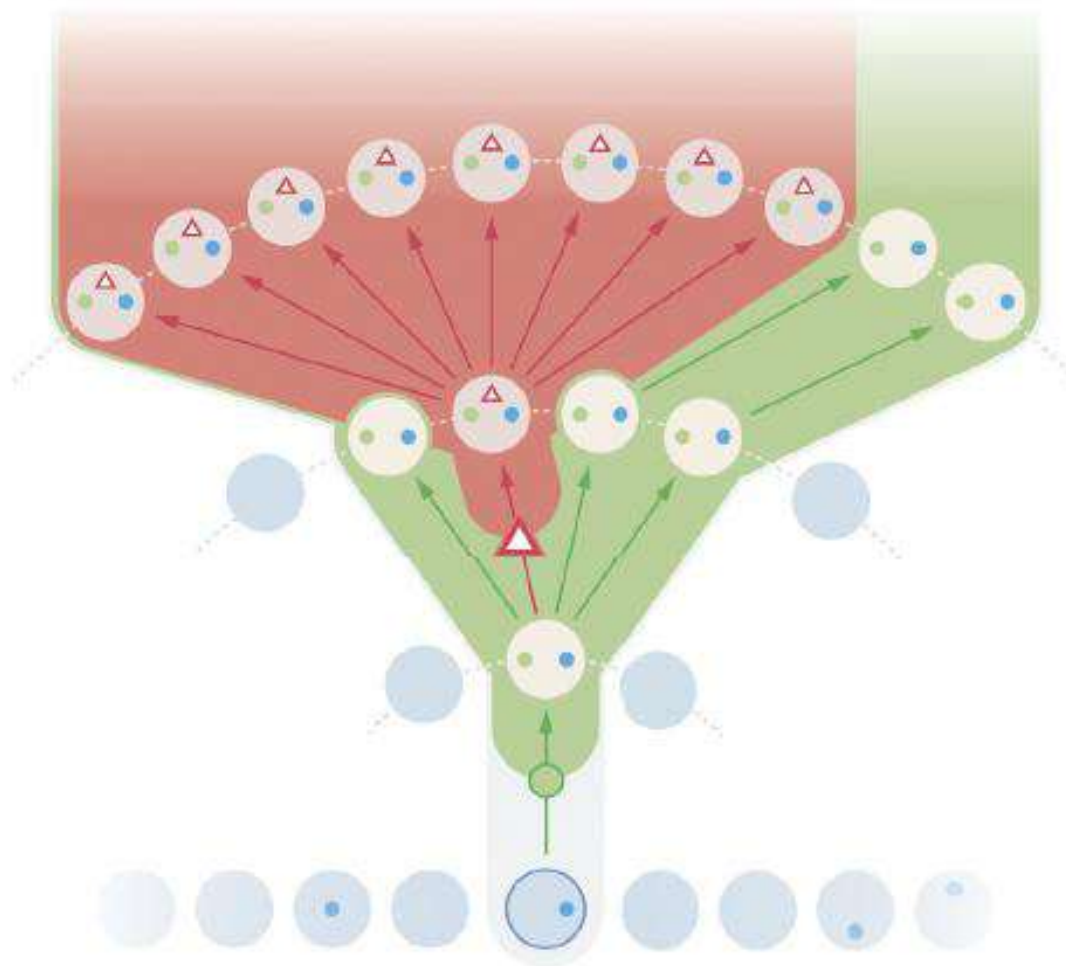


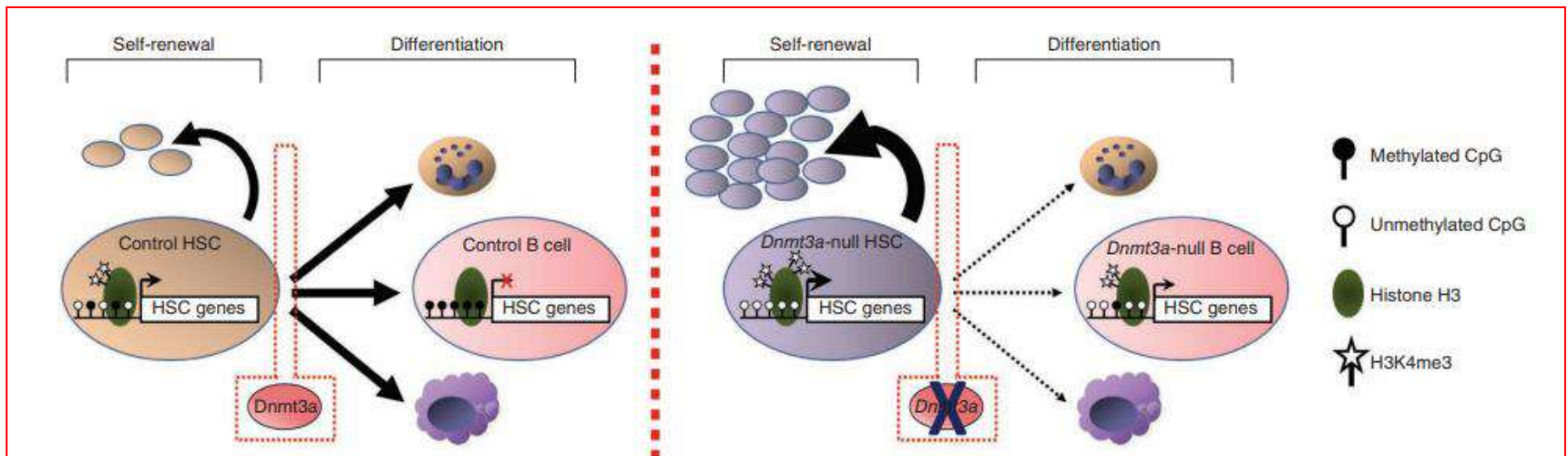
Figure 1. Clonal Expansion and Allelic Fractions.

Panel A shows a model for the expansion of a single hematopoietic stem cell into a clonal population, under the influence of a somatic mutation (yellow circle), and the potential conversion of the clone into a hematologic cancer through subsequent mutation (black circle with red rim). Mutations present in the founder cell would be present at



- Background mutation
- Early initiation mutations in
DNMT3A
TET2
JAK2
ASXL1
GNAS
PPM1D
SF3B1
SH2B3
- △ Subsequent cooperating mutations in
FLT3
NPM1
WT1
IDH1
RUNX1
NRAS
CEBPA
U2AF1
PHF6
STAG2

DNMT3A



Challen et al. Nature Genetics VOLUME 44 | NUMBER 1 | JANUARY 2012

- **Implicación** de DNMT3A en proceso de **diferenciación**
- Estudios han demostrado que la mutación en **DNMT3A** persiste tras quimioterapia intensiva mientras las células leucémicas (y las otras mutaciones) desaparecen.
- Lo que sugiere que las mutaciones están presentes en la HSC

Cancer Cell

Volume 25, Issue 4, p442–454, 14 April 2014

The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers

David A. Russler-Germain, David H. Spencer, Margaret A. Young, Tamara L. Lamprecht, Christopher A. Miller, Robert Fulton, Matthew R. Meyer, Petra Erdmann-Gilmore, R. Reid Townsend, Richard K. Wilson, Timothy J. Ley

Published Online: March 20, 2014

Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease

Jaiswal et al. NJEM; 377: 111, 2017

METHODS

We used whole-exome sequencing to detect the presence of CHIP in peripheral-blood cells and associated such presence with coronary heart disease using samples from four case-control studies that together enrolled 4726 participants with coronary heart disease and 3529 controls. To assess causality, we perturbed the function of *Tet2*, the second most commonly mutated gene linked to clonal hematopoiesis, in the hematopoietic cells of atherosclerosis-prone mice.

- **CHIP carriers** had a risk of incident **coronary heart disease** that was **1.9 times** as great as in noncarriers (95% CI, 1.4 to 2.7; P<0.001).
- Participants with mutations in *DNMT3A*, *TET2*, and *ASXL1* had **1.7 to 2.0** times the risk of incident **coronary heart disease** as did those with no mutations.

Myeloproliferative neoplasm stem cells

Adam J. Mead¹ and Ann Mullally²

- **MPNs** arise in the **HSC compartment** as a result of the acquisition of **somatic mutations** in a **single HSC** that provides a **selective advantage** over normal HSC and **promotes myeloid differentiation** to engender a myeloproliferative phenotype.
- In >90% of cases, **mutations that drive the development** of an MPN phenotype occur in a **mutually exclusive** manner in 1 of 3 genes: JAK2, CALR, or MPL
- **Despite common biological features**, MPNs display **diverse disease phenotypes** as a result of both constitutional and acquired factors that influence MPN stem cells, and likely also as a result of **heterogeneity in the HSC** in which MPN-initiating mutations arise.

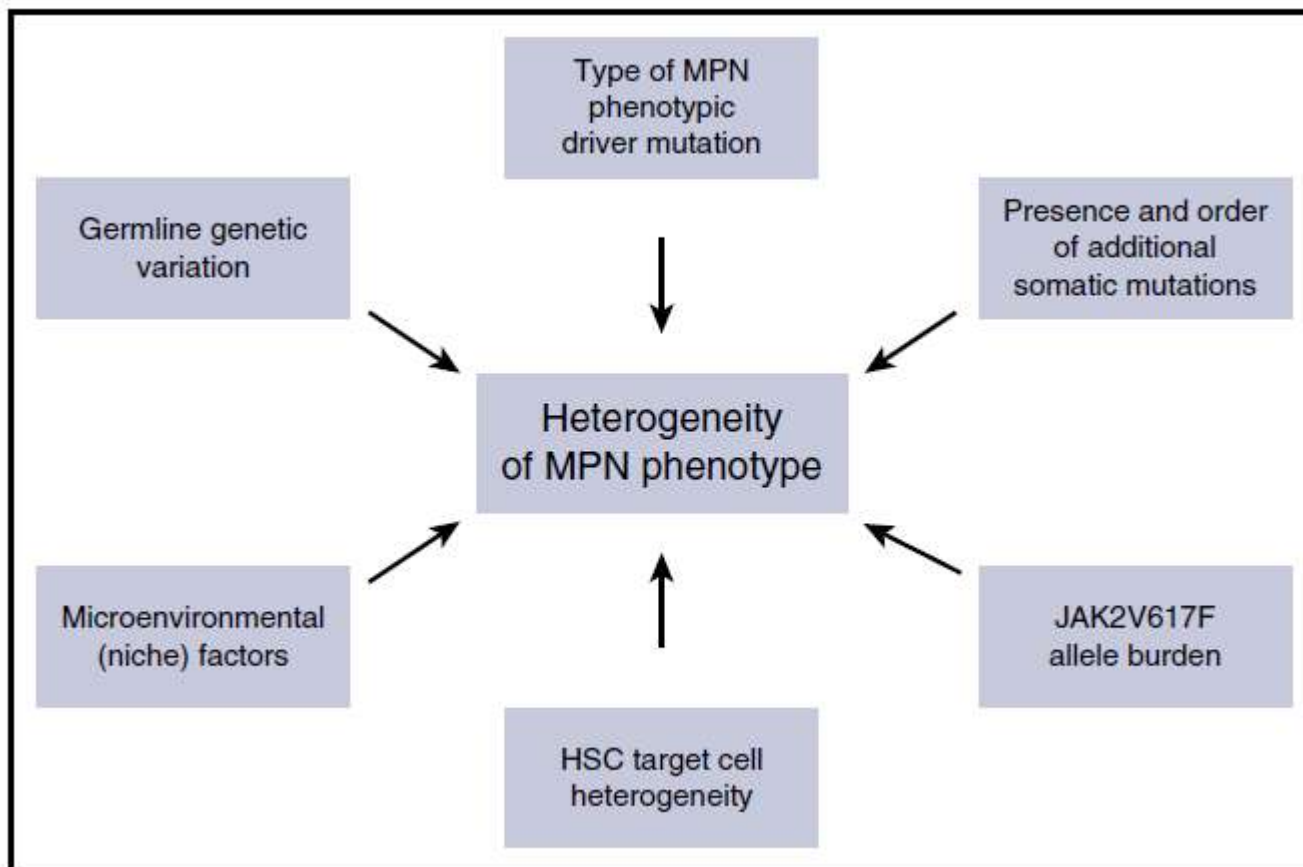
Myeloproliferative neoplasm stem cells

Adam J. Mead¹ and Ann Mullally²

- Intriguingly, the prevalence of JAK2V617F-positive MPNs is significantly lower than that of JAK2V617F-positive CHIP, suggesting that in many cases JAK2V617F alone may be sufficient to engender clonal hematopoiesis but insufficient to induce MPNs
- Other somatic genetic alterations ie: TET2 loss-of-function mutations, can precede or be acquired after the acquisition of JAK2V617F.
- The acquisition of TET2 mutations in established MPNs has also been associated with **leukemic transformation**, as have mutations in other epigenetic genes such as ASXL1, in splicing genes such as SRSF2, and in additional genes including IDH1/2, TP53, NRAS, and RUNX1
- Interestingly, **acute myeloid leukemia (AML) that arises out of JAK2V617F-mutant MPNs retains the JAK2V617F allele only 50%** of the time suggesting that the acquisition of additional somatic mutations in MPN stem cells that harbor a phenotypic driver mutation (ie, JAK2, CALR, or MPL) is not the only route to AML.

Myeloproliferative neoplasm stem cells

Adam J. Mead¹ and Ann Mullally²



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE
Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms

Ortmann et al. NEJM; VOLUME 128: 601, 2015

- Determinaron el orden de la mutación de JAK2 o TET2 en pacientes con MPN genotipando colonias hematopoyéticas por NGS
- **TET2-first patients** eran **12.3 años mayores** que aquellos que adquirirían la mutación en JAK2 primero
- **La adquisición de JAK2** como **primer evento** se asoció con mayor probabilidad de **PV**, mayor **riesgo de trombosis** y más **sensibilidad a ruxolitinib** *in vitro*
- **Adquisición de TET2 como primer evento:** El **compartimento de HSC y células progenitoras** estaba principalmente ocupado por células **TET2 single mutants**
- **Adquisición JAK2 como primer evento** se asoció a la presencia de **doble mutantes (JAK2/TET2)** compartimento de HSC y células progenitoras
- La **adquisición previa de TET2** disminuye el efecto proliferativo de la mutación de la V617F en JAK2

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE
Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms

Ortmann et al. NEJM; VOLUME 128: 601, 2015

El orden en el que ocurren las mutaciones tienen un efecto biológico en el desarrollo de los MPNs

- **TET2-first patients:** las **TET2 single-mutant HSC** se **expanden** pero **NO** dan lugar un exceso de **direrenciación megacariocítica o eritroide** hasta que no desarrollan la segunda mutación en JAK2
- **JAK2-first patients:** las **JAK2 single-mutant HSC y pogenitor cells** **NO** se expanden hasta que no se adquiere el segundo hit en TET2, sin embargo **sí** son capaces de **generar aumento** en el número de **megacariocitos** y células **eritroides**

Routine clinical mutation profiling using next generation sequencing and a customized gene panel improves diagnostic precision in myeloid neoplasms

Stephan Bartels¹, Elisa Schipper¹, Britta Hasemeier¹, Hans Kreipe¹ and Ulrich Lehmann¹

¹ Institute of Pathology, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany

Correspondence to: Ulrich Lehmann, **email:** Lehmann.ulrich@mh-hannover.de

Keywords: myeloid neoplasms, next-generation sequencing, FFPE, MDS, hematopathology, Pathology Section

Received: February 02, 2016

Accepted: March 14, 2016

Published: March 23, 2016

range 0-5), 125 Patients exhibit at least one pathogenic mutation (67.6%). Variants show allele frequencies ranging from 6.7% up to 95.7%. Most frequently mutated genes were TET2 (28.7%), SRSF2 (19.5%), ASXL1 (8.6%) and U2AF1 (8.1%). The mutation profiling increases the diagnostic precision and adds prognostic information.

Table 5: Patients with ambiguous morphological findings, which are analyzed with the MDS/MPN-Panel to precise the diagnosis.

Suspected myeloid neoplasm	No. patients with detectable variant
MDS (<i>n</i> = 55)	24 (43.6%)
MPN (<i>n</i> = 9)	4 (44.4%)
CMMML (<i>n</i> = 18)	14 (77.8%)
Other* (<i>n</i> = 5)	2 (40.0%)

Other* include aCML, CML and MDS/MPN-U

Routine clinical mutation profiling using next generation sequencing and a customized gene panel improves diagnostic precision in myeloid neoplasms

Stephan Bartels¹, Elisa Schipper¹, Britta Hasemeier¹, Hans Kreipe¹ and Ulrich Lehmann¹

¹ Institute of Pathology, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany

Correspondence to: Ulrich Lehmann, **email:** Lehmann.ulrich@mh-hannover.de

Keywords: myeloid neoplasms, next-generation sequencing, FFPE, MDS, hematopathology, Pathology Section

Received: February 02, 2016

Accepted: March 14, 2016

Published: March 23, 2016

Age distribution of patients with and without mutations

TET2 is the most frequently mutated gene in our patient cohort and is known to be frequently mutated in elderly persons without myeloid neoplasms. Table 4 shows the age distribution of mutated and non-mutated patients, as well as TET2-mutated patients. Patients harboring one or more mutations are significantly older than non-mutated patients (72.0 vs. 59.8 years, $p < 0.0001$, independent t-test). This is also true for TET2 mutated patients, who show a mean age of 76.6 years (76.6 vs. 59.8 years, $p < 0.0001$, independent t-test).

ESTUDIO HOSPITAL DR. NEGRÍN

- 49 MPNs:

	Frecuencia	Porcentaje
LMA tranf PV	1	2,0
MF	10	20,4
poliglobulia	4	8,2
PV	4	8,2
TE	23	46,9
Trombocitosis	7	14,3
Total	49	100,0

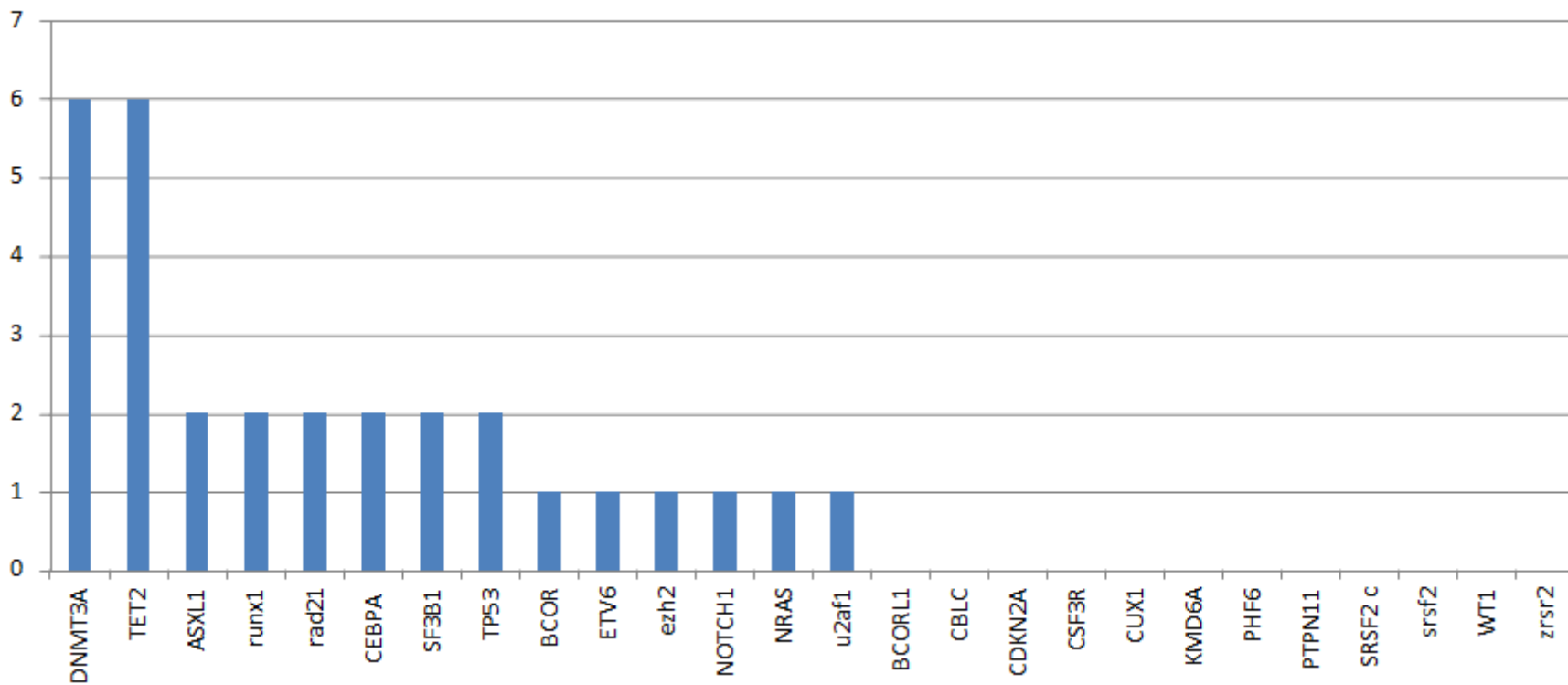
- NGS: Illumina, Miniseq. Panel Myeloid Tumor Solution™ de Sophia Genetics. Software de análisis empleado: SOPHiA DDM (4.8.1.3--h7-e871be8) y el genoma de referencia para los alineamientos el GRCh37/hg19.

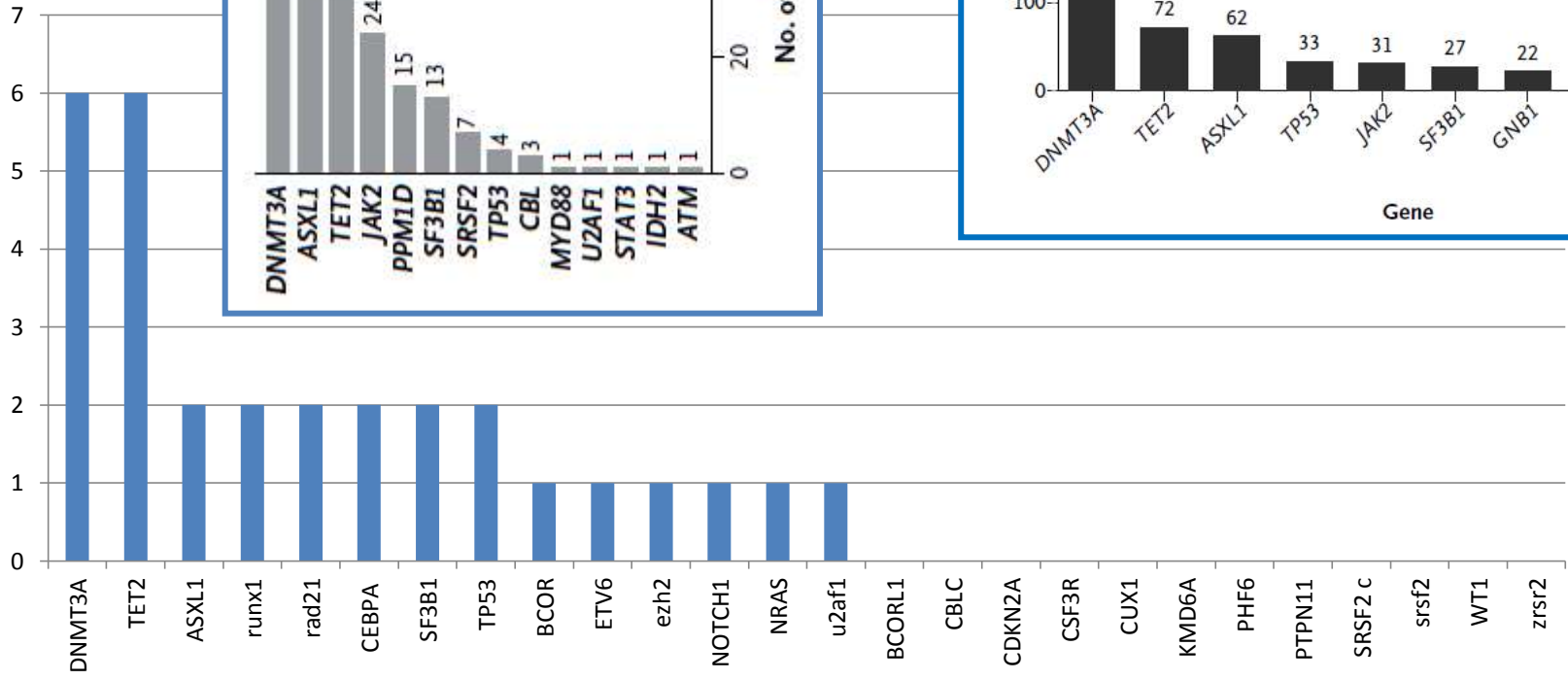
ESTUDIO HOSPITAL DR. NEGRÍN

- 40,8% de las muestras presentaron al menos una mutación (20/49)

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje mutación panel
LMA tranf PV	1	2,0	100,0
MF	10	20,4	60,0
poliglobulia	4	8,2	0,0
PV	4	8,2	100,0
TE	23	46,9	39,1
Trombocitosis	7	14,3	0,0
Total	49	100,0	

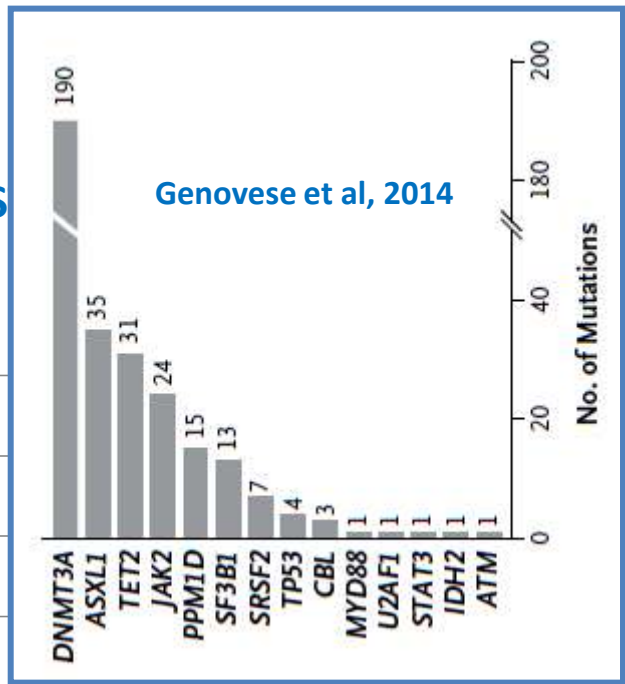
DISTRIBUCIÓN DE LAS MUTACIONES EN NUESTRA SERIE DE MPNs





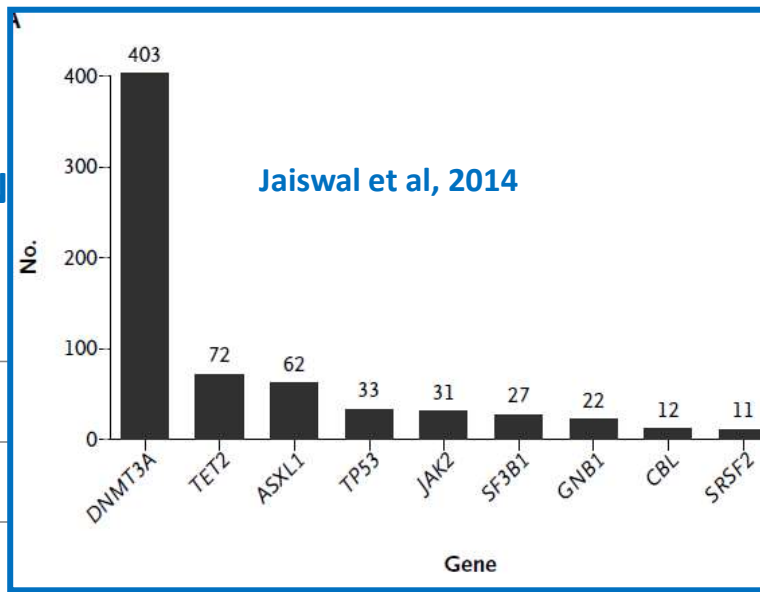
DIS

Genovese et al, 2014



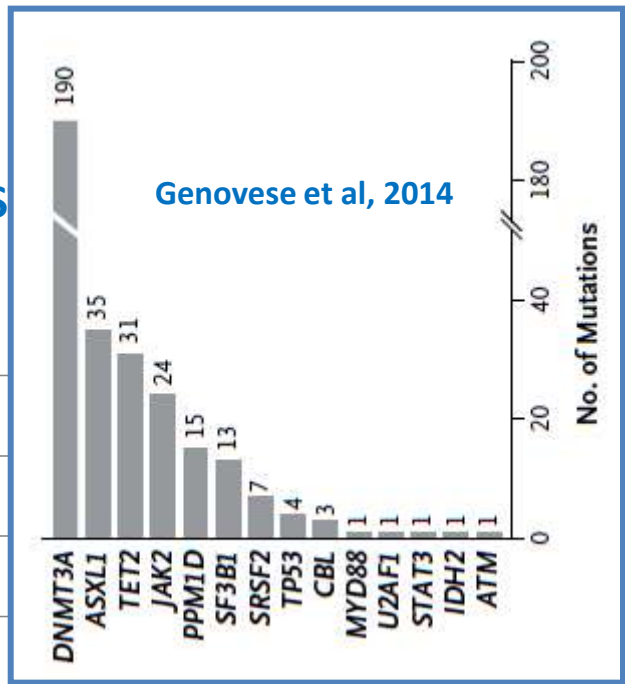
ES EN N

Jaiswal et al, 2014



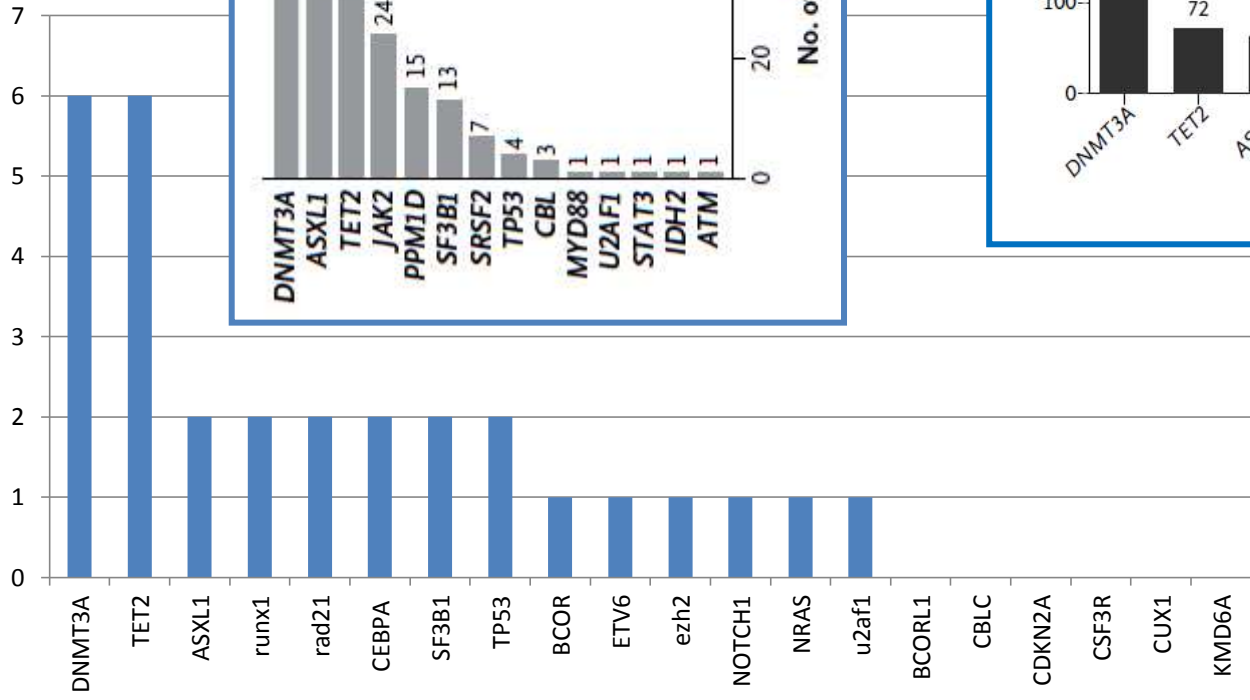
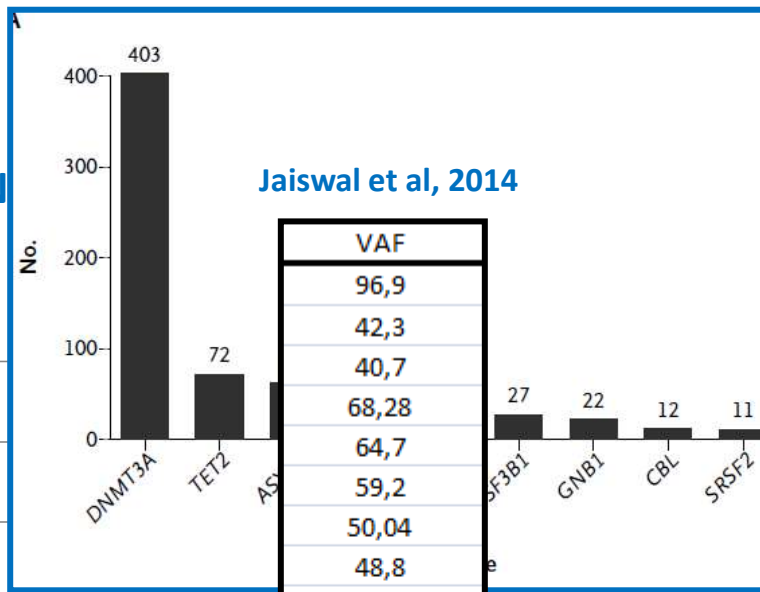
DIS

Genovese et al, 2014

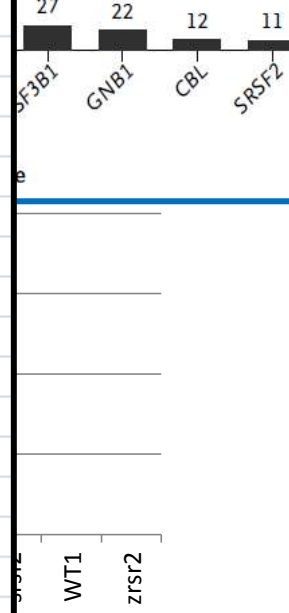


ES EN N

Jaiswal et al, 2014



Gene	VAF
DNMT3A	96,9
TET2	42,3
ASXL1	40,7
SF3B1	68,28
U2AF1	64,7
STAT3	59,2
IDH2	50,04
ATM	48,8
TP53	48,1
BCOR	46,7
ETV6	44,8
ezh2	35,3
NOTCH1	33,2
NRAS	30,5
u2af1	28,1
BCORL1	25,9
CBLC	18,1
CDKN2A	7,7
CSF3R	7,49
CUX1	6,7
KMD6A	5,5
WT1	38,52
zrsr2	



ASOCIACIÓN PRESENCIA MUTACIÓN CON DATOS CLÍNICOS, DEMOGRÁFICOS...

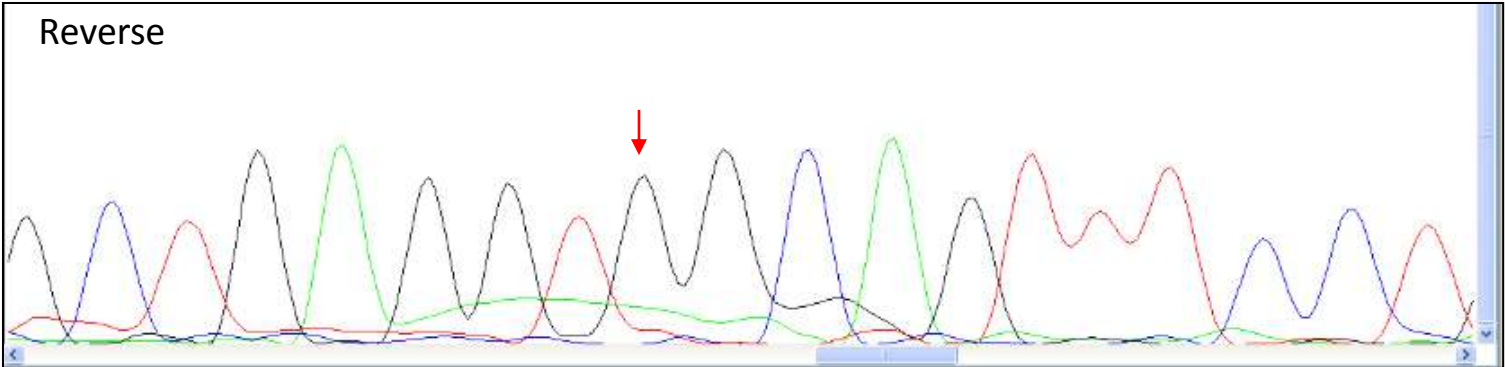
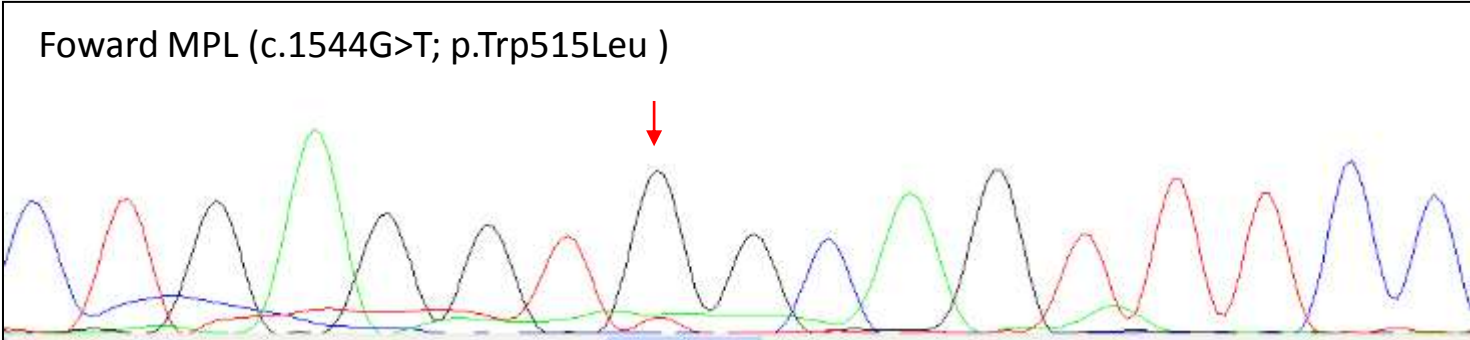
Regresión logística presencia mutaciones estrella con edad, male, DM, HTA y fumador								
Variables en la ecuación								
		B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1 ^a	EdadMuestra1	,051	,023	4,897	1	,027	1,006	1,102
	Constante	-3,958	1,495	7,011	1	,008		

a. Variables especificadas en el paso 1: EdadMuestra1.

Regresión logística evento con presencia de distintas mutaciones, edad, male, DM, HTA y fumador								
Variables en la ecuación								
		B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1 ^a	muta_jak	2,900	1,121	6,698	1	,010	2,022	163,515
	Constante	-3,219	1,020	9,963	1	,002		

a. Variables especificadas en el paso 1: muta_jak.

% JAK2/CALR/MPL
100
93,8
77,2
70,8
66,2
61,83
53,2
47,7
40,3
39
37,7
36,5
32,28
30,8
30,7
30,2
28,1
27,9
23,8
23,6
21,6
19,2
14,27 ←
14
13,72
13,3
10,9
8,5
3,7
2,6
1,84



TE: 03/09/2015

MF: 08/02/2018

