




Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# **APLICACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA EN EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DEL LINFOMA FOLICULAR**

M<sup>a</sup> Concepción Fernández Rodríguez

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Concepción Fernández Rodríguez para optar al  
grado de Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2021

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Antonio Salar Silvestre y la Dra. Beatriz Bellosillo Paricio, del Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas y bajo la tutoría de la Dra. Anna Maria Bassols Teixidó, del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona



# Índice

LISTADO DE FIGURAS.....	5
LISTADO DE TABLAS.....	7
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN .....	11
GENERALIDADES DEL LINFOMA FOLICULAR.....	13
▶ Clasificación.....	13
▶ Epidemiología.....	14
▶ Linfomagénesis y características biológicas.....	15
▶ Manejo y pronóstico .....	19
PATOGENESIS Y ALTERACIONES MOLECULARES EN EL LINFOMA FOLICULAR	24
▶ Desregulación epigenética .....	24
▶ Señales de supervivencia y proliferación.....	26
▶ Evasión inmune .....	30
APLICACIÓN CLÍNICA DE LA NEXT GENERATION SEQUENCING EN LINFOMAS	34
▶ Situación actual .....	34
▶ Retos en la implementación clínica.....	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
METODOLOGÍA.....	50
PACIENTES Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	52
ESTUDIO MUTACIONAL .....	53
▶ Preparación de la muestra .....	53
▶ Diseño del panel.....	53
▶ Preparación de la librería y secuenciación.....	55
▶ Análisis y clasificación de variantes.....	56
MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	57
RESULTADOS .....	58
▶ Características de los pacientes .....	60
▶ Calidad de los datos de secuenciación.....	60
▶ Variantes detectadas.....	62

‣ Mutaciones en la vía de regulación epigenética y transcripcional ...	64
‣ Mutaciones en la vía de supervivencia y proliferación celular .....	66
‣ Mutaciones en la vía de respuesta inmunológica .....	69
‣ Mutaciones en la vía de señalización BCR.....	71
‣ Mutaciones en la vía de señalización mTORC1 .....	72
‣ Mutaciones en la vía de migración celular.....	73
‣ Papel pronóstico de la infección por el virus de la hepatitis B.....	76
DISCUSIÓN.....	77
CONCLUSIONES .....	88
BIBLIOGRAFÍA .....	92
ANEXOS .....	119
‣ Listado de mutaciones detectadas.....	120
‣ Publicaciones como primera autora durante la tesis.....	138
‣ Publicaciones en colaboración durante la tesis .....	140
AGRADECIMIENTOS.....	144

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Origen de los linfomas de células B maduras.....	13
<b>Figura 2.</b> Frecuencia de los linfomas de célula B en adultos.....	14
<b>Figura 3.</b> Etapas tempranas de la linfomagénesis folicular.....	16
<b>Figura 4.</b> Histología del linfoma folicular .....	17
<b>Figura 5.</b> Algoritmo de tratamiento en linfoma folicular .....	21
<b>Figura 6.</b> Vías moleculares de patogénesis en linfoma folicular .....	33
<b>Figura 7.</b> Clasificación de variantes genéticas.....	44
<b>Figura 8.</b> Esquema del procedimiento de preparación de librerías.....	56
<b>Figura 9.</b> Esquema global del estudio mutacional mediante NGS .....	57
<b>Figura 10.</b> Efecto del tratamiento del DNA con uracilo-DNA glicosilasa (UDG) ..	61
<b>Figura 11.</b> Efecto de la antigüedad de la biopsia sobre el límite de detección...61	61
<b>Figura 12.</b> Profundidad de lectura .....	62
<b>Figura 13.</b> Distribución de la clasificación de variantes .....	62
<b>Figura 14.</b> Genes con una frecuencia de mutación observada superior al 5% ...63	63
<b>Figura 15.</b> Coocurrencia o exclusión mutua entre los 25 genes más frecuentes .....	64
<b>Figura 16.</b> Frecuencia mutacional en los genes de la vía de regulación epigenética y transcripcional .....	64
<b>Figura 17.</b> SLP de los 5 genes de la vía epigenética y transcripcional incluidos en el modelo m7-FLIPI.....	66
<b>Figura 18.</b> Distribución de las mutaciones detectadas en <i>ARID1A</i> .....	66
<b>Figura 19.</b> Frecuencia mutacional en los genes de la vía de supervivencia y proliferación celular .....	67
<b>Figura 20.</b> Curvas de supervivencia en función del estado mutacional del gen <i>BCL2</i> .....	67
<b>Figura 21.</b> Mutaciones detectadas en el gen <i>BCL2</i> .....	68
<b>Figura 22.</b> Distribución de mutaciones y curvas de supervivencia para el gen <i>STAT6</i> .....	69
<b>Figura 23.</b> Frecuencia mutacional en los genes de la vía de respuesta inmunológica .....	70
<b>Figura 24.</b> Mutación hotspot y curvas de supervivencia del gen <i>CTSS</i> .....	70
<b>Figura 25.</b> Frecuencia mutacional en los genes de la vía de señalización BCR ...71	71
<b>Figura 26.</b> SLP de los 2 genes de la vía de señalización BCR incluidos en el modelo m7-FLIPI.....	71
<b>Figura 27.</b> Frecuencia mutacional en los genes de la vía de señalización mTORC1 .....	72
<b>Figura 28.</b> Curvas de supervivencia libre de progresión de la vía mTORC1 .....	73
<b>Figura 29.</b> Frecuencia mutacional en los genes de la vía de migración celular ..74	74

**Figura 30.** Curvas de supervivencia de los genes *GNA13* y *GNAI2*.....74  
**Figura 31.** Representación global (oncoplot) de las alteraciones detectadas ....75  
**Figura 32.** Supervivencia y mutaciones según el estado de anti-HBc.....76

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Gradación histológica del LF.....	18
<b>Tabla 2.</b> Índices pronósticos FLIPI y FLIPI 2 .....	22
<b>Tabla 3.</b> Genes implicados en la desregulación epigenética.....	25
<b>Tabla 4.</b> Genes implicados en señales de supervivencia y proliferación .....	30
<b>Tabla 5.</b> Genes implicados en la evasión inmune .....	32
<b>Tabla 6.</b> Listado de genes incluidos en el panel de NGS .....	54





## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>AID</b>	<i>Activation Induced Cytosine Deaminase</i>
<b>BCL6</b>	<i>B cell lymphoma 6</i>
<b>BCR</b>	<i>B cell receptor</i> (receptor de células B)
<b>células CAR-T</b>	células T con receptor de antígeno quimérico
<b>células T<sub>FH</sub></b>	células T <i>helper</i> foliculares
<b>ctDNA</b>	DNA tumoral circulante
<b>CG</b>	centro germinal
<b>CNA</b>	<i>copy number alterations</i> (alteraciones del número de copias)
<b>CR30</b>	respuesta completa a los 30 meses
<b>ECOG</b>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FISH</b>	hibridación <i>in situ</i> fluorescente
<b>FLEX</b>	<i>Follicular Lymphoma Evaluation Index</i>
<b>FLIPI</b>	<i>Follicular Lymphoma Prognostic Index</i>
<b>IHQ</b>	inmunohistoquímica
<b>IL-4</b>	interleucina 4
<b>indel</b>	inserciones/deleciones
<b>IQT</b>	inmunoquimioterapia
<b>LDCGB</b>	linfoma difuso de células grandes B
<b>LF</b>	linfoma folicular
<b>LFt</b>	linfoma folicular transformado
<b>LNH</b>	linfoma no-Hodgkin
<b>LOD</b>	<i>limit of detection</i> (límite de detección)
<b>LOH</b>	<i>loss of heterozygosity</i> (pérdida de heterocigosidad)
<b>MHC</b>	compuesto mayor de histocompatibilidad
<b>mTORC1</b>	mammalian target of rapamycin complex 1 (mTOR complex 1)
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i> (secuenciación de nueva generación)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>POD24</b>	progresión de la enfermedad en los primeros 24 meses
<b>POD24-PI</b>	<i>Progression of Disease within 24 months-Prognostic Index</i>
<b>PRIMA-PI</b>	<i>PRIMA-prognostic index</i>
<b>R</b>	rituximab
<b>R-B</b>	rituximab y bendamustina
<b>R-CHOP</b>	rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona
<b>R-CVP</b>	rituximab, ciclofosfamida, vincristina y prednisona
<b>R-FC</b>	rituximab, fludarabina y ciclofosfamida
<b>SFL</b>	supervivencia libre de fallo
<b>SHM</b>	hipermutación somática
<b>SLP</b>	supervivencia libre de progresión
<b>SNP</b>	<i>single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleótido único)

<b>SNV</b>	<i>single nucleotide variant</i> (variante de nucleótido único)
<b>TMB</b>	tumor mutational burden (carga mutacional tumoral)
<b>UDG</b>	uracilo-DNA glicosilasa
<b>VAF</b>	<i>variant allele frequency</i> (frecuencia alélica)
<b>WGS</b>	<i>whole genome sequencing</i> (secuenciación del genoma completo)

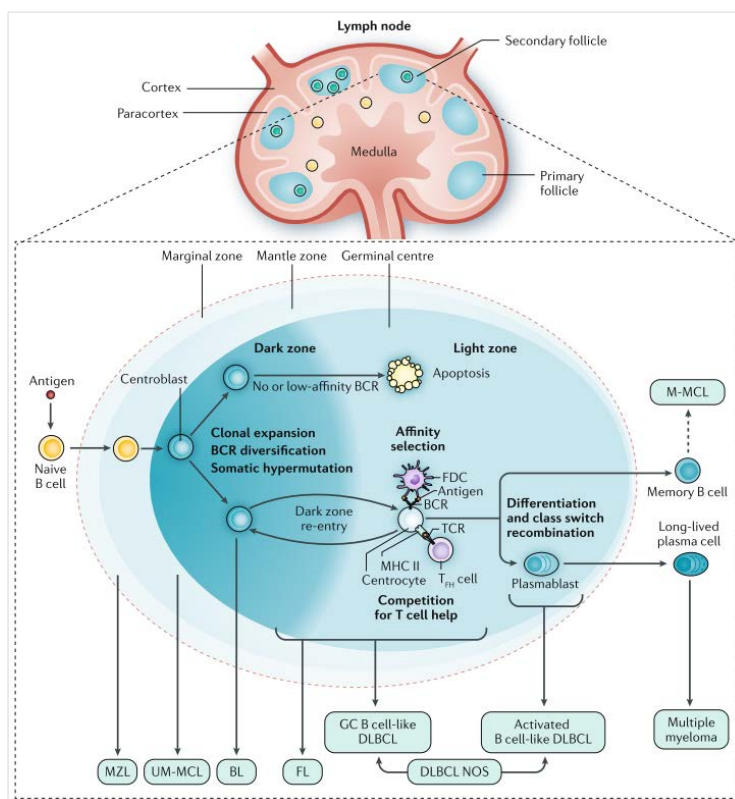
## **INTRODUCCIÓN**



## GENERALIDADES DEL LINFOMA FOLICULAR

### ► Clasificación

La clasificación de la OMS agrupa los linfomas en neoplasias de células precursoras y neoplasias de células maduras. Las neoplasias de células maduras, comprenden linfomas de células B, de células T y linfoma de Hodgkin<sup>1</sup>. Los linfomas B, que agrupan más de 30 entidades y subtipos, se nombran de acuerdo con la localización del tipo de célula implicada dentro del folículo linfoide (Figura 1).



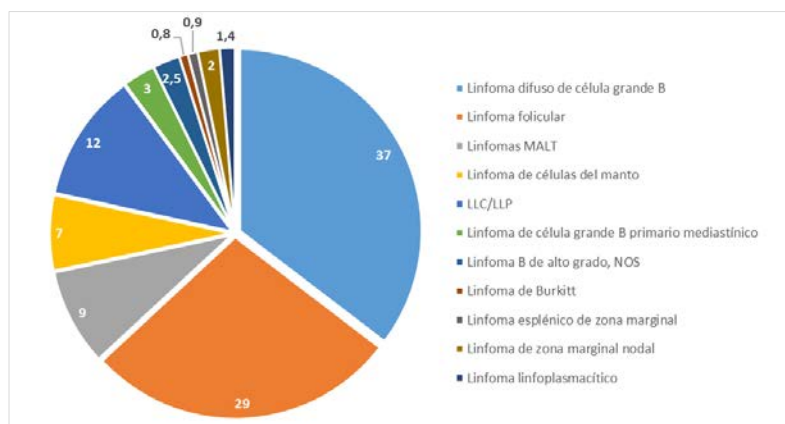
**Figura 1. Origen de los linfomas de células B maduras**

Desde la célula B *naive* hasta la célula B de memoria, la mayoría de los estados de diferenciación se asocian con un subtipo maligno de célula B definido como célula de origen (COO) en base a la definición histológica clásica y al perfil de expresión génica. El COO asume que las neoplasias de células B están bloqueadas en un determinado estado de diferenciación, procedentes de una localización particular del folículo linfático.

MZL: linfoma de células del manto; BL: linfoma de Burkitt; FL: linfoma folicular; DLBCL: linfoma difuso de células grandes B.

Reproducido con permiso de Carbone A *et al*, 2019<sup>2</sup>

Así, el linfoma folicular (LF) es un linfoma de células B foliculares, considerado el equivalente maligno de las células B del centro germinal (CG), siendo el segundo subtipo más frecuente de linfomas no-Hodgkin (LNH), después del linfoma difuso de célula grande B (LDCGB) (Figura 2). A parte del LF clásico, se reconocen 3 variantes: neoplasia folicular *in situ*, LF de tipo duodenal y LF testicular.



**Figura 2. Frecuencia de los linfomas de célula B en adultos**

Adaptada de Swerdlow SH *et al*, 2017<sup>1</sup>

### ► Epidemiología

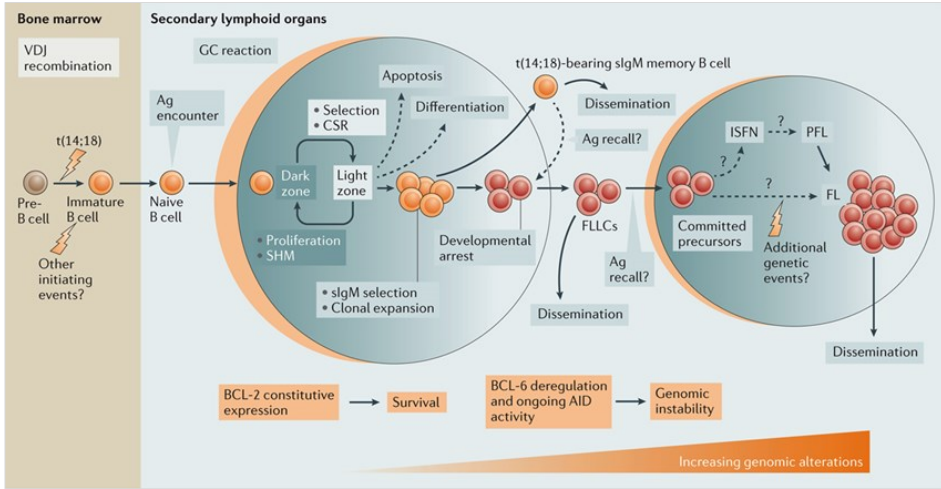
Los linfomas son el grupo de enfermedades hematológicas de mayor incidencia y la séptima causa de cáncer en países occidentales, representados mayoritariamente por LNH. La incidencia de LNH se estima en 2-4 por 100.000 años-persona y en España se diagnostican en torno a 5.000 nuevos casos cada año<sup>3,4</sup>. La incidencia del LF varía según la etnia y región geográfica, suponiendo el 20-40% de los LNH en países occidentales, mientras que esta incidencia puede ser 3 veces menor en Asia y países en desarrollo<sup>5</sup>. El LF es ligeramente más común en hombres que en mujeres (ratio 1,2:1) y es más común en mayores, con un rango de mediana de edad al diagnóstico de 60-65 años. Los casos pediátricos son raros, y suponen una entidad diferente desde la revisión de la clasificación de la OMS en 2016<sup>6</sup>. En cuanto a la mortalidad, los LNH ocupan el noveno puesto de causa de muerte por tumor en ambos sexos, representando un 3% del total de muertes por cáncer<sup>4</sup>.

### ► Linfomagénesis y características biológicas

La linfomagénesis del LF es un proceso largo y complejo que engloba diferentes pasos que tienen lugar a través de varias etapas de la diferenciación de las células B, lo que lleva a una gran heterogeneidad intratumoral y entre pacientes. La adquisición de la translocación  $t(14;18)(q32;q21)$ , detectada en más del 85% de los pacientes, tiene lugar en la médula ósea en el estado de célula pre-B y se considera el primer *hit* oncogénico. Ocurre como resultado del fallo en la reparación durante el proceso de recombinación VDJ, mecanismo genético que recombina las regiones del *loci* que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas para crear el repertorio de diversidad de receptores de células B. Este evento temprano coloca al proto-oncogén *BCL2* bajo el control transcripcional de la región reguladora de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*), lo que conduce a la expresión constitutiva de la proteína anti-apoptótica BCL2 y favorece la adquisición de nuevos eventos oncogénicos<sup>7</sup>. Sin embargo, la  $t(14;18)$  no es suficiente para la progresión del tumor, ya que hasta un 90% de individuos sanos que no desarrollan LF presentan un bajo número de células B con esta translocación<sup>8,9</sup>.

Una fracción de las células portadoras de la  $t(14;18)$ , probablemente condicionadas por otros eventos tempranos como la desregulación de modificadores epigenéticos, formarían una población clonal de células B atípicas en expansión que comparten las características genóticas y fenotípicas de las células del LF. Esta célula B *naive* sería estimulada por un antígeno, lo que la conduce a la reacción del centro germinal (CG) en el ganglio linfático (Figura 3). El centro germinal (CG) aporta un contexto único para la adquisición de mutaciones oncogénicas que pueden llevar a la transformación maligna, ya que aquí las células sufren los procesos de hipermutación somática y cambio de isotipo (que implican roturas de DNA de cadena simple y doble), combinando una tasa muy elevada de proliferación celular (superior a la de la mayoría de tumores) con un estado permisivo para el daño a DNA, por la actividad de AID (*activation-induced cytidine deaminase*) y de BCL6 (*B cell lymphoma 6*)<sup>11</sup>. Esta inestabilidad genómica induciría la adquisición de alteraciones genómicas adicionales y la expansión clonal<sup>10,12,13</sup>.





**Figura 3. Etapas tempranas de la linfomagénesis folicular**

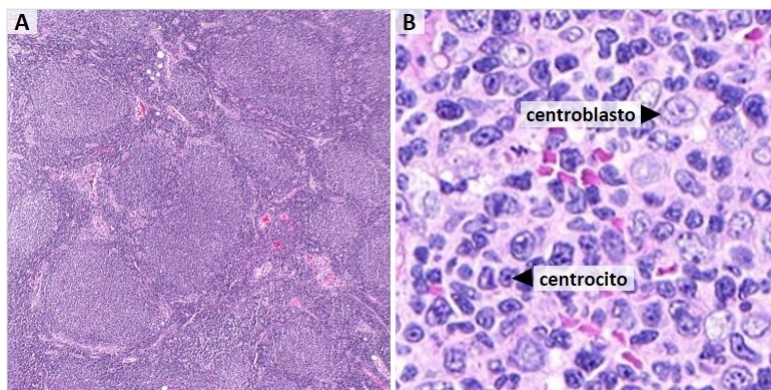
Al ser activada por un antígeno (Ag), la célula B entra en el centro germinal (CG), diferenciándose en centroblasto, y sufre el proceso de expansión clonal, en la zona oscura. Durante la proliferación, el proceso de hipermutación somática (SHM) introduce modificaciones en la región variable de las inmunoglobulinas (*IGHV*). Los centroblastos se diferencian en centrocitos y se dirigen hacia la zona clara. Las células B normales con inmunoglobulinas de alta afinidad se seleccionan para su consecuente diferenciación, sufren el proceso de cambio de clase o isotipo (CSR) y salen de la reacción del CG, mientras las no seleccionadas, al carecer de señales de supervivencia, se eliminan por apoptosis. En cambio, las células  $t(14;18)^+$ , son rescatadas por la expresión forzada de BCL2, lo que les permite salir de la reacción del CG como células B de memoria sIgM y pueden sufrir un bloqueo en su desarrollo dando lugar a células LF-like (FCCLs), con activación constitutiva de AID y BCL6. Éstas se pueden diseminar de forma extensiva y viajar entre folículos, la médula ósea y la sangre. Se desconoce si existe un estado pre-LF o algún paso del desarrollo necesario para la aparición de un LF manifiesto.

Reproducido con permiso de Huet S *et al*, 2018<sup>10</sup>

Si bien la translocación de *IGH/BCL2* proporciona una ventaja para la supervivencia, las evidencias indican que son necesarios otros eventos genéticos para el desarrollo del LF. La tecnología de secuenciación masiva (*next generation sequencing* -NGS-) ha permitido grandes avances en el conocimiento de la diversidad genética de esta enfermedad, de forma que ahora conocemos mucho mejor cuáles son las rutas celulares implicadas en su patogénesis, que afectan principalmente a la regulación epigenética, vías de proliferación y supervivencia y de evasión inmune. Pese a estos avances, hoy en día apenas se han podido establecer correlaciones certeras entre mutaciones genéticas y su impacto pronóstico o predictivo. Solamente las mutaciones y pérdidas de *TP53*, que afectan al ~5% de los pacientes en el momento del diagnóstico, se han validado como factor de peor pronóstico y mayor riesgo de progresión y transformación histológica<sup>14-16</sup>. Las mutaciones activadoras recurrentes o *hotspot* en el gen *EZH2*,

que afectan aproximadamente al 20% de los pacientes, suponen en el primer marcador molecular que pasa a formar parte de las guías de tratamiento para el LF, tras la aprobación a mediados del 2020 del tazemetostat, un inhibidor de la metil-transferasa de histonas EZH2<sup>17-19</sup>. Las alteraciones moleculares implicadas en el LF se desarrollan de forma más extensa en el apartado “Patogénesis y alteraciones moleculares en el linfoma folicular”.

La historia natural del LF se asocia a la progresión histológica en el patrón y tipo celular. Histológicamente, el LF está compuesto por células del centro germinal que muestran un patrón de crecimiento folicular (nodular), que tiende a ser más difuso en el momento de la progresión de la enfermedad, con una proporción variable de centrocitos y centroblastos. Morfológicamente, los centrocitos son células de tamaño pequeño o mediano con núcleo hendido o irregular y escaso citoplasma, mientras que los centroblastos son células de gran tamaño, de núcleo redondo u oval con cromatina abierta y nucleolos.



**Figura 4. Histología del linfoma folicular**

**A:** Imagen a medio aumento de un corte histológico (H-E) de linfoma folicular, mostrando el patrón de crecimiento nodular. **B:** Detalle a gran aumento de las células que componen el linfoma folicular.

El número de centroblastos define el grado del LF (Tabla 1). El recuento microscópico se basa en el número absoluto de centroblastos en 10 folículos neoplásicos, expresado por campo de gran aumento. Se debe incluir el porcentaje estimado en el informe histológico, teniendo en cuenta que, si la biopsia es pequeña, la ausencia de folículos puede llevar a error. La mayor parte de los casos corresponden a LF de bajo grado (grados 1 y 2) y pocos estudios han comparado

la frecuencia del grado 3A vs 3B (alto grado). Sin embargo, los LF de grado 3B puro son raros, y la mayoría de los casos contienen áreas difusas compuestas principalmente por centroblastos, que conforman el LDCGB, entidad de peor pronóstico. Cabe remarcar que la variación en el grado citológico es un *continuum* y por tanto es difícil establecer criterios morfológicos precisos para la subclasificación.

**Tabla 1. Gradación histológica del LF**

Grado	Centroblastos por CGA	Índice Ki67	Observaciones citogenéticas y fenotípicas
1	0-5	<20%	Hasta en un 90% de casos el tumor expresa CD10 y BCL2 y muestra translocación de BCL2
2	6-15	<20%	Hasta en un 90% de casos el tumor expresa CD10 y BCL2 y muestra translocación de BCL2
3A	>15	>20%	Presencia de centrocitocitos. Hasta en un 75% de casos el tumor expresa CD10 y BCL2 y muestra translocación de BCL2
3B	>15	>20%	Presencia de áreas difusas de centroblastos. En pocos casos el tumor expresa CD10 y BCL2 y muestra translocación de BCL2

CGA: campo de gran aumento

Adaptado de Swerdlow SH *et al*, 2017<sup>1</sup> y Choi SM *et al*, 2018<sup>20</sup>

Es frecuente (25-60% de los casos) que, durante el transcurso de la enfermedad, el LF se transforme en un linfoma de células grandes más agresivo (LFt), con características histológicas similares a las del LDCGB, que requiere de rebiopsia para su confirmación<sup>21-23</sup>. El LFt se asocia con una progresión más rápida de la enfermedad, resistencia al tratamiento y peor pronóstico. Conlleva la adquisición de alteraciones genéticas adicionales, como la translocación de los genes *MYC* o *BCL6* y la desregulación de genes supresores de tumores como *TP53*<sup>24-26</sup>.

Mediante inmunohistoquímica (IHQ), el inmunofenotipo típico observado en las células tumorales del LF es BCL2<sup>+</sup>, BCL6<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD23<sup>+/-</sup>, CD43<sup>-</sup> y ciclina D1<sup>-</sup>. El índice de proliferación Ki67 generalmente se correlaciona con el grado histológico, asociándose un índice >30% con un comportamiento clínico más agresivo, aunque no tiene implicación en el manejo terapéutico<sup>20</sup>. Otras variantes fenotípicas parecen tener significado pronóstico, como el LF CD10<sup>-</sup> y MUM1/IRF4<sup>+</sup>. Estos casos suelen ser de mayor grado y carecer de la translocación de *BCL2*<sup>27</sup>.

El *background* de linfocitos que constituyen la mayor parte del microambiente muestran marcadores de células T, como CD3. Pero también el resto de células ganglionares forman parte del microambiente tumoral del LF, incluyendo los diferentes tipos de células linfoides inmunocompetentes, las células del estroma y los componentes de la matriz extracelular. Así, las células tumorales del LF proliferan en un microambiente similar al del centro germinal, lo que permite que, a diferencia de casi todos los linfomas y otros tumores, éstas crezcan en una estructura tridimensional permanente (folículos), con interacciones similares a las de una reacción inmune normal<sup>28</sup>. Habitualmente, los tumores seleccionan las alteraciones genómicas que promueven su crecimiento e impiden el reconocimiento inmune de las células tumorales; sin embargo, en el LF, las células B malignas acumulan alteraciones genómicas que favorecen interacciones con células inmunes pro-cancerosas para mantener su proliferación, mientras escapan a la vigilancia inmune. El estudio del microambiente tumoral es un campo de interés creciente en el LF, ya que se han descrito implicaciones pronósticas y puede revelar nuevas dianas terapéuticas que puedan usarse como adyuvantes en inmunoterapia<sup>29-31</sup>. Una de las principales limitaciones de estos estudios es la ausencia de modelos funcionales, ya que existe una gran dificultad para propagar líneas celulares de LF, al requerir de la interacción del microambiente incluso en el crecimiento *in vitro* a corto plazo.

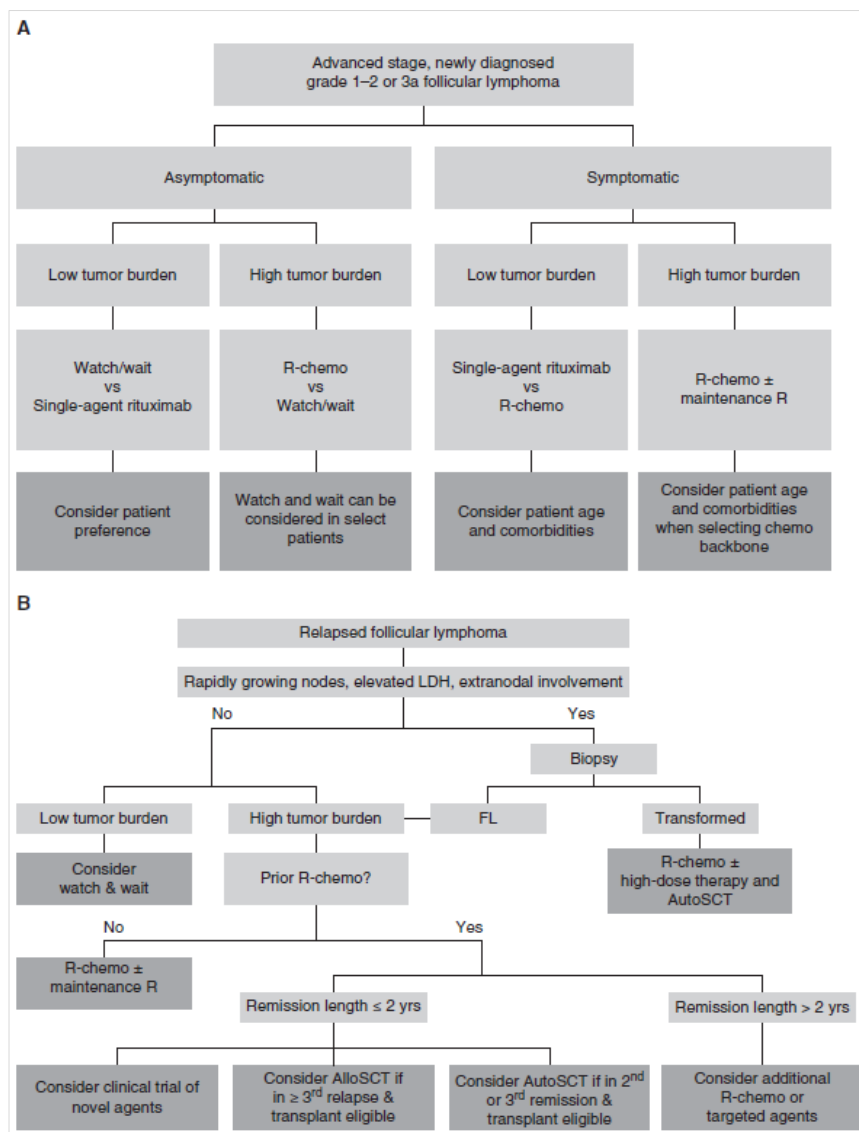
#### ▸ Manejo y pronóstico

El LF se considera el prototipo de linfoma indolente. Su curso clínico se caracteriza por remisiones y recurrencias sucesivas, cada vez más cortas. Aunque gracias a los nuevos tratamientos el curso clínico es prolongado, con una supervivencia global actualmente superior a los 15 años y una esperanza de vida similar a la de la población general, se considera una enfermedad incurable y la mayoría de los casos mueren por linfoma. Sin embargo, este curso clínico es ampliamente variable y difícil de predecir. Un 20-30% de casos son refractarios al tratamiento o bien progresan en los primeros 2 años desde el inicio del tratamiento (POD24). Estos pacientes con fallo precoz tienen un especial mal pronóstico y presentan una supervivencia global mediana inferior a los 4 años<sup>32-</sup>

Para el estudio de extensión de los LNH se utiliza el sistema de estadificación de Ann Arbor, que establece 4 estadios (I a IV) en función de la extensión anatómica de la enfermedad. Si bien tiene limitaciones para su aplicación en LNH, permite separar en dos categorías con impacto pronóstico: enfermedad localizada o regional (estadios I y II) y enfermedad avanzada (estadios III y IV)<sup>35,36</sup>. El LF se suele presentar en ganglios linfáticos supradiafragmáticos y abdominales, pero sólo el 15-25% de casos muestran enfermedad localizada al diagnóstico. La mayoría de los pacientes presentan enfermedad diseminada que afecta a la médula ósea (40-70% de los casos) y, menos frecuentemente, a otros órganos como bazo o hígado. Pese a ello, habitualmente son asintomáticos<sup>1</sup>.

El manejo terapéutico de los pacientes con LF cubre desde la observación sin tratamiento (*watch and wait*) hasta el trasplante. Durante casi 40 años, la quimioterapia citotóxica fue el tratamiento habitual, hasta la aprobación en primera línea del rituximab (R), un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20, en 1997<sup>37</sup>. La introducción del rituximab permitió mejorar de forma significativa la tasa respuesta y la supervivencia libre de progresión. Actualmente, el rituximab es el tratamiento más utilizado, sólo o en combinación con otros agentes quimioterápicos (inmunoquimioterapia, IQT)<sup>38-45</sup>. Las combinaciones más comunes son R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona), R-CVP (rituximab, ciclofosfamida, vincristina y prednisona) y R-B (rituximab y bendamustina). La elección del tratamiento es altamente individualizada y depende de múltiples factores como el estadio, grado histológico, factores de riesgo, carga tumoral, estado general del paciente y, en última instancia, la disponibilidad de acceso al fármaco en función de las áreas geográficas (Figura 5).

Los avances se dirigen hacia el tratamiento libre de quimioterapia. Entre las terapias nuevas o emergentes, se encuentran nuevos anticuerpos anti-CD20 (obinutuzumab)<sup>46-48</sup>, anticuerpos biespecíficos (dirigidos a células B y T, mosunetuzumab)<sup>49</sup>, inmunomoduladores (lenalidomida)<sup>50,51</sup>, inhibidores específicos (contra PI3K<sup>52</sup>, BCL2<sup>53</sup> o EZH2<sup>17,18</sup>) e inmunoterapia (anti-PD-L1<sup>54</sup> o células CAR T -*Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy*-<sup>55,56</sup>).



**Figura 5. Algoritmo de tratamiento en linfoma folicular**

**A:** Pacientes con LF de nuevo diagnóstico grado 1-3a (los pacientes de grado 3b generalmente se tratan como LDCGB). **B:** Pacientes con LF recurrente.

Reproducido con permiso de Kahl *et al*, 2016<sup>57</sup>

Debido a la marcada heterogeneidad del curso clínico y a la incorporación de nuevos tratamientos, existe una importante necesidad de disponer de herramientas pronósticas que permitan identificar al diagnóstico pacientes de alto riesgo que puedan requerir un tratamiento más agresivo y, por otro lado, para evitar sobre-tratar a los de bajo riesgo. Se han propuesto múltiples modelos para predecir el pronóstico de los pacientes. Los más ampliamente utilizados son el

sistema FLIPI (*Follicular Lymphoma Prognostic Index*) y el FLIPI 2 (actualización en base al tratamiento con rituximab), que establecen 3 grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) según factores de riesgo clínicos (Tabla 2)<sup>58-60</sup>. Ante las limitaciones de estos sistemas para predecir el riesgo, se continúan haciendo esfuerzos por mejorar los índices pronósticos. En 2018 se generó un modelo pronóstico simplificado a partir de los hallazgos del estudio PRIMA (PRIMA-PI), usando los niveles de  $\beta_2$ -microglobulina y la afectación de la médula ósea, aunque aún no ha sido validado de forma generalizada en estudios prospectivos<sup>61,62</sup>. En 2020 se propuso el nuevo índice FLEX (*Follicular Lymphoma Evaluation Index*), que incluye 9 variables clínicas y establece 2 grupos de riesgo<sup>63</sup>.

**Tabla 2. Índices pronósticos FLIPI y FLIPI 2**

Parámetro	Definición de factores de riesgo*	
	FLIPI	FLIPI 2
<b>Ganglios</b>	>4 afectaciones ganglionares	Diámetro del ganglio mayor de >6 cm
<b>Edad</b>	>60 años	>60 años
<b>Marcador suero</b>	LDH elevada	$\beta_2$ microglobulina elevada
<b>Estadio</b>	Avanzado (III-IV Ann Arbor)	Médula ósea afectada
<b>Hemoglobina</b>	<12g/dl	<12g/dl

\*0-1 factores: riesgo bajo; 2 factores: riesgo intermedio; 3-5 factores: riesgo alto

Adaptado de Solal-Céligny P *et al*, 2004<sup>58</sup>; Federico M *et al*, 2009<sup>60</sup>

Los avances en el conocimiento biológico de la enfermedad han propiciado durante los últimos años el desarrollo de nuevos modelos de estratificación del riesgo que incluyen marcadores moleculares. La propuesta más relevante en este ámbito es el sistema denominado m7-FLIPI, un modelo clínico-genético publicado en 2015 que incorpora el estado mutacional de 7 genes recurrentemente mutados en LF (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* y *CARD11*) junto con el FLIPI y la escala de estado funcional en cáncer (*performance status*, de acuerdo a la escala ECOG -*Eastern Cooperative Oncology Group*-)<sup>64</sup>. Cuatro de los factores del sistema m7-FLIPI, incluyendo el FLIPI y las mutaciones en *EZH2*, *EP300* y *FOXO1*, forman parte también del *Progression of Disease within 24 months Prognostic Index* (POD24-PI), específicamente diseñado para predecir el POD24<sup>65</sup>. También Huet y colaboradores publicaron en 2018 un predictor de la estratificación del riesgo basado en la expresión de 23 genes usando RNA de biopsias al diagnóstico parafinadas<sup>66</sup>. Si bien estos sistemas mejoran respecto al FLIPI la capacidad de estratificar grupos de pacientes de

acuerdo a la respuesta clínica, encuentran dificultades para su implementación; no existen estudios que hayan evaluado su utilidad con carácter prospectivo ni tampoco son útiles a la hora de tomar decisiones en cuanto a la elección del tratamiento y además, su uso está limitado, puesto que los marcadores moleculares identificados no se evalúan actualmente en la práctica estándar<sup>67-72</sup>. En resumen, no existen todavía herramientas robustas que permitan predecir al diagnóstico qué pacientes se encuentran ante un mayor riesgo de progresión para apoyar la toma de decisiones terapéuticas.



## PATOGÉNESIS Y ALTERACIONES MOLECULARES EN EL LINFOMA FOLICULAR

Previo a la llegada de las técnicas de NGS, a finales de los años 2000, el estudio del genoma del LF se había caracterizado mediante técnicas de menor resolución, como la citogenética convencional, hibridación genómica comparada o *SNP-arrays*, que llevaron a la identificación de anomalías cromosómicas recurrentes, como las pérdidas de 1p36 (*TNFRSF14*), 3q (*BCL6*), 6q (*TNFAIP3*, *SESNI*) y 9q (*CDKN2A*) y las ganancias de los cromosomas 7, 18 y  $X^{73-77}$ . Tras 10 años de investigación usando técnicas de NGS, actualmente tenemos una imagen casi completa de las alteraciones que afectan al genoma de esta enfermedad. En línea con el modelo de patogénesis multi-*hit* en el LF, se han podido identificar lesiones genéticas candidatas a promover la evolución clonal más allá de las translocaciones fundadoras de *BCL2*. Aunque algunas de las alteraciones somáticas identificadas pueden representar alteraciones pasajeras, la complejidad de los hallazgos genómicos sugiere que la patogénesis del LF es el resultado de múltiples disrupciones biológicas<sup>24,78-82</sup>. A continuación, se resumen las principales vías implicadas en la patogénesis del LF y sus alteraciones moleculares más frecuentes (presentes al menos en un 10% de casos).

### ▸ Desregulación epigenética

La disrupción de enzimas que actúan como reguladores epigenéticos supone el mecanismo central en el LF (así como en otros linfomas del CG), detectándose prácticamente en todos los pacientes. La conformación de la cromatina está determinada por un equilibrio dinámico entre marcas de activación y represión de histonas localizadas en regiones promotoras y *enhancers* de genes, que controlan su transcripción. En la Tabla 3 se recogen las alteraciones genéticas más recurrentes en esta vía. Las mutaciones afectan principalmente a los genes que codifican *KMT2D* (también conocida como *MLL2*) y *EZH2* (metil-transferasas de histonas) y *CREBBP* y *EP300* (acetil-transferasas de histonas -homólogas-). Las mutaciones deletéreas en *KMT2D*, *CREBBP* y *EP300* llevan a la pérdida de marcas de activación de la transcripción, mientras que las mutaciones activadoras en *EZH2* (*hotspots* Tyr646, Ala682 y Ala692, en el dominio catalítico),

incrementan marcas que reprimen la transcripción. La regulación activa de estas marcas, siguiendo señales internas y del entorno, permite que las células B sufran rápidos cambios transcripcionales y fenotípicos durante el proceso de diferenciación. Estos cambios son pleiotrópicos y favorecen el mantenimiento del estado de célula B del CG, mientras promueven vías de supervivencia como CD40, NF- $\kappa$ B, JAK-STAT, TLR y señalización a través del receptor de células B (BCR)<sup>83-89</sup>.

**Tabla 3. Genes implicados en la desregulación epigenética**

Gen	Frecuencia	Relevancia biológica	Relevancia clínica
<b><i>KMT2D</i></b>	65-80%	Descenso de la actividad metil-transferasa de histona H3K4, descenso de expresión de genes supresores que controlan vías de activación de células B. Alteración de centros germinales. Promoción de proliferación de células B y linfomagénesis.	Incierta
<b><i>CREBBP</i></b>	60-75%	Descenso de la actividad acetil-transferasa de histonas H3K27 y H3K18. Desregulación de genes de señalización de células B y de respuesta inmune, promoviendo escape inmune. Expresión elevada de MYC. Inactivación funcional de TP53, activación de BCL6. Promoción de linfomagénesis.	Componente del m7-FLIPI (menor SLF). Asociado a menor SLP (incierto, posible impacto clínico diferente según el tipo de mutación).
<b><i>Histonas</i></b>	20-40%	Incierta. Posible desorganización de la cromatina, alteración transcripcional.	Incierta
<b><i>EZH2</i></b>	20%	Incremento de la actividad metil-transferasa H3K27 por mutaciones activadoras recurrentes. Represión transcripcional, activación de la vía mTORC1. Esencial para el bloqueo de la célula en estado de CG y promoción de linfomagénesis.	Componente del m7-FLIPI (mayor SLF). Asociado a mayor SLP. Marcador predictivo para el tratamiento con tazemetostat.
<b><i>EP300</i></b>	10-20%	Estructural y funcionalmente homólogo a <i>CREBBP</i> .	Componente del m7-FLIPI (menor SLF).
<b><i>BCL7A</i></b>	10-15%	Forma parte del complejo remodelador del nucleosoma. Relevancia de mutaciones incierta. Posible desorganización de la cromatina. Recientemente descrito como supresor tumoral en LDCGB.	Incierta
<b><i>ARID1A</i></b>	10-15%	Forma parte del complejo remodelador del nucleosoma. Mutaciones truncantes de relevancia incierta. Posible desorganización de la cromatina, alteración de la reparación del DNA y de la transcripción.	Componente del m7-FLIPI (mayor SLF).

SLF: supervivencia libre de fallo; SLP: supervivencia libre de progresión.

Referencias: 10,18,94-96,64,80,82,83,90-93

Además, análisis filogenéticos de la progresión del LF destacan que las mutaciones en *KMT2D* y *CREBBP* son probablemente eventos oncogénicos tempranos presentes en las células precursoras pre-LF, que podrían coocurrir o

incluso preceder a la aparición de la translocación t(14;18)<sup>78,84,90</sup>. En 2020 se aprobó por la *Food and Drug Administration* (FDA) el tazemetostat, un inhibidor oral de EZH2, que está indicado en pacientes con LF en recaída o refractarios portadores de mutaciones activadoras de EZH2, que hayan recibido dos líneas previas de tratamiento o bien en pacientes en recaída o refractarios que no tienen opciones alternativas de tratamiento satisfactorias<sup>18</sup>. Así, EZH2 pasa a ser el primer marcador molecular predictivo en LF.

Las mutaciones en la familia de genes de histona H1 (*HIST1H1 B-E*) y en genes que intervienen en el complejo remodelador del nucleosoma (*ARID1A/B*, *BCL7A* y *SMARCA4*) se encuentran también entre los eventos más frecuentes. Aunque su implicación es menos conocida, podrían modificar la cromatina a nivel estructural, alterando la accesibilidad de las enzimas modificadoras de histonas y procesos como la transcripción, replicación y reparación del DNA<sup>10,80,82,96</sup>. En el caso de *ARID1A*, se le atribuye un papel como supresor tumoral, ya que se encuentra afectado principalmente por mutaciones deletéreas que afectan a los mecanismos de reparación del DNA, provocando una elevada inestabilidad genética<sup>97,98</sup>.

### ▸ Señales de supervivencia y proliferación

#### Vía de señalización del receptor de células B

La vía de señalización del receptor de células B (BCR) es también clave en la patogénesis del LF. Pese a la translocación t(14;18) y el proceso de hipermutación somática aberrantemente activo durante el curso de la enfermedad, las células del LF mantienen la expresión de un BCR funcional en superficie, que resulta necesario para su supervivencia<sup>10</sup>. El mantenimiento selectivo de la IgM de superficie en la mayoría de casos de LF, parece explicarse por el hecho de que un BCR constituido por IgG favorece la diferenciación plasmacítica, mientras que la señalización IgM resulta en una señalización crónicamente activa del BCR, con la consecuente activación de múltiples vías como, PI3K-AKT y MAPK, que promueven la proliferación y supervivencia de las células B del CG y las tumorales<sup>99,100</sup>. *CARD11* es el gen que se encuentra mutado de forma más recurrente en esta vía (10-20% de casos)<sup>101</sup>. Este gen codifica una proteína *scaffold* necesaria para conectar el BCR con la vía NF-κB, y acumula mutaciones

activadoras que inducen señales de proliferación y supervivencia a través de ésta<sup>102-104</sup>. El siguiente gen con más recurrencia de mutaciones es *GNA13*, que codifica la subunidad  $\alpha 13$  de la proteína G ( $G\alpha 13$ ) (5-10% de casos)<sup>90</sup>. Las proteínas G juegan un importante papel en la transducción de señales transmembranal.  $G\alpha 13$  está implicada en la señalización a través de la GTPasa Rho, antagonizando la vía PI3K-AKT e inhibiendo la migración de las células B y confinándolas en el CG, manteniendo así la homeostasis. Por tanto, las mutaciones de pérdida de función en *GNA13* causan la disrupción de este eje, promoviendo la diseminación y supervivencia de las células del LF. Recientemente también se ha descrito que  $G\alpha 13$  regula negativamente la expresión de BCL2 en células de LDCGB, haciéndolas más sensibles a inhibidores de BCL2<sup>105</sup>.

#### **Vía de señalización JAK-STAT**

Las mutaciones el gen *STAT6* (factor de transcripción) se encuentran también entre las más frecuentes (10-20% de casos). Se ha sugerido que la incidencia de estas mutaciones podría estar en relación con la presión selectiva que ejerce la estimulación de las células  $T_{FH}$ , que estimulan la señalización a través de CD40 y secretan abundante IL4, resultando en la activación de la vía JAK-STAT<sup>106,107</sup>. Las mutaciones el gen *STAT6* dan lugar a una activación constitutiva de la vía, gracias a que el factor de transcripción STAT6, cuando está mutado, permanece en el núcleo activando señales de proliferación, independientemente de su fosforilación a través de IL-4-JAK<sup>108</sup>. La presencia de mutaciones activadoras recurrentes (*hotspot* Asp419) es mucho más frecuente (>80% de casos) en el subtipo de LF de predominancia difusa, asociado también con ausencia de t(14;18)<sup>109-111</sup>.

#### **BCL6**

BCL6 es un proto-oncogén que actúa como represor transcripcional, considerado el “director de orquesta” en la iniciación y el mantenimiento de los procesos fisiológicos del CG. Su actividad principal consiste en reprimir genes asociados a la reparación del daño a DNA, como *TP53*, y reclutar complejos co-represores que catalizan amplios cambios epigenéticos. También reprime la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL2, uniéndose a su región promotora<sup>112</sup>. Así,

mantiene en el CG un estado proliferativo y permisivo con la acumulación de lesiones genéticas, necesario para los procesos de SHM y cambio de isotipo, y luego prepara a las células B del CG para su apoptosis, proceso necesario en la selección de células B con inmunoglobulinas de alta afinidad. La desactivación de BCL6 es necesaria para salir de la reacción del CG y permitir la diferenciación terminal de las células B. Esta desactivación está mediada por mecanismos auto-regulatorios de BCL6 a través de la unión con su propias regiones génicas reguladoras, señales del BCR por su interacción con células T y dendríticas foliculares y la actividad represora de las metil-transferasas de histonas CREBBP y EP300<sup>10,113,114</sup>.

En el LF (y en otros linfomas del CG), esta regulación mediada por BCL6 se encuentra alterada por múltiples vías, dando lugar a la sobreexpresión de BCL6 más allá del CG. En primer lugar, el propio gen *BCL6* (3q27) se encuentra translocado en un 15% de casos, en mayor frecuencia en casos de alto grado, involucrando no sólo al gen *IGH* sino multitud de *partners* distintos<sup>115,116</sup>. También es uno de los genes diana del proceso de SHM, acumulando mutaciones en la región 5' no codificante (mayormente sustituciones de nucleótido único), que aunque podrían afectar su auto-regulación, se encuentran también en las células normales del CG y se consideran como un marcador del paso de la célula por el CG<sup>116-118</sup>. Varias de las alteraciones presentes en el LF (anteriormente explicadas), afectan también la regulación de BCL6: BCL2 escapa a su represión debido a la sobreexpresión resultante de la t(14:18)<sup>112</sup>, las frecuentes mutaciones en *CREBBP* y *EP300* también previenen su acetilación e inactivación, a expensas de *TP53*<sup>95,119</sup> y las alteraciones en la vía del BCR previenen su degradación<sup>120</sup>. Una última pieza relevante en esta vía es MEF2B, un factor de transcripción que regula de forma indirecta a BCL6. *MEF2B* se encuentra mutado en un 10-20% de casos, lo que aumenta su actividad transcripcional, resultando en un incremento de expresión de BCL6, a la vez que desregula la migración de las células tumorales<sup>94,121,122</sup>.

## **BCL2**

El gen *BCL2*, además de formar parte de la translocación central t(14:18), presenta mutaciones a lo largo de su secuencia en aproximadamente el 50% de los casos<sup>123</sup>. Durante algunos años, estas mutaciones se asociaron a un mayor riesgo de

transformación y mal pronóstico<sup>24,123</sup>; sin embargo, estudios posteriores no han confirmado estos hallazgos<sup>64,124</sup>.

### Vía de señalización mTORC1

En 2016, Okosun y colaboradores identificaron mutaciones activadoras recurrentes que afectan a la vía de señalización mTOR complex 1 (mTORC1)<sup>80</sup>. mTORC1 induce el incremento de síntesis proteica en respuesta a factores de crecimiento y señales de nutrición. La concentración intracelular de aminoácidos se percibe a través de un súper-complejo en la superficie lisosomal y las mutaciones en LF afectan a los genes que codifican para las proteínas que forman este complejo, principalmente *RRAGC*, *ATP6AP1* y *ATP6V1B2*, activando la vía mTORC1<sup>80,82,125-127</sup>. Un estudio reciente, demuestra que estas mutaciones incrementan de forma moderada la señalización de nutrientes, pero, en sinergia con las células T del microambiente, activan fuertemente la respuesta de las células B a través del eje PI3K-AKT-mTORC1, promoviendo la linfomagénesis<sup>128</sup>. Curiosamente, estas mutaciones son muy infrecuentes en otros tipos de linfomas y tumores, y la adición de las células del LF a esta vía sugiere una interesante oportunidad terapéutica<sup>128,129</sup>. En la Tabla 4 se recogen los genes mutados más recurrentes implicados en estas vías.

### P53 y SESTRIN1

El gen *TP53* codifica para el supresor tumoral más comúnmente alterado en cáncer, a menudo relacionado con mal pronóstico<sup>131</sup>. En LF, un 5% de los casos presentan mutaciones en *TP53*, que se asocian a mayor grado histológico, mal pronóstico y mayor probabilidad de progresión y de transformación histológica<sup>14,15,24,132,133</sup>. Si bien este porcentaje es bajo, en 2017 Oricchio y colaboradores identificaron la relevancia de otro gen supresor tumoral en el LF, *SESN1*, ubicado en el cromosoma 6q, que codifica la proteína SESTRIN1<sup>134</sup>. La función fisiológica de SESTRIN1, previamente caracterizada, consiste en actuar como intermediario entre p53 y mTOR: en condiciones no tumorales, ante una situación de estrés genotóxico (daño a DNA) se activa p53, que induce la activación de SESTRIN1, que a su vez inhibe la vía mTOR, evitando la supervivencia y propagación de la células dañadas<sup>135</sup>. Un 30% de los casos con LF presentan pérdidas de 6q, donde se ubica el gen *SESN1*<sup>76,136</sup>. En el mencionado

estudio, identificaron que *SESNI* se encuentra directamente reprimido por la sobre-activación del regulador epigenético mutado *EZH2*<sup>Y646X</sup>. Esto provoca la disrupción del control mediado por p53 sobre la vía mTORC1, e implica que *EZH2* también ejerce un importante papel en la regulación de este mecanismo<sup>134</sup>.

**Tabla 4. Genes implicados en señales de supervivencia y proliferación**

Gen	Frecuencia	Relevancia biológica	Relevancia clínica
<b><i>BCL2</i></b>	50%	Proteína anti-apoptótica desregulada en el 85% de casos por translocación <i>IGH/BCL2</i> . Mutaciones de implicación incierta.	Incierta.
<b><i>MEF2B</i></b>	10-20%	Factor de transcripción. Las mutaciones provocan desregulación de la expresión de <i>BCL6</i> y de la migración celular.	Componente del m-7FLIPI (mayor SLF).
<b><i>STAT6</i></b>	10-20%	Factor de transcripción. Mutaciones activadoras hotspot en dominio de unión al DNA. Aumento de señalización JAK-STAT a través de IL4.	Incierta.
<b><i>CARD11</i></b>	10-15%	Link entre BCR y NF-κB. Las mutaciones provocan activación constitutiva de la vía NF-κB.	Incierta. Posiblemente asociado a resistencia a inhibidores de BTK.
<b><i>RRAGC</i></b>	10-15%	Miembro de la familia Rag GTPasa, esencial para la activación de la vía metabólica de mTORC1. Mutaciones: activación del eje PI3K-AKT-mTORC1, promoción de linfomagénesis.	Incierta. Posible diana terapéutica ante inhibidores de mTOR.
<b><i>ATP6V1B2</i></b>	10%	Forma parte del complejo V-ATPasa, esencial para la activación de la vía metabólica de mTORC1. Mutaciones: activación del eje PI3K-AKT-mTORC1, promoción de linfomagénesis.	Incierta. Posible diana terapéutica ante inhibidores de mTOR.
<b><i>ATP6AP1</i></b>	10%	Forma parte del complejo V-ATPasa, esencial para la activación de la vía metabólica de mTORC1. Mutaciones: activación del eje PI3K-AKT-mTORC1, promoción de linfomagénesis.	Incierta. Posible diana terapéutica ante inhibidores de mTOR.
<b><i>FOXO1</i></b>	5-10%	Factor de transcripción efector de la vía PI3K-AKT. Retención nuclear de FOXO1 por efecto de mutaciones activadoras, manteniendo señales de supervivencia y proliferación.	Componente del m-7FLIPI (menor SLF). Posiblemente afecta a la sensibilidad de inhibidores de PI3K.
<b><i>CD79A/B</i></b>	5-10%	Forma parte del receptor BCR. Mutaciones: incrementa la expresión de BCR en la superficie de la célula. Contribuye a la activación crónica de la señalización BCR.	Incierta. Posiblemente asociado a sensibilidad incrementada a inhibidores de BTK.
<b><i>GNA13</i></b>	5-10%	Proteína-G que antagoniza la vía PI3K-AKT. Mutaciones: promueven el crecimiento de las células B y su diseminación. Promoción de linfomagénesis.	Incierta. Posiblemente asociado a sensibilidad ante inhibidores de PI3K/AKT y de BCL2.

SLF: supervivencia libre de fallo.

Referencias: 10,64,80,82,90,101,102,108,128,130

### ▸ Evasión inmune

El LF no está dirigido sólo por la proliferación de células B, sino que también se sustenta en el microambiente que lo envuelve, a diferencia de otros tumores.

Mantiene una organización similar a la de los centros germinales, apoyada por las células que lo rodean, como las células dendríticas foliculares y las células *T helper* foliculares ( $T_{FH}$ ),  $CD4^{+28}$ . El microambiente del LF promueve su crecimiento a través de 1) la activación del BCR por la interacción con las células dendríticas y macrófagos<sup>137</sup>, 2) la secreción de citocinas pro-tumorales, como la IL-4, por parte de las células  $T_{FH}^{106}$  y 3) la capacidad de crear un entorno que promueve el escape inmune<sup>114</sup>.

#### **TNFRSF14**

Aproximadamente el 50% de los pacientes con LF presentan mutaciones y/o deleciones (del1p36) inactivadoras en el gen *TNFRSF14* (miembro 14 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, también conocido como *HVEM*)<sup>138</sup>. TNFRSF14 es un receptor ubicado en la superficie de las células B que proporciona señales que inhiben las células T y la señalización del BCR, a través de su interacción con el atenuador de células B y T (BTLA), presente en la superficie de las células  $T_{FH}^{139}$ . De manera que la inactivación de TNFRSF14 tiene un efecto oncogénico, lo que ha llevado a considerarlo un supresor tumoral. Además, la deficiencia de TNFRSF14 induce la activación de citocinas que crean un entorno favorable al tumor, a través del incremento de células  $T_{FH}$  secretoras de IL-4 (entre otras)<sup>140</sup>. Cabe destacar que *TNFRSF14* es el único gen frecuentemente mutado tanto en LF clásico como en el subtipo pediátrico, donde supone la alteración más recurrente<sup>141</sup>. Si bien algunos estudios habían asociado las alteraciones de *TNFRSF14* con un pronóstico adverso, esto no se ha confirmado en estudios más recientes<sup>81,142,143</sup>.

#### **CTSS**

Otro gen que ha tomado relevancia recientemente es *CTSS*, que codifica para la catepsina S, de la familia de las cisteína-proteasas, con un importante rol en el proceso de presentación de antígenos en las células B y el desarrollo del CG<sup>144</sup>. Un 5-10% de casos con LF presentan mutaciones activadoras en este gen (*hotspot* Tyr132, exclusivas del LF), que también puede encontrarse sobreexpresado<sup>78,81,93</sup>. Si bien hace años que se conoce tanto su papel fisiológico en la respuesta humoral y la expansión de las células B como la presencia de esta mutación recurrente, hasta hace muy poco no se había estudiado su actividad en neoplasias



hematológicas. Ahora sabemos que, en el linfoma, CTSS regula el procesamiento de antígenos y la comunicación con las células T<sub>FH</sub>, mientras que limita el reconocimiento por parte de las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>, promoviendo el escape inmune del tumor. Así, la inhibición de CTSS diversifica el repertorio de antígenos presentados y promueve su reconocimiento por parte de las células T citotóxicas, lo que supone una atractiva estrategia de tratamiento para aumentar la inmunogenicidad del tumor<sup>145,146</sup>. Los principales genes mutados en los procesos de evasión inmune se recogen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Genes implicados en la evasión inmune**

Gen	Frecuencia	Relevancia biológica	Relevancia clínica
<b>TNFRSF14</b>	40-50%	Miembro de la familia de receptores TNF. Su disrupción por mutaciones o delección de 1p36 promueve la linfomagénesis e induce un microambiente pro-tumoral.	Incierta. Posiblemente relacionado con mal pronóstico.
<b>CTSS</b>	5-10%	Procesamiento de antígenos y regulación de la comunicación con las células T. Promueve evasión inmune.	Incierta. Posiblemente asociado con menor probabilidad de progresión temprana.

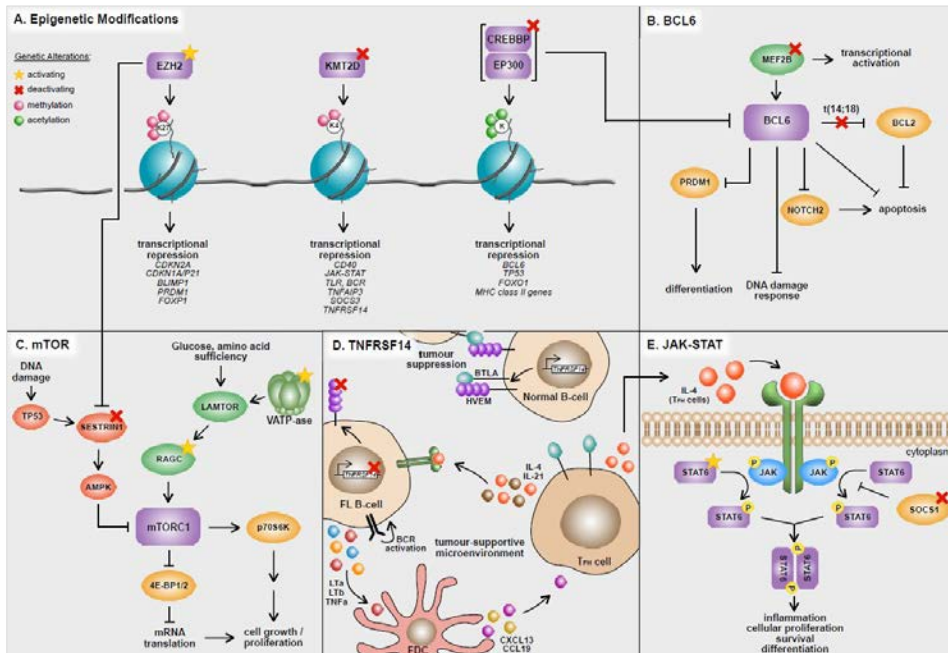
Referencias: 64,78,81,138,140,142,145,146

### **Papel de los reguladores epigenéticos**

Algunos de los principales reguladores epigenéticos (Tabla 3) también tienen una importante implicación en el proceso de evasión inmune en el LF. Las acetiltransferasas de histonas CREBBP y EP300 controlan la expresión del compuesto mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC clase II), inhibiéndolo cuando se encuentran mutadas, de forma que reducen su capacidad de estimulación de las células T<sup>86,90</sup>. Por otra parte, las mutaciones en el gen que codifica la acetiltransferasa EZH2 se han asociado a un mecanismo hasta ahora desconocido en regulación inmune: provocarían que las células B del CG no requieran tanto de la ayuda de las células T, se expandan lentamente en el CG y pasen a depender de las células dendríticas. Es decir, parece que EZH2 reprograma epigenéticamente a las células B para formar un nicho inmunológico aberrante, que explicaría cómo estos tumores surgen de las células B del CG<sup>147</sup>.

Este capítulo recoge los principales mecanismos y alteraciones genéticas implicados en la patogénesis y el desarrollo del LF. Gracias a los métodos de NGS, durante la última década se ha producido un enorme salto en el conocimiento de estos aspectos, demostrando la elevada heterogeneidad molecular en estos

tumores, que afecta múltiples vías de forma intrincada. La Figura 6 muestra un esquema de los mecanismos y alteraciones descritos, que refleja la complejidad molecular de esta entidad.



**Figura 6. Vías moleculares de patogénesis en linfoma folicular**

La complejidad genética del linfoma folicular se caracteriza por **A**: alteraciones en modificadores epigenéticos como EZH2, KMT2D, CREBBP y EP300, junto con alteraciones en diversas vías celulares clave, incluyendo **B**: BCL6, **C**: mTOR, **D**: TNFRSF14 y **E**: JAK-STAT. Las alteraciones genéticas activadoras e inactivadoras se muestran en cada una de estas vías, así como sus respectivos efectos.

Reproducido con permiso de Lackraj T *et al*, 2018<sup>107</sup>

## APLICACIÓN CLÍNICA DE LA NEXT GENERATION SEQUENCING EN LINFOMAS

### ▸ Situación actual

Desde el punto de vista clínico, las técnicas de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing -NGS-), permiten interrogar un gran número de biomarcadores moleculares de forma simultánea en varios pacientes y a un coste asequible. La NGS se ha ido implementando durante los últimos 10 años en la práctica clínica rutinaria, aunque de forma desigual según el tipo de aplicación y cada país. Desde la European Society of Molecular Oncology (ESMO) actualmente se recomienda el uso de NGS como método de rutina para el análisis de diferentes tipos de tumores sólidos. El ejemplo paradigmático de su utilidad es el carcinoma de pulmón de célula no pequeña, por el elevado número de dianas moleculares abordables con terapias dirigidas, lo que hace que estos análisis sean coste-efectivos<sup>148</sup>. La aplicabilidad de la NGS en estos tumores se sustenta, además, en una variada oferta de paneles de genes comerciales validados dirigidos a estas alteraciones diana, unidos a *softwares* de análisis genético dedicados específicamente a este ámbito, así como sistemas de clasificación e interpretación de variantes dedicados a la oncología de precisión, bases de datos y guías clínicas específicas y un importante trabajo de información y educación al respecto<sup>149-151</sup>.

En el ámbito de la onco-hematología, la implementación de la NGS en la rutina clínica se ha llevado a cabo sobre todo en la leucemia mieloide aguda, donde podemos encontrar alteraciones moleculares con implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas, aunque se desaconseja explícitamente su uso en el estudio de enfermedad mínima residual, por no ofrecer suficiente sensibilidad de detección<sup>6,152,153</sup>. En síndromes mielodisplásicos, pese a que actualmente no existe indicación de tratamientos dirigidos contra dianas moleculares, el uso de la NGS ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico, por su elevado valor predictivo negativo y en la detección de casos con predisposición germinal, así como en el pronóstico<sup>154-157</sup>. En el caso de las neoplasias mieloproliferativas, el uso de la NGS se recomienda de forma más restringida, para evaluar el riesgo de

transformación en la mielofibrosis o demostrar clonalidad en casos sin mutaciones *driver*<sup>158,159</sup>.

En linfomas, la aplicación clínica de la NGS está limitada por el limitado número de mutaciones clínicamente relevantes y, sobre todo, por el restringido número de tratamientos dirigidos contra alteraciones moleculares específicas<sup>160-162</sup>. Gracias a los esfuerzos de los últimos años por descifrar la biología de los linfomas, se han desarrollado múltiples agentes dirigidos contra receptores de superficie, vías de transducción de señales y modulaciones epigenéticas, así como estrategias inmunes. Algunos de estos tratamientos se han implementado con éxito en linfomas no-Hodgkin, mejorando el pronóstico de los pacientes, como los inhibidores del proteasoma (linfoma del manto), inhibidores de la tirosinacinasasa de Bruton (BTK; linfoma del manto, leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia de Waldenström), inhibidores de PI3K (linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica, linfoma de la zona marginal), inhibidores de deacetilasas de histonas (linfoma T cutáneo) o células CAR-T (LDCGB y leucemia linfoblástica B). Sin embargo, no se requiere de estudio molecular para estos tratamientos, más allá de las alteraciones en *TP53* (del 17p y mutaciones) en el tratamiento con inhibidores de BTK en leucemia linfática crónica y las mutaciones de *MYD88* en macroglobulinemia de Waldenström<sup>163-166</sup>. Como se ha explicado con anterioridad, el único tratamiento dirigido contra una alteración molecular específica es el tazemetostat, recientemente aprobado por la FDA, indicado en pacientes con LF portadores de mutaciones con ganancia de función del gen *EZH2* (Y646X, A682G o A692V). Aunque en los ensayos clínicos estas mutaciones se evaluaron mediante NGS, el test aprobado actualmente por la FDA está basado en la detección cualitativa mediante PCR alelo-específica en tiempo real (cobas® *EZH2* Mutation Test, Roche)<sup>167</sup>.

Hasta el momento, pocas publicaciones han analizado la utilidad clínica del uso de la NGS en neoplasias linfoides. Un estudio retrospectivo del Moores Cancer Center (Universidad de California) exploró la aplicabilidad terapéutica de la NGS analizando 60 casos con diferentes neoplasias linfoides (incluyendo 5 pacientes con LF), con el objetivo de detectar alteraciones accionables con fármacos aprobados por la FDA y/o en ensayo clínico, mediante el panel FoundationOne Heme<sup>168</sup>. Este panel incluye 405 genes relacionados con cáncer y permite detectar

todo tipo de alteraciones, incluyendo sustituciones de nucleótido único (SNV), inserciones y deleciones (indels), alteraciones del número de copias (CNA), reordenamientos génicos concretos y la carga mutacional tumoral (TMB). El 88% de casos mostraron alteraciones, de los cuales sólo el 5% tenían indicación terapéutica (*on label*), pero el 77% presentaban alguna alteración en una vía potencialmente tratable con fármacos aprobados en otra patología (*off label*) o en ensayo clínico.

En los últimos meses, 3 centros han descrito su experiencia en la aplicación clínica de la NGS en linfomas, con diferentes resultados, pero conclusiones similares. En primer lugar, el University Hospital Basel refleja su experiencia de 3 años, con 80 casos analizados, el 56% de ellos referidos para consulta desde otros centros<sup>169</sup>. Es remarcable la discusión y selección de casos en comité de tumores previa al estudio mediante NGS, de forma que los 80 casos analizados suponían solamente un 1% del total de casos inicialmente considerados. Esta cohorte de 80 casos consistía en neoplasias de células B maduras (56% -8 casos con LF-), neoplasias T y NK (21%), neoplasias de precursores linfoides (9%) y otras entidades (14%). Se utilizó un panel Ampliseq (Ion Torrent) personalizado con 68 genes (20 cubriendo secuencia codificante completa y posiciones de *splicing*, 48 sólo *hotspots*), que permitía detectar SNVs e indels, con un límite de detección del 3% de frecuencia alélica (VAF) para variantes *hotspot* y del 5% para el resto. Se obtuvieron resultados en el 100% de casos, aunque 2 fueron subóptimos por baja cantidad de DNA. En el 79% de los casos se obtuvieron resultados con potencial valor diagnóstico, pronóstico o predictivo, aunque ningún paciente se pudo beneficiar directamente de una terapia dirigida. Aun así, la información obtenida fue relevante sobre todo para el refinamiento del diagnóstico y en el 40% de casos tuvo implicaciones en la toma de decisiones terapéuticas.

Un segundo estudio de University of Michigan Health Systems, incluyó 92 pacientes seleccionados, principalmente casos en recaída o refractarios, con el fin de evaluar nuevas opciones terapéuticas<sup>170</sup>. Un caso quedó excluido por insuficiente contenido tumoral. Los 91 casos restantes estaban representados por linfomas B agresivos (43%), linfomas indolentes (37%, -25 casos con LF-) y linfomas T (20%), que se secuenciaron con un panel de desarrollo propio para estudio del exoma completo y RNA-seq (1700 genes) que permitía detectar SNVs,

indels, CNAs y reordenamientos, con un límite de detección del 5% de VAF, además de estudiar la expresión génica. Se detectaron alteraciones accionables en 60 casos (65%), en 11 de los cuales (12%) se siguió una recomendación de tratamiento basada en los resultados de la secuenciación. Uno de los pacientes alcanzó respuesta completa (LDCGB estadio IV refractario a 3 líneas previas, tratado con lenalidomida, bortezomib y dexametasona tras detectarse mutación de *TNFAIP3*), los otros 10 discontinuaron el tratamiento por toxicidad, progresión o paro clínico del ensayo.

En el tercer estudio, el Hospital of the University of Pennsylvania recoge la experiencia de la aplicación de la NGS en el diagnóstico de 598 casos con neoplasias linfoides maduras (518 pacientes) analizados en el periodo de 1 año, lo que suponía el 55% de casos totales<sup>171</sup>. El panel utilizado fue TruSight Lymphoma 40 kit, que cubre la secuencia codificante completa y posiciones de *splicing* en 9 genes y sólo *hotspots* en 32, y permite detectar SNVs e indels. En 64/598 casos (11%) se canceló el análisis antes de llevarlo a cabo por errores y/o revisión del caso. De los 534 que fueron procesados, 40 no se secuenciaron por insuficiente cantidad o calidad del DNA y otros 23 se excluyeron por no representar neoplasias linfoides, dando un total de 471 muestras analizadas. Estos casos estaban representados mayoritariamente por neoplasias de células B (75%, -43 casos con LF-) y de células T (9%). En un 51% de muestras analizadas se detectaron variantes asociadas a la enfermedad, mientras que en el 18% se detectaron sólo variantes de significado incierto y en el 31% no se detectaron variantes. La detección de mutaciones afectó al diagnóstico en 26/471 casos analizados (5,5%); la mayoría (21/26, 80,8%) resultaron en un refinamiento del diagnóstico ante la necesidad de resolver un diagnóstico diferencial, mientras que en el resto el diagnóstico fue facilitado con mayor confianza en caso de duda (3/26, 11,5%) o bien implicó un cambio de diagnóstico (2/26, 7,7%). En el artículo se señala que los resultados en cuanto al valor pronóstico y terapéutico de estos datos se abordarán en un estudio aparte (aún no publicado).

Estos estudios reflejan una utilidad clínica limitada de la NGS en el contexto actual de las neoplasias linfoides. Aun así, recogen datos técnicos, carencias y evidencias útiles para su futura implementación “universal”, que se considera próxima. Pese a que muchos de los ensayos en el desarrollo de nuevos fármacos

en linfomas todavía no incluyen el estudio mutacional (lo que podría ayudar a predecir las respuestas clínicas y la toxicidad), la identificación de biomarcadores predictivos junto al desarrollo de terapias dirigidas es un campo que asegura el interés y necesidad de aplicar la secuenciación masiva en estas enfermedades.

#### ▸ Retos en la implementación clínica

Como se ha discutido en el apartado anterior, actualmente la principal limitación en la aplicación clínica de las técnicas de NGS en el LF y el resto de linfomas no-Hodgkin, es la escasez actual de terapias dirigidas aprobadas. Esto hace que la caracterización del espectro mutacional en estas enfermedades, si bien puede ser útil en el diagnóstico y aportar información pronóstica de valor, en la gran mayoría de casos no resulta esencial para el manejo de los pacientes, aunque es de esperar que este salto se dé en un futuro próximo con la evolución de nuevos paradigmas diagnósticos y terapéuticos<sup>162</sup>.

Desde el punto de vista técnico, cada paso puede influir en los resultados de NGS: el método de extracción de los ácidos nucleicos, las técnicas de construcción de librerías y enriquecimiento de las regiones génicas de interés, las tecnologías de secuenciación, el tratamiento bioinformático de los datos y la interpretación biológica. La existencia de múltiples abordajes, hace que la estandarización y armonización sean indispensables para obtener resultados fiables y homogéneos para todos los pacientes<sup>161</sup>. A continuación, se abordan aspectos de carácter más técnico, focalizados en las necesidades para la implementación de la NGS en el ámbito de los linfomas.

#### **Elección del panel**

La elección del grupo de genes a estudiar (panel) es un paso crucial. La secuenciación de genomas y/o exomas completos permiten una amplia caracterización genética. Sin embargo, analizar tal cantidad de datos implica un tiempo y unos costes elevados y, al abarcar un gran número de genes, la profundidad de lectura (número de veces que se lee cada posición nucleotídica) es menor, lo que no permite detectar variantes con baja frecuencia alélica con confianza. Por esto, aunque son técnicas cada vez más accesibles, habitualmente se aplican en investigación o en el *screening* de enfermedades genéticas raras<sup>172,173</sup>. Los paneles de genes dirigidos (o *targeted*-NGS) se focalizan en genes o regiones

génicas con una fuerte asociación en la patogénesis de la enfermedad y/o relevancia clínica. De esta forma, permiten optimizar la calidad de los resultados (profundidad y uniformidad de lecturas, sensibilidad de detección y tiempos de respuesta) así como los costes, y son una opción pragmática actualmente y en un futuro previsible. Un panel óptimo debe responder a los requerimientos diagnósticos (positivo y diferencial), pronósticos y teragnósticos de los diferentes subtipos de linfoma, manteniendo la simplicidad suficiente como para su aplicación uniforme.

Como en la mayoría de tumores, las mutaciones patognomónicas son extremadamente raras en los linfomas, aunque si una alteración es mucho más frecuente en ciertos subtipos, puede representar un marcador diagnóstico útil cuando se suma a las evidencias clínicas, histológicas/citológicas e inmunofenotípicas. La influencia del perfil mutacional en la evaluación pronóstica y teragnóstica es un campo que evoluciona rápido, lo que ilustra la necesidad de actualizar este tipo de paneles de forma regular. En 2019, los grupos cooperativos franceses LYSA (LYmphoma Study Association) y GBMHM (Groupe de Biologistes Moléculaires des Hémopathies Malignes) publicaron un panel consenso mínimo de genes a incluir en el estudio de linfomas B (33 genes) y T (11 genes)<sup>161</sup>. Sin embargo, esta propuesta incluye los genes incluidos en el modelo m7-FLIPI como de “impacto pronóstico confirmado” en LF, mientras que estudios posteriores no han validado dicho valor pronóstico bajo los esquemas de tratamiento actuales<sup>67,68</sup>. Las opciones de paneles comerciales disponibles actualmente son muy limitadas en el caso de los linfomas, frente a la oferta muy superior de paneles validados y/o certificados para el diagnóstico *in vitro* en tumores sólidos y neoplasias mieloides. Aunque los paneles personalizados son una opción, implican un trabajo de validación por parte del laboratorio y no siempre se alcanzan resultados óptimos (tras una inversión sustanciosa), lo que genera incertidumbre y puede obstaculizar esta elección<sup>174,175</sup>.

Más allá de los genes a incluir, la elección de un panel de NGS implica otros elementos más técnicos, como el enriquecimiento mediante amplicones versus captura de híbridos con sondas, o el tipo de alteraciones que se pueden detectar. Es común que los paneles de NGS se limiten a la detección de SNVs e indels, ya que tanto la detección de translocaciones cromosómicas como de alteraciones del



número de copias suponen un reto añadido bajo las tecnologías actuales. Sin embargo, éstas alteraciones son frecuentes y relevantes en los linfomas, por lo que sería deseable que se incluyeran en los análisis<sup>174,176</sup>. Algunos estudios han evaluado la detección de translocaciones mediante NGS en linfomas, obteniendo en algunos casos una elevada concordancia con los estudios mediante hibridación in situ fluorescente (FISH), aunque muestra ciertas deficiencias en casos con baja carga tumoral o cuando implican a los genes *MYC* y *BCL6* (promiscuos en cuanto a *partners*)<sup>177,178</sup>. Cabe mencionar que el estudio de los reordenamientos de los receptores B y T supone otra aplicación de la NGS en neoplasias linfoides, aunque se aleja del foco de este trabajo<sup>179-181</sup>.

### **Factores preanalíticos**

En primer lugar, para un uso apropiado y coste-efectivo de los análisis de NGS, son necesarios un triaje y selección de los casos a analizar. Esto se pone de manifiesto en los estudios previamente comentados, donde la utilidad diagnóstica se dio en un 70% de casos cuando se habían revisado previamente en un comité tumoral multidisciplinar (resultando en un 1% de casos elegibles), frente al 5,5% de utilidad cuando no se anticipó el valor diagnóstico<sup>169,171</sup>. Esta selección debe tener en cuenta las dificultades diagnósticas, la evaluación del pronóstico o una intención terapéutica<sup>182</sup>.

El espécimen a analizar es relevante para la tasa de éxito. Se pueden obtener resultados de NGS satisfactorios en linfomas independientemente de si se usa de tejido fijado o en fresco (tanto de exéresis ganglionares como de biopsias por punción), citologías o aspirados medulares, aunque sí se asocia una mayor tasa de fallo en las muestras provenientes de centros externos, donde algunas condiciones preanalíticas quedan fuera de control<sup>171</sup>. Las condiciones de fijación son clave, pues los fijadores mercuriales (como el B5, ampliamente usado en tejido hematopoyético) o con un pH demasiado ácido (como algunos descalcificadores), no conservan adecuadamente los ácidos nucleicos, haciéndolos inservibles para el estudio molecular<sup>183</sup>. Para la conservación del material genético, los fijadores alcohólicos suponen la mejor opción, pero no resultan óptimos para mantener la arquitectura tisular<sup>184,185</sup>. El formol neutro tamponado es el fijador universal, pese a que reacciona directamente con los nucleótidos y las histonas, causando artefactos que pueden afectar a los resultados. La consecuencia más limitante es

la desaminación de citosinas, que convierte las citosinas en uracilos dando lugar a cambios artefactuales en el DNA (C:G>T:A), siendo una fuente de falsos positivos<sup>186</sup>. Para reducir estos artefactos, se recomienda minimizar el tiempo de fijación en formol (3-6 horas). Además, este efecto continúa durante el tiempo de archivo de la pieza, por lo que es recomendable extraer los ácidos nucleicos lo antes posible<sup>187-190</sup>.

Otro de los principales factores asociados al fallo de la NGS es la baja representación tumoral en la muestra, que puede dar lugar a falsos negativos<sup>171</sup>. Esto cobra mayor importancia en el seguimiento y la evaluación de la enfermedad mínima residual, donde se recomienda el uso de técnicas más sensibles, específicas para un marcador, como la PCR cuantitativa en tiempo real. Es necesario que el hematopatólogo seleccione una región tisular representativa del tumor (con un mínimo del 25% de células tumorales) en base a la hematoxilina-eosina y/o tinciones inmunohistoquímicas, descartando posibles áreas necróticas. Disponer del valor del porcentaje tumoral permite además una mejor interpretación de los resultados y puede ser indispensable para analizar alteraciones del número de copias.

Para abordar la heterogeneidad espacial (remarcable en LF) y temporal, propias de la evolución clonal en el cáncer, actualmente podemos estudiar el DNA tumoral libre circulante (ctDNA)<sup>191</sup>. Pese a que el LF se encuentra entre el grupo de linfomas con una baja liberación de ctDNA, varios trabajos han demostrado su impacto pronóstico, y puede ser de gran valor en la recaída de pacientes no biopsiables<sup>192-194</sup>.

### **Análisis y clasificación de variantes**

Un punto clave para el correcto manejo del paciente en base a los resultados de NGS es asignar a cada variante detectada su contribución biológica a la enfermedad y su subsecuente impacto clínico. La clasificación biológica y clínica de las variantes somáticas actualmente no está estandarizada y depende en gran parte de los análisis subjetivos en cada laboratorio<sup>195</sup>.

Idealmente, los resultados de la secuenciación tumoral deben ser comparados con los de un material de referencia germinal (obtenido de sangre, saliva, folículos pilosos, uñas o fibroblastos cutáneos), para discriminar las variantes relacionadas

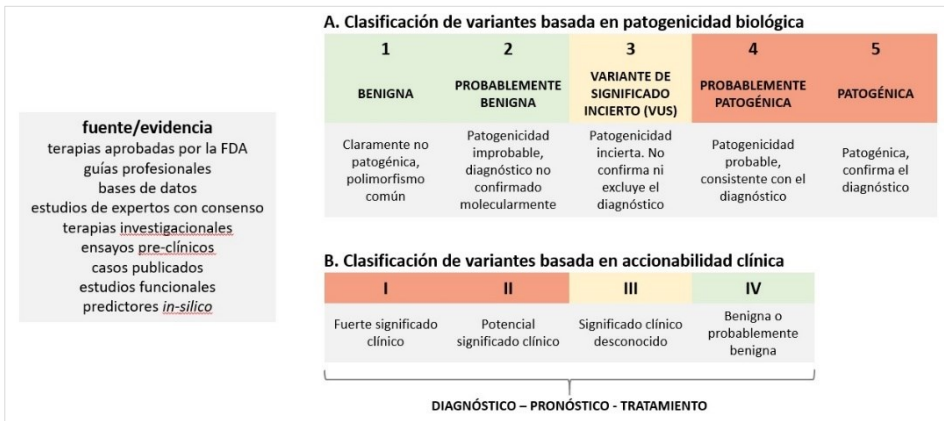
con el tumor. Esto supone un reto debido a los costes de secuenciación adicionales y la limitada disponibilidad de material de referencia, especialmente en neoplasias hematológicas, donde la sangre no supone una buena opción. En ausencia de material de referencia, se puede usar la frecuencia alélica de la variante (VAF) para distinguir su origen germinal. Las variantes de origen germinal suelen presentar una VAF cercana al 50% (heterocigosis) o al 100% (homocigosis), mientras que una variante somática suele presentarse con una VAF menor, al no estar presente en todas las células. Sin embargo, otros factores pueden afectar a la VAF, como un elevado contenido tumoral (que dé lugar a VAFs en torno al 50%), el sesgo introducido por la PCR o la presencia de alteraciones genómicas, como las alteraciones del número de copias o la pérdida de heterocigosis, aunque en la práctica rutinaria no es común que se usen estos datos para corregir la VAF<sup>176</sup>. Recientemente, se han identificado variantes germinales asociadas a la predisposición del desarrollo de linfomas no-Hodgkin, haciendo que la identificación de éstas resulte relevante, por lo que no deben descartarse de entrada<sup>196-198</sup>.

Para la interpretación de variantes, las bases de datos poblacionales y somáticas suponen la principal herramienta informativa. En cuanto a variantes poblacionales, gnomAD representa actualmente la meta-base de datos de referencia, con información (exomas y genomas) de más de 140.000 individuos<sup>199</sup>. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos datos se han obtenido en gran parte de muestras de sangre, por lo que contiene variantes patogénicas asociadas a neoplasias hematológicas, de forma que las variantes incluidas en gnomAD no pueden considerarse *per se* como benignas. En cuanto a las bases de datos de variantes somáticas en cáncer, pueden ser útiles cuando la variante en cuestión ha sido descrita con anterioridad. Actualmente no existen bases de datos específicas de neoplasias linfoides ni proyectos dedicados a este fin, al contrario de lo que ocurre en otros tipos de tumores<sup>195</sup>. El proyecto TCGA (The Cancer Genome Atlas), una de las principales fuentes de información sobre variantes genéticas en cáncer, recogió información de 11.000 pacientes de 33 tipos diferentes de cáncer; sin embargo, las únicas entidades hematológicas representadas fueron la leucemia mieloide aguda y el LDCGB<sup>200</sup>. Con el objetivo de proveer datos de calidad y armonizar la interpretación de variantes, desde la *American Society of*

*Hematology* (ASH) se ha creado el *ASH Somatic Working Group*, pero hasta el momento, trabaja únicamente con alteraciones de patologías mieloides. La escasez de información en las bases de datos acerca de variantes genéticas en linfomas, hace que su clasificación e interpretación sea todavía una “tarea monumental”<sup>201</sup>.

Ante la identificación de una variante somática, debemos establecer su patogenicidad y *accionabilidad*. Este término se acuñó en 2016 por parte de Sukhai y colaboradores para describir variantes que afectan al manejo del paciente<sup>202</sup>. Cuando la NGS llegó a su momento como herramienta diagnóstica, la falta de guías para la clasificación e interpretación de variantes somáticas en cáncer se hizo obvia muy rápido. Hasta ese momento, ante la falta de alternativas, muchos laboratorios habían adoptado las guías ACMG-AMP (American College of Medical Genetics and Genomics-Association for Molecular Pathology), actualizadas en 2015, basadas en el análisis de patogenicidad de variantes germinales, donde se busca establecer causalidad de la variante ante una enfermedad hereditaria (Figura 7A)<sup>203</sup>. En 2017, se publicaron unas nuevas recomendaciones consensuadas entre AMP-ASCO-CAP (*Association for Molecular Pathology-American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists*), que proponen un sistema de clasificación dirigido a las variantes somáticas en cáncer, focalizado en su impacto clínico o accionabilidad (Figura 7B)<sup>149</sup>. Es destacable que en los últimos años se han publicado más de 10 sistemas similares a éste, por lo que no existe consenso<sup>204</sup>. La definición de patogenicidad y accionabilidad no es trivial, y depende en gran manera del contexto. Las neoplasias linfoides están estrechamente relacionadas, por lo que las mutaciones que presentan no son exclusivas de una entidad. Como consecuencia, si se aplican las guías actuales para variantes en cáncer somático de forma estricta, ninguna variante en linfomas B tiene la sensibilidad o especificidad de ser cualificada como diagnóstica<sup>205</sup>. Otra dificultad añadida, es que las células hematopoyéticas se encuentran fuertemente afectadas por la continua acumulación de cambios somáticos como consecuencia de su proliferación a lo largo de la vida, fenómeno conocido como hematopoyesis clonal, aunque podría afectar a todo tipo de células<sup>206-208</sup>. Finalmente, la coocurrencia de mutaciones, frecuente en el LF, y su

orden de adquisición, pueden ejercer una gran influencia en la biología del tumor y en la respuesta al tratamiento, aspectos aún por desentrañar<sup>209-212</sup>.



**Figura 7. Clasificación de variantes genéticas**

**A:** Clasificación de variantes basada en patogenicidad biológica, comúnmente utilizada en el estudio de enfermedades hereditarias (incluyendo el cáncer)<sup>203,213</sup>. **B:** Clasificación de variantes basada en accionabilidad clínica, creada para ser aplicada en cáncer somático<sup>149</sup>. En color rojo se representan las categorías clínicamente accionables.

La implementación de los sistemas de clasificación para variantes en cáncer ha establecido un marco que permite mejorar la supervivencia de los pacientes en base a la aplicación de los resultados de NGS en algunos tipos tumorales, como el cáncer de pulmón de célula no pequeña, donde disponemos de múltiples dianas moleculares con tratamientos dirigidos y años de experiencia<sup>214,215</sup>. Otros tipos tumorales con menor número de evidencias siguen sujetos a una gran subjetividad interpretativa, como se evidencia en múltiples estudios intercomparativos que ponen de manifiesto las discrepancias de resultados al aplicar estas guías, que potencialmente darían lugar a decisiones clínicas dispares bajo un mismo resultado de secuenciación, incluso después de ser discutido en un comité de tumores molecular<sup>216,217</sup>.

Para dirigir estos retos en la clasificación e interpretación de variantes en linfomas, las bases de datos suponen la piedra angular. Requiere de sumar fuerzas entre centros, que acumulan resultados de gran valor en sus colecciones privadas<sup>201</sup>. La información bien documentada y de diferentes momentos de la enfermedad puede ser de gran utilidad en el corto plazo. A medio plazo, la inteligencia artificial podría utilizar esos datos para capturar la complejidad que no puede ser capturada por un grupo de reglas aplicadas manualmente<sup>205,218</sup>.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





Durante la última década se han identificado múltiples mutaciones genéticas en los pacientes con linfoma folicular (LF), aunque todavía se desconoce en gran parte su influencia sobre el comportamiento clínico y en la respuesta al tratamiento. Aunque la supervivencia mediana de los pacientes con LF ha mejorado significativamente con la adición de rituximab a los esquemas clásicos de quimioterapia, al menos un 20-30% de casos no responden o progresan en los 2 primeros años desde el inicio del tratamiento (POD24). Estos pacientes con fallo precoz tienen un especial mal pronóstico y presentan una supervivencia global mediana inferior a los 4 años. Nuestra hipótesis es que el perfil de mutaciones genéticas en el momento del diagnóstico podría influenciar la agresividad clínica de la enfermedad y la respuesta al tratamiento y, por tanto, la determinación del perfil mutacional al diagnóstico de cada paciente con LF podría ayudar en la identificación de aquellos pacientes con bajas probabilidades de respuesta a un tratamiento convencional de inmunquimioterapia (IQT) y así poder seleccionar otro tratamiento convencional alternativo que pueda ser más efectivo para el perfil mutacional presente. Además, la caracterización molecular podría ayudar a identificar aquellos pacientes de mayor riesgo de fallo precoz al tratamiento, para así poder realizar un tratamiento más agresivo y/o incorporar la adición de los nuevos fármacos diana-específicos en la primera línea de tratamiento.

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

1. Estudiar la prevalencia de mutaciones en genes involucrados en la patogénesis del LF en una cohorte de pacientes con LF procedentes de la rutina diagnóstica.
2. Establecer correlaciones clínico-histológicas de las mutaciones detectadas.
3. Evaluar el impacto de dichas mutaciones en la respuesta al tratamiento de primera línea y en la duración de la misma, analizando si existen diferencias en función del tratamiento de IQT convencional administrado (R-CHOP/ R-CVP o R-B).



## **METODOLOGÍA**



## PACIENTES Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

El Servicio de Hematología Clínica del Hospital del Mar dispone de un registro informatizado de pacientes con linfoma, que en el momento de inicio del estudio (2015) incluía 1160 pacientes, de los cuales un 19% correspondían a casos con LF y 145 habían sido tratados con inmuoquimioterapia (IQT) en primera línea. Estos pacientes firman durante su primera visita el documento de Consentimiento Informado del Banco de Tumores y del Biobanco del Parc de Salut Mar (MARBiobanc), donde autorizan el uso de muestras excedentes de su biopsia para investigación. En el presente estudio se incluyeron muestras de pacientes que cumplían los siguientes criterios:

- Diagnóstico de LF de grado 1-3a.
- Tratamiento con intención de remisión.
- Regímenes de IQT: rituximab-CHOP/rituximab-CHOP-*like* (rituximab-miniCHOP o rituximab-CMyOP), rituximab-CVP o rituximab-bendamustina.
- Disponer de material suficiente de tejido incluido en parafina para el estudio.

Los criterios de exclusión fueron:

- Tratamiento paliativo.
- Otros regímenes de quimioterapia, inmunoterapia o IQT (p. ej: rituximab en monoterapia, rituximab-FC, etc)
- Infección por VIH.

Con el objeto de responder al segundo objetivo de evaluar si existen variaciones en la respuesta y/o en la duración de las misma en función del esquema de inmuoquimioterapia utilizado y la presencia de mutaciones específicas, se solicitó colaboración con el Hospital Universitario Son Espases (Palma de Mallorca) y del MD Anderson Cancer Center (Madrid), que disponían de una población de pacientes tratada con rituximab-bendamustina en primera línea, en el mismo periodo de tiempo. Este régimen de IQT es altamente eficaz y seguro

como tratamiento de inducción del LF<sup>43,44</sup>, pero en el momento de inicio del estudio se encontraba pendiente de aprobación por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) como tratamiento en primera línea del LF.

## ESTUDIO MUTACIONAL

### ▸ Preparación de la muestra

Las muestras de LF al diagnóstico consistían en exéresis ganglionares o bien biopsias por tru-cut, fijadas en formol y procesadas en parafina. Todas las biopsias fueron revisadas por el hematopatólogo, junto con al menos dos miembros del equipo investigador, para confirmar el diagnóstico de LF de grado 1-3a y registrar las características histológicas. En las biopsias con zonas no tumorales se llevó a cabo macrodissección del tejido, seleccionando aquellas regiones más ricas en células del LF, asegurando una representación tumoral en la muestra de estudio como mínimo del 25%. El DNA se purificó mediante QIAamp DNA Mini Kit en el sistema de extracción automatizado QIAcube (QIAGEN, Hilden, Germany). El DNA obtenido se cuantificó mediante Qubit dsDNA HS Assay Kit en el fluorímetro Qubit 3.0 (ThermoFisher, Foster City, CA, USA).

El tratamiento para la corrección de los artefactos del DNA derivados de la fijación con formol se realizó a modo de prueba usando NEBNext FFPE DNA Repair Mix (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Este reactivo consiste en un *mix* de enzimas para corregir la desaminación de citosinas, *nicks*, *gaps*, bases oxidadas y extremos 3' bloqueados en el DNA.

### ▸ Diseño del panel

Para este estudio, se realizó una revisión bibliográfica extensiva con el fin de incluir los genes más frecuentemente mutados en el LF (>5%), si bien se incluyeron algunos menos frecuentes por su potencial interés en la respuesta al tratamiento o en la transformación. Se seleccionaron un total de 64 genes (Tabla

6) para la elaboración de un panel personalizado con la tecnología QIAseq targeted DNA custom panel (QIAGEN). Este panel permite identificar con confianza variantes de nucleótido único e indels <25 pares de bases (no se analizan grandes inserciones o deleciones, alteraciones del número de copias ni reordenamientos). El sistema está basado en enriquecimiento por amplicones y cubre todas las regiones codificantes (exones) así como las regiones intrónicas flanqueantes.

**Tabla 6. Listado de genes incluidos en el panel de NGS**

Regulación epigenética y transcripcional		Supervivencia celular		Señalización BCR	
Gen	RefSeq	Gen	RefSeq	Gen	RefSeq
<i>ARID1A</i>	NM_006015.4	<i>ATM</i>	NM_000051.3	<i>BTK</i>	NM_000061.2
<i>ARID1B</i>	NM_020732.3	<i>BCL2</i>	NM_000633.2	<i>CARD11</i>	NM_032415.4
<i>BCL6</i>	NM_001706.4	<i>CCND3</i>	NM_001760.3	<i>CD79B</i>	NM_001039933.1
<i>BCL7A</i>	NM_020993.3	<i>DTX1</i>	NM_004416.2	<i>CXCR4</i>	NM_001008540.1
<i>CREBBP</i>	NM_004380.2	<i>EEF1A1</i>	NM_001402.5	<i>FOXO1</i>	NM_002015.3
<i>EBF1</i>	NM_024007.3	<i>FAS</i>	NM_000043.4	<i>IRF4</i>	NM_002460.3
<i>EP300</i>	NM_001429.3	<i>JAK2</i>	NM_004972.3	<i>IRF8</i>	NM_002163.2
<i>EZH2</i>	NM_004456.4	<i>JAK3</i>	NM_000215.3	<i>KLF2</i>	NM_016270.2
<i>HIST1H1B</i>	NM_005322.2	<i>MCL1</i>	NM_021960.4	<i>KLHL6</i>	NM_130446.2
<i>HIST1H1C</i>	NM_005319.3	<i>MYC</i>	NM_002467.4	<i>MS4A1</i>	NM_021950.3
<i>HIST1H1D</i>	NM_005320.2	<i>NOTCH1</i>	NM_017617.3	<i>MYD88</i>	NM_001172567.1
<i>HIST1H1E</i>	NM_005321.2	<i>NOTCH2</i>	NM_024408.3	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.2
<i>KMT2C</i>	NM_170606.2	<i>PIM1</i>	NM_001243186.1	<i>PIK3CD</i>	NM_005026.3
<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	<i>SGK1</i>	NM_001143676.1	<i>PIK3R1</i>	NM_181523.2
<i>MEF2B</i>	NM_001145785.1	<i>SOCS1</i>	NM_003745.1	<i>PLCG2</i>	NM_002661.3
<i>PAX5</i>	NM_016734.2	<i>ST6GAL1</i>	NM_173216.2	<i>TNFAIP3</i>	NM_006290.3
<i>SMARCA4</i>	NM_001128849.1	<i>STAT6</i>	NM_003153.4		
<i>TET2</i>	NM_001127208.2	<i>TNFK</i>	NM_015028.2		
		<i>TP53</i>	NM_000546.5		
Respuesta inmune		Señalización mTORC1		Migración celular	
Gen	RefSeq	Gen	RefSeq	Gen	RefSeq
<i>B2M</i>	NM_004048.2	<i>ATP6AP1</i>	NM_001183.4	<i>GNA13</i>	NM_006572.4
<i>CD58</i>	NM_001779.2	<i>ATP6AP2</i>	NM_005765.2	<i>GNAI2</i>	NM_002070.2
<i>CTSS</i>	NM_004079.4	<i>ATP6V1B2</i>	NM_001693.3		
<i>IGLL5</i>	NM_001178126.1	<i>RRAGC</i>	NM_022157.3		
<i>TNFRSF14</i>	NM_003820.2				

Genes y su correspondiente secuencia de referencia, agrupados según la vía implicada.

Este panel implementa 2 características técnicas sobre los paneles de amplicones clásicos que permiten superar algunas de sus limitaciones (Figura 8):

- 1) *Unique molecular identifiers* (UMIs): los UMIs son fragmentos de DNA formados por la combinación de 12 nucleótidos al azar, que se unen a cada molécula de DNA de la muestra al inicio de la preparación de la librería. De esta forma, cada molécula tiene un marcaje propio y único, lo que permite que en el análisis bioinformático subsecuente se obtenga un resultado consenso de las diferentes lecturas con el mismo marcaje (que provienen de la replicación por PCR de una misma molécula). Así se pueden discriminar y eliminar los errores introducidos durante la PCR y la secuenciación, mejorando la sensibilidad y especificidad. También la cuantificación de la frecuencia alélica resulta más exacta, gracias a que se elimina el sesgo introducido por los duplicados de PCR. Esto hace que la implementación de UMIs se considere “secuenciación digital”.
- 2) *Single primer extension*: Aunque el enriquecimiento de las regiones génicas de interés se produce por PCR, este sistema combina *primers* específicos de secuencia con un *primer* universal. Esto permite una profundidad de lectura más uniforme, evitando que se obtengan regiones no amplificadas o infrarrepresentadas (como suele ocurrir en las regiones génicas ricas en citosinas y guaninas cuando se usan paneles de amplicones convencionales).

#### ▸ Preparación de la librería y secuenciación

La preparación de la librería de DNA se realizó a partir de 120 ng de DNA, siguiendo el protocolo del fabricante, que establece 3 reacciones de PCR separadas por pasos de purificación mediante bolas magnéticas (Figura 8). En un primer paso, se realiza la ligación de los índices, que permitirán la identificación de cada muestra y que a su vez incorporan los UMIs. A continuación, se realiza una PCR de enriquecimiento usando un *pool* de 2597 *primers* específicos de los genes de interés. En la última reacción, se re-amplifican estas regiones de interés con el *primer* universal, añadiendo un segundo identificador de muestra en el otro extremo. Las librerías de DNA generadas se secuenciaron bien en MiSeq o NextSeq (Illumina, San Diego, CA, USA), procurando una profundidad de lectura mínima de 3000x.



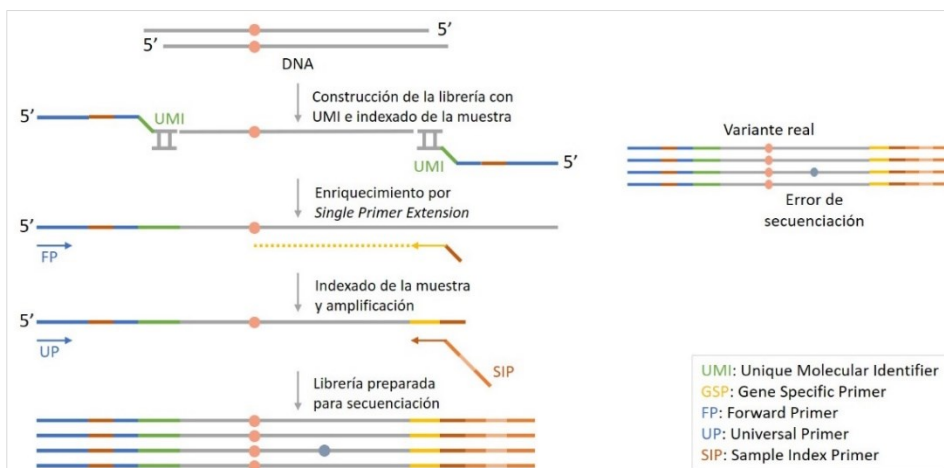
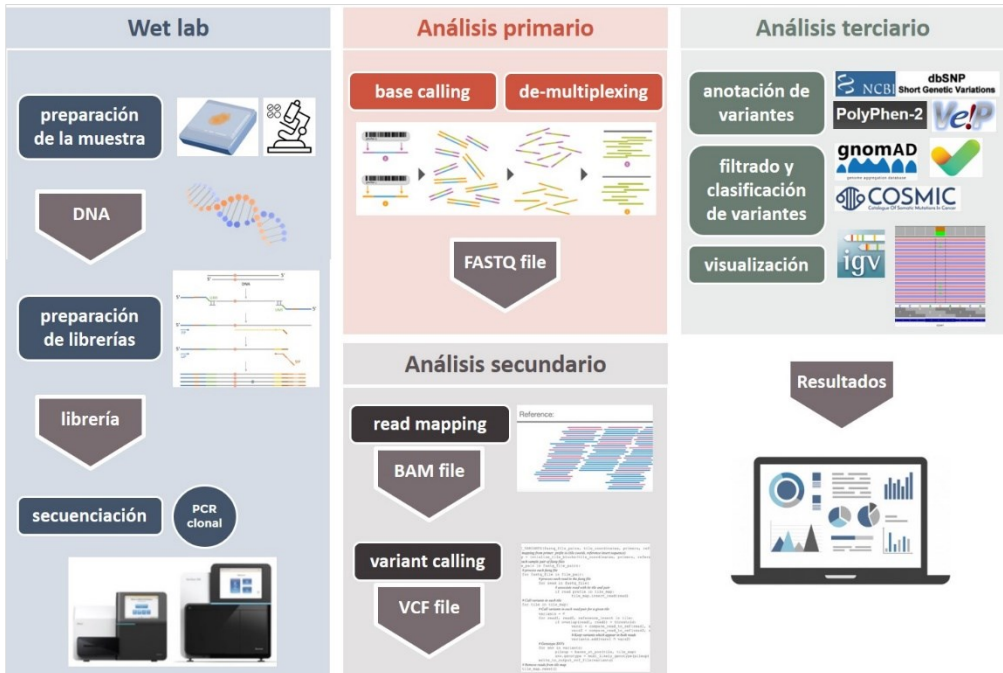


Figura 8. Esquema del procedimiento de preparación de librerías

### ► Análisis y clasificación de variantes

Los datos obtenidos de la secuenciación se analizaron mediante QIAGEN GeneGlobe Data Analysis Center (<https://geneglobe.qiagen.com/es/analyze/>) con smCounter1, un *variant caller* creado para el análisis de librerías con UMIs<sup>219</sup>. Debido a las limitaciones de calidad de las muestras fijadas en formol, el límite de detección se estableció en una frecuencia alélica (VAF) del 10% y del 4% sólo para alteraciones recurrentes (*hotspots*) o bien conocidas previamente. Las muestras con una profundidad media de lectura inferior a 150 UMIs se consideraron no valorables. Todas las variantes detectadas fueron analizadas y clasificadas manualmente en base a criterios de patogenicidad (Figura 7A) según las guías ACMG del 2015<sup>203</sup> usando el programa VariantStudio v3.0 (Illumina) así como múltiples bases de datos de variantes poblacionales y somáticas, herramientas de predicción *in-silico* y bibliografía relacionada. Se usó la herramienta Integrative Genomics Viewer 2.8.9 para la inspección visual de los alineamientos en los casos necesarios. Únicamente las variantes patogénicas o probablemente patogénicas se incluyeron en los análisis subsecuentes. Para los análisis globales se utilizaron GraphPad Prism 6, Microsoft Excel y el paquete maftools con R v3.6.2<sup>220</sup>. En la Figura 9 se resumen los procedimientos generales aplicados para el estudio mutacional.



**Figura 9. Esquema global del estudio mutacional mediante NGS**  
 BAM: Binary Alignment Map, VCF: Variant call format.

## MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos clínicos, histológicos y genéticos de los pacientes incluidos en el estudio se recogieron en una base de datos. Los genes se analizaron de forma individual y global según la vía de señalización implicada (Tabla 6). Las comparaciones de parámetros categóricos se realizaron mediante Chi-cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher y para las variables continuas se utilizó el test Mann-Whitney U. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ante un valor de  $p < 0,05$ . Las curvas de supervivencia se calcularon desde el momento de inicio del tratamiento mediante el método Kaplan-Meier y las diferencias entre dos grupos se compararon mediante el test log-rank. Los análisis uni- y multi-variados se realizaron con el modelo de riesgo proporcional de Cox. La significancia estadística se determinó con el test de Wald. Estos análisis se llevaron a cabo con SPSS 25, STATA v13 y R v3.6.2.

## **RESULTADOS**



### ▸ **Características de los pacientes**

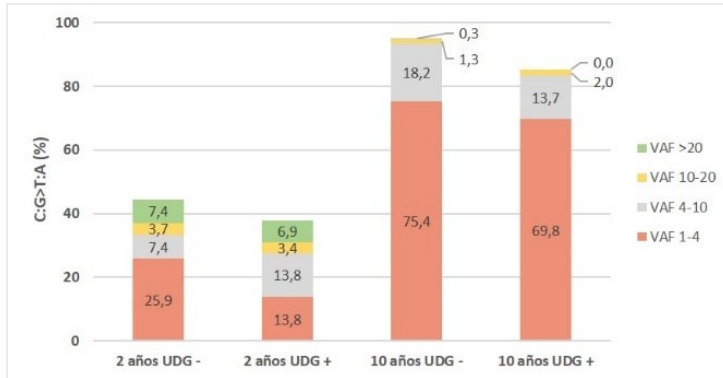
En la cohorte de este estudio se incluyeron un total de 191 pacientes con LF al diagnóstico: 123 del Hospital del Mar (Barcelona), 46 del Hospital Universitario de Son Espases (Palma de Mallorca) y 9 del MD Anderson Cancer Center (Madrid). El número final de casos con datos clínicos y biopsia caracterizada mediante NGS fue de 109 casos. La mediana de edad al diagnóstico fue de 58 años (rango 24-90) y el 56% fueron hombres. La mayoría de casos (93,6%) presentaban estadio de Ann Arbor III-IV y el índice de riesgo FLIPI fue de 0-1 en el 16,5% de los casos, 2-3 en el 68,8% y 4-5 en el 11%. Los tratamientos administrados fueron R-CHOP o R-CHOP-like (65,1%), R-CVP (7,3%) y R-B (27,5%). La respuesta global fue del 98,2% y un 83,5% de casos alcanzaron respuesta completa. Con una mediana de seguimiento de 96 meses, la supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 94 meses y la SLP a 5 años fue del 54% en los casos tratados con R-CHOP y del 81% en los casos tratados con R-B.

### ▸ **Calidad de los datos de secuenciación**

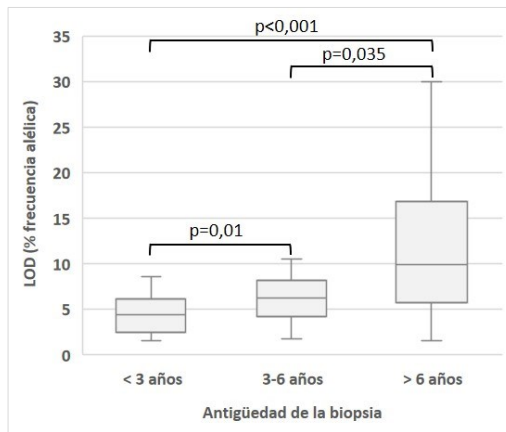
Con el objetivo de minimizar los artefactos sobre el DNA derivados de la fijación en formol y el procesado en parafina, especialmente la desaminación de citosinas que da lugar a cambios artefactuales en el DNA (C:G>T:A), se realizó una prueba de reparación con un reactivo que contiene la enzima reparadora uracilo-DNA glicosilasa (UDG). Esta prueba se realizó sobre 2 muestras, de 2 y 10 años de antigüedad al momento de la extracción del DNA. Al comparar los resultados de secuenciación con y sin tratamiento, se observó una leve disminución en el porcentaje de variantes C:G>T:A sobre el total de variantes detectadas (Figura 10), pero sólo afectaban de forma significativa en el rango de frecuencia alélica inferior al 4%, por lo que se descartó el uso de este tratamiento para el resto de muestras.

Se secuenciaron un total de 164 casos, de los cuales 38 (23,2%) resultaron no valorables por obtenerse una calidad de secuenciación subóptima. Al momento de la extracción del DNA, las biopsias tenían una antigüedad desde su fecha de obtención de 6,1 años (rango 0,6-14,9). Los casos fallidos eran significativamente más antiguos (8,4 vs 6,7 años,  $p=0,039$ ). En los casos valorables, la antigüedad de

las biopsias influyó negativamente sobre la calidad de los resultados obtenidos, dando lugar a un límite de detección más alto (Figura 11).

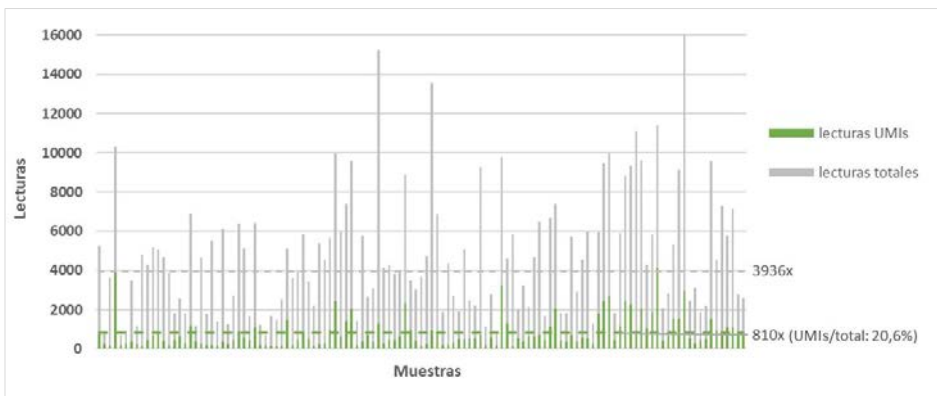


**Figura 10. Efecto del tratamiento del DNA con uracilo-DNA glicosilasa (UDG)**  
 Porcentaje de variantes C:G>T:A sobre el total de variantes detectadas en cada muestra y distribución de acuerdo a su frecuencia alélica.



**Figura 11. Efecto de la antigüedad de la biopsia sobre el límite de detección**  
 LOD: límite de detección (percentil 95 de la fracción alélica mínima detectable) expresado en porcentaje de frecuencia alélica.

El número promedio de lecturas totales por amplicón (profundidad de lectura) fue de 3936 (rango 526-15122) (Figura 12). El promedio de UMIs leídos por amplicón fue de 810 (rango 150-4189), de forma que cada lectura se obtuvo en promedio del consenso de 5 copias de PCR.

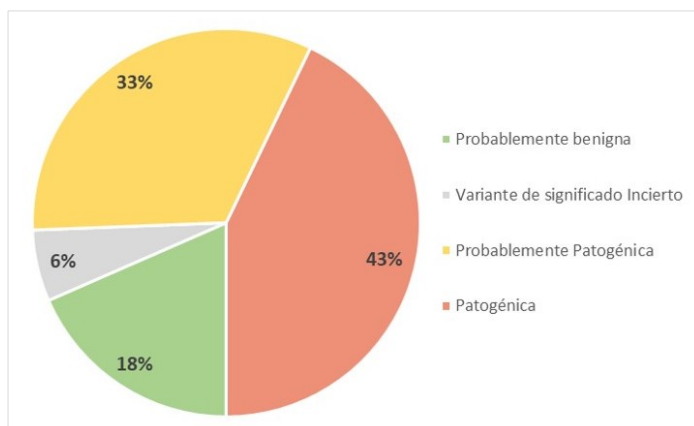


**Figura 12. Profundidad de lectura**

Las líneas punteadas representan los promedios. Muestras ordenadas de mayor a menor antigüedad.

▸ **Variantes detectadas**

Para la cohorte final de 109 muestras, tras filtrar los artefactos, las variantes sinónimas (fuera de las posiciones de *splicing*) y las variantes benignas (frecuencia poblacional igual o superior al 1%), se obtuvieron un total de 933 variantes, que se clasificaron según se representa en la Figura 13. Para los análisis subsecuentes, se descartaron las variantes probablemente benignas y las de significado incierto, quedando un total de 865 variantes patogénicas o probablemente patogénicas (el listado completo de las variantes incluidas en el análisis se recoge en el Anexo).

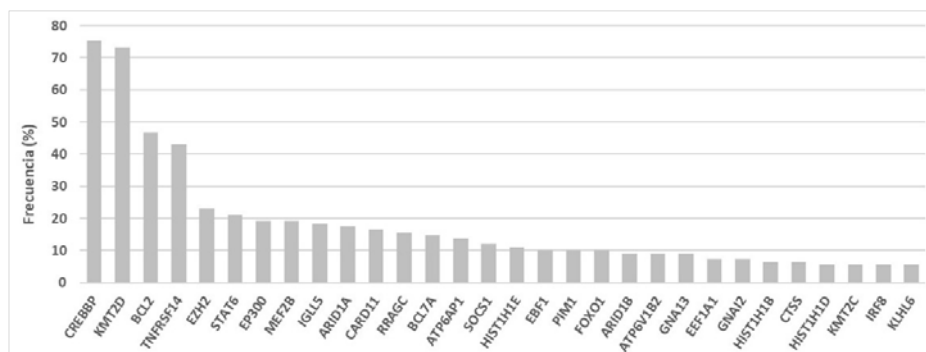


**Figura 13. Distribución de la clasificación de variantes**

Todos los casos presentaron alteraciones, con un promedio de 7,9 variantes por paciente (rango 2-23) y de 6 genes mutados (rango 1-14). De los 64 genes analizados, 30 presentaron una frecuencia superior al 5% en nuestra serie (Figura

14), en 24 se observó una frecuencia menor al 5% (mutados en 5 pacientes o menos: *ATM*, *ATP6AP2*, *B2M*, *BCL6*, *BTK*, *CCND3*, *CD79B*, *CXCR4*, *DTX1*, *FAS*, *HIST1H1C*, *IRF4*, *MYC*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *PAX5*, *PIK3CA*, *PLCG2*, *SGK1*, *SMARCA4*, *ST6GAL1*, *TET2*, *TNFAIP3* y *TP53*) y en 10 genes no se detectaron mutaciones (*CD58*, *JAK2*, *JAK3*, *KLF2*, *MCL1*, *MS4A1*, *MYD88*, *PIK3CD*, *PIK3R1* y *TNIK*). Las frecuencias de mutación obtenidas fueron muy similares a las descritas previamente en la literatura.

Tanto el número de genes afectados como el número de mutaciones detectadas por paciente se correlacionaron con la presencia de la translocación t(14;18) ( $p=0,031$  y  $p=0,007$ , respectivamente), reflejando el efecto de la inestabilidad genética producida por la sobreexpresión de *BCL2*. Asimismo, ambos recuentos se asociaron con una LDH elevada ( $p=0,015$  y  $p=0,011$ , respectivamente), lo que indicaría una mayor tasa metabólica de las células tumorales con más acumulación de alteraciones. Estos recuentos no se asociaron significativamente a otros parámetros analizados ni a la supervivencia de los pacientes.



**Figura 14. Genes con una frecuencia de mutación observada superior al 5%**

El análisis de coocurrencia entre genes mutados (Figura 15) mostró una fuerte asociación entre las mutaciones en los genes *FOXO1* y *GNAI3* (OR 17,99,  $p<0,001$ ). Ambos genes regulan la vía PI3K-AKT, siendo *GNAI3* un regulador negativo, que, al adquirir mutaciones de pérdida de función, estimula esta vía. Esta concomitancia de alteraciones reflejaría una redundancia en las señales activadoras de la vía linfomagénica PI3K-AKT. No se detectaron mutaciones en los genes que codifican para *PIK3CA* (subunidad  $\alpha$ ), *PIK3CD* (subunidad  $\delta$ ) o el receptor *PIK3R1*. El resto de relaciones observadas mostraron un bajo número de eventos.



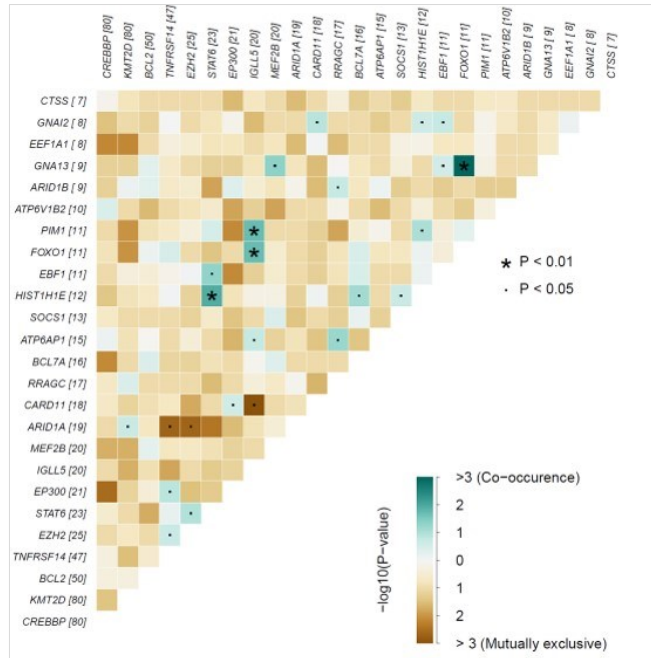


Figura 15. Coocurrencia o exclusión mutua entre los 25 genes más frecuentes

► **Mutaciones en la vía de regulación epigenética y transcripcional**

Todos los pacientes mostraron al menos una mutación en los genes que codifican para reguladores epigenéticos y transcripcionales, puesto que se trata de la vía característicamente alterada en el LF. En la Figura 16 se muestran las frecuencias y tipos de alteraciones detectadas en estos genes.

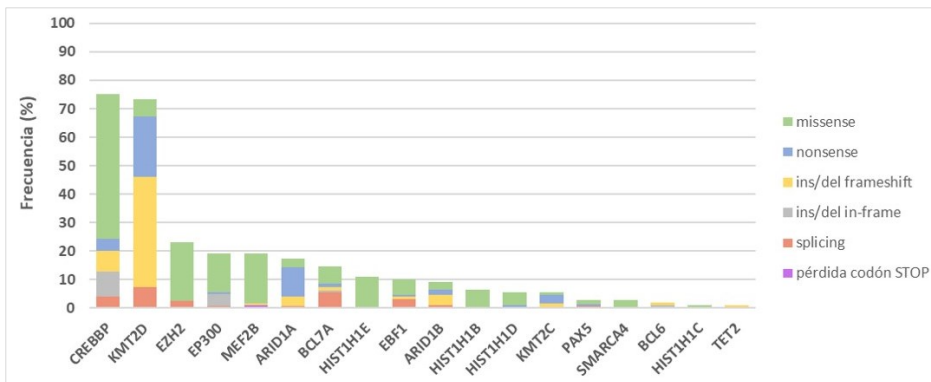
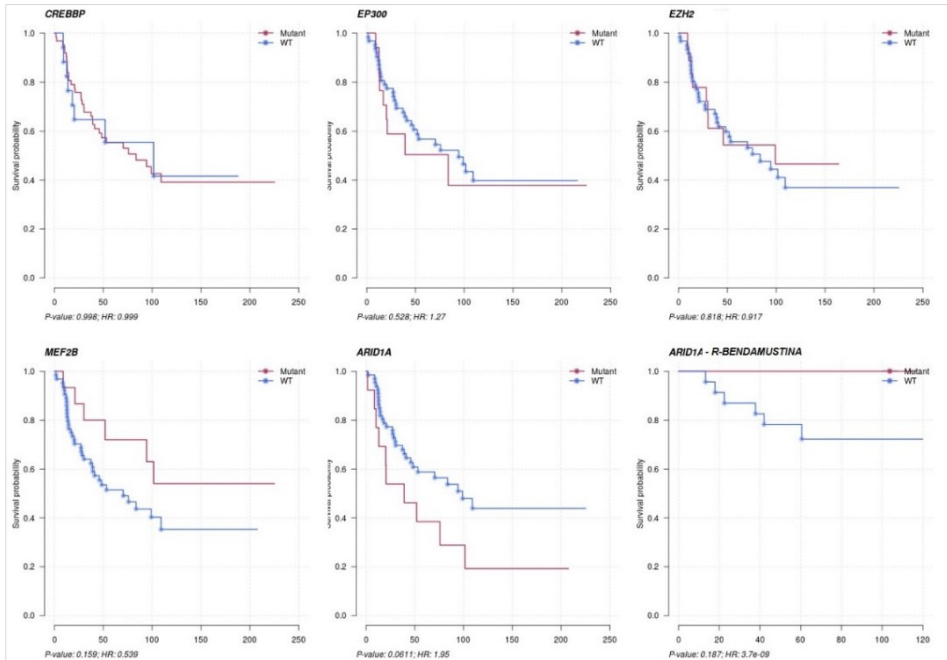


Figura 16. Frecuencia mutacional en los genes de la vía de regulación epigenética y transcripcional

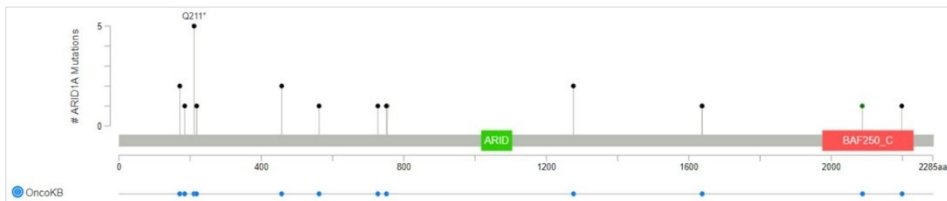
De los siete genes incluidos en el modelo de predicción pronóstico m7-FLIPI, cinco forman parte de este grupo: *CREBBP* y *EP300*, asociados a mal pronóstico,

y *EZH2*, *MEF2B* y *ARID1A*, asociados a buen pronóstico según el modelo. En nuestra serie, estos genes no mostraron una asociación significativa en cuanto a la supervivencia (Figura 17), aunque *MEF2B* sí mostró una tendencia a relacionarse con una mejor supervivencia y también a un menor riesgo de progresión en los primeros 24 meses (POD24). Las mutaciones de *ARID1A*, al contrario de lo descrito en el modelo m7-FLIPI, mostraron una tendencia a asociarse con un peor pronóstico en la serie global y en los casos tratados con R-CHOP/CHOP-like, aunque mostraron una tendencia invertida en los casos tratados con R-B (Figura 17, último panel); estas mutaciones eran en su mayoría truncantes, y se encuentran descritas en las bases de datos de cáncer somático (Figura 18), puesto que *ARID1A* se halla mutado en varios tipos de tumores sólidos.

Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a supervivencia o probabilidad de progresión en función del resto de genes en esta vía. Sin embargo, al analizar el subgrupo de pacientes caracterizado por una larga supervivencia libre de progresión (14 pacientes con SLP superior a 110 meses, que alcanzaron una meseta de supervivencia), se observó que dicho subgrupo estaba enriquecido en mutaciones de *MEF2B* ( $p=0,013$ ) y presentaba con menor frecuencia mutaciones en *KMT2D* ( $p=0,022$ ). En la serie completa, las mutaciones de *MEF2B* se asociaron a una mayor frecuencia de afectación de la médula ósea (OR: 6,89,  $p<0,001$ ).



**Figura 17.** SLP de los 5 genes de la vía epigenética y transcripcional incluidos en el modelo m7-FLIPI



**Figura 18.** Distribución de las mutaciones detectadas en ARID1A

Se representan en color negro las mutaciones truncantes (*nonsense*, indels *frameshift* y en posición de *splicing*) y en color verde las mutaciones *missense*. En color azul se representan las alteraciones que constan en la base de datos mutacional OncoKB<sup>150</sup>.

### ► Mutaciones en la vía de supervivencia y proliferación celular

Las frecuencias mutacionales obtenidas para los genes implicados en la vía de supervivencia y proliferación celular se muestran en la Figura 19. Salvo *BCL2* (46,8%), y *STAT6* (21,1%), el resto de genes presentaron una baja frecuencia, de acuerdo a lo descrito en la literatura. No se detectaron asociaciones pronósticas significativas de forma global ni asociadas a un único gen, incluido *BCL2*, para el que se han descrito hasta el momento resultados contradictorios (Figura 20).

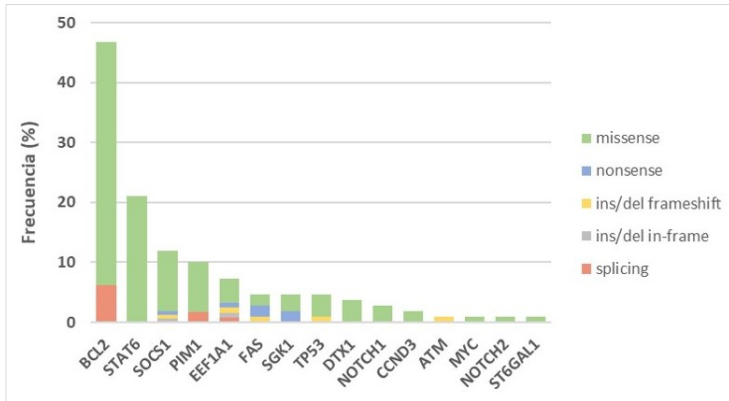


Figura 19. Frecuencia mutacional en los genes de la vía de supervivencia y proliferación celular

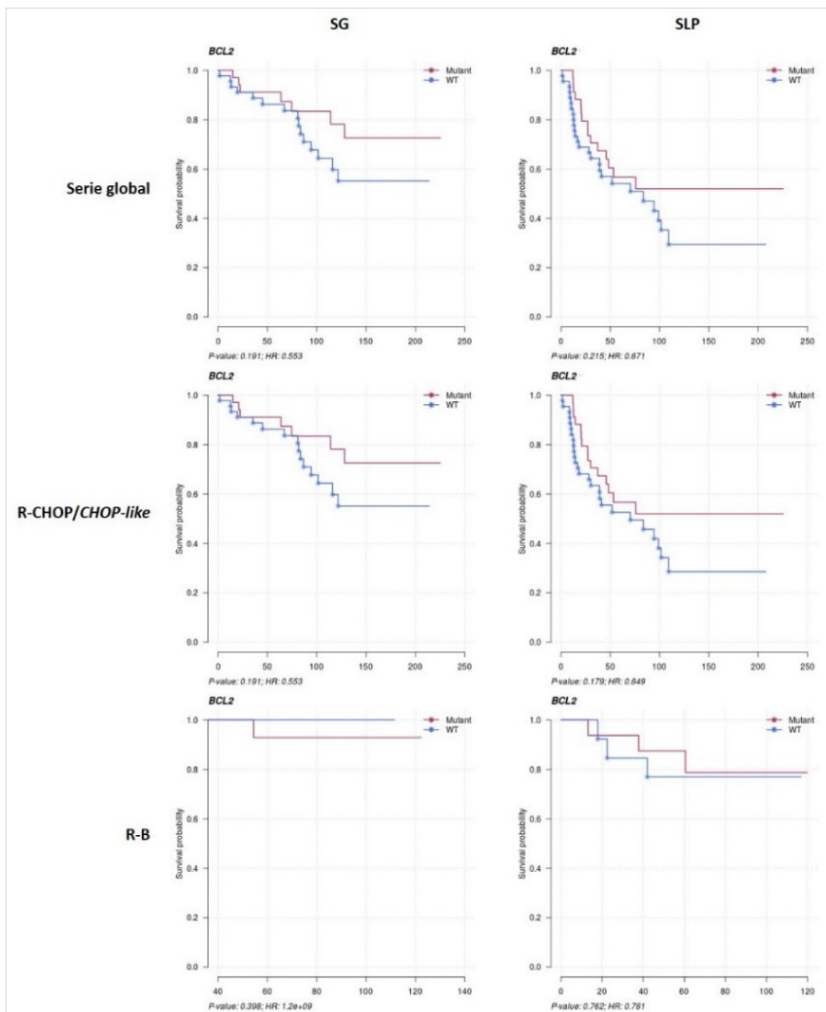
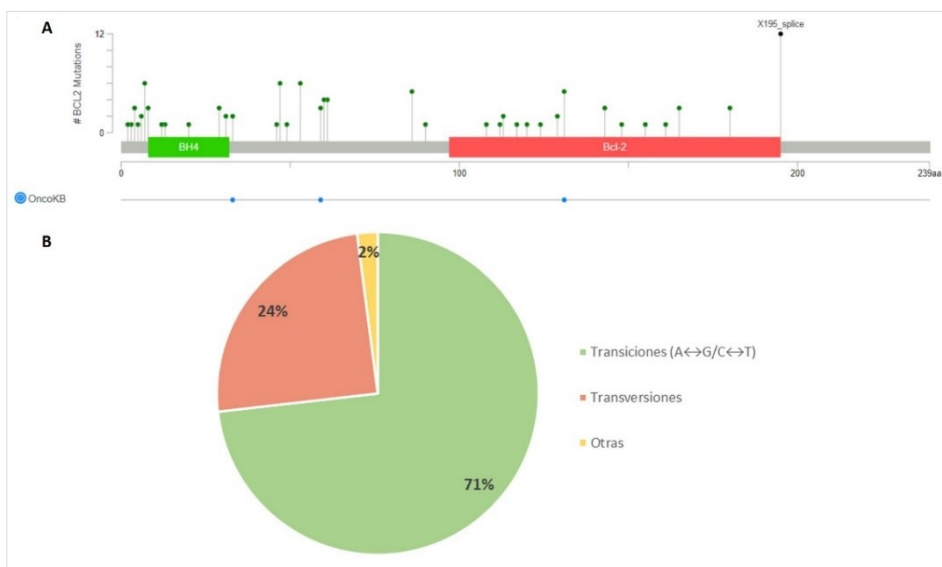


Figura 20. Curvas de supervivencia en función del estado mutacional del gen *BCL2*  
 SG: supervivencia global, SLP: supervivencia libre de progresión.

Las mutaciones de *BCL2* se asociaron de forma significativa a la presencia de la translocación t(14;18) ( $p=0,036$ ), que presentaban el 85,7% de los pacientes. La mayoría (87%) correspondían a mutaciones *missense* (Figura 21B), que se distribuían a lo largo de toda la secuencia, llegando a acumularse hasta 6 mutaciones distintas en un mismo paciente. En el 73,2% de los casos se trataba de transiciones (sustitución de una base púrica o pirimidínica por otra del mismo tipo -A↔G/C↔T-, Figura 21B), reflejando el efecto de la enzima AID en el proceso de hipermutación somática aberrante.



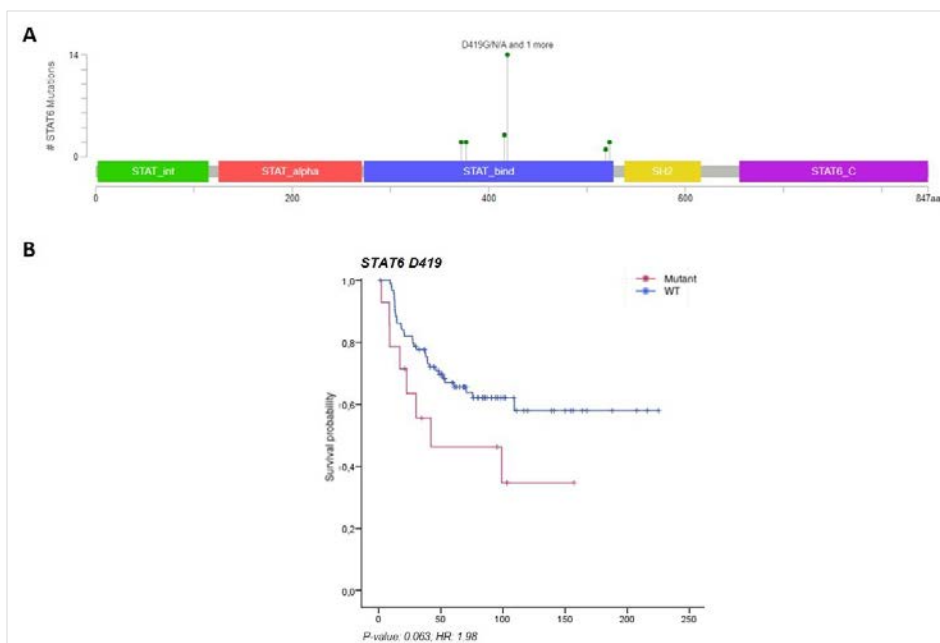
**Figura 21. Mutaciones detectadas en el gen *BCL2***

**A:** Se representan en color negro las mutaciones truncantes (*nonsense*, indels *frameshift* y en posición de *splicing*) y en color verde las mutaciones *missense*. En color azul se representan las alteraciones que constan en la base de datos mutacional OncoKB<sup>150</sup>. **B:** Distribución de las mutaciones en función del tipo de cambio (transiciones vs transversiones u otras).

Las mutaciones de *TP53* se asociaron a un mayor grado histológico (grado 3A vs 1-2,  $p= 0,005$ ), aunque su baja frecuencia (5/109 casos -4,6%-) no permite establecer una correlación con el pronóstico. La mediana de VAF observada en estas mutaciones fue baja, del 5,7%.

Las mutaciones de *STAT6* se correlacionaron con un bajo grado histológico ( $p=0,013$ ) y mostraron también una tendencia a asociarse con un menor índice proliferativo ( $Ki67<30\%$ ,  $p=0,06$  -no significativo-). A diferencia lo que ocurre en el LF de tipo difuso, las mutaciones de *STAT6* no se asociaron con ausencia de

t(14;18), mutaciones de *TNFRSF14* ni de *CREBBP*. De las 24 mutaciones detectadas en este gen, todas ellas mutaciones *missense* y ubicadas en el dominio de unión al DNA, 14 correspondían a mutaciones activadoras en el *hotspot* Asp419 (Figura 22A). Los pacientes afectados por esta mutación *hotspot* (12,84%) presentaron una peor SLP, al límite de la significancia estadística ( $p=0,063$ ) (Figura 22B). Dentro de los genes de la vía JAK-STAT, se detectaron mutaciones de *SOCS1* en el 11,9% de los pacientes, sin asociarse a otras alteraciones o características, mientras que no se hallaron mutaciones en los genes *JAK2/3*.



**Figura 22. Distribución de mutaciones y curvas de supervivencia para el gen *STAT6***  
**A:** Distribución de las mutaciones de *STAT6*. **B:** Supervivencia libre de progresión en pacientes portadores de mutaciones *hotspot* en el aminoácido Asp419.

### ► Mutaciones en la vía de respuesta inmunológica

La siguiente vía con mayor frecuencia de mutaciones es la de respuesta inmunológica (Figura 23). Las mutaciones detectadas en *TNFRSF14* eran en su mayoría truncantes (72,2%) y se distribuían a lo largo de todo el gen. Todos los pacientes mutados eran portadores de la translocación t(14;18) ( $p=0,001$ ). Se detectaron 7 casos (6,4%) con mutación del gen *CTSS* (cathepsina S), todos ellos portadores de la alteración recurrente Y132D, en el dominio peptidasa (Figura

24A). Ninguno de ellos presentaba afectación de la médula ósea al diagnóstico ( $p=0,031$ ). Estos casos mostraron una tendencia a presentar un mejor pronóstico (Figura 24B), con una SLP a los 10 años del 86% vs 44% en los no mutados, si bien el bajo número de casos no permitió alcanzar la significancia estadística ( $p=0,069$ ).

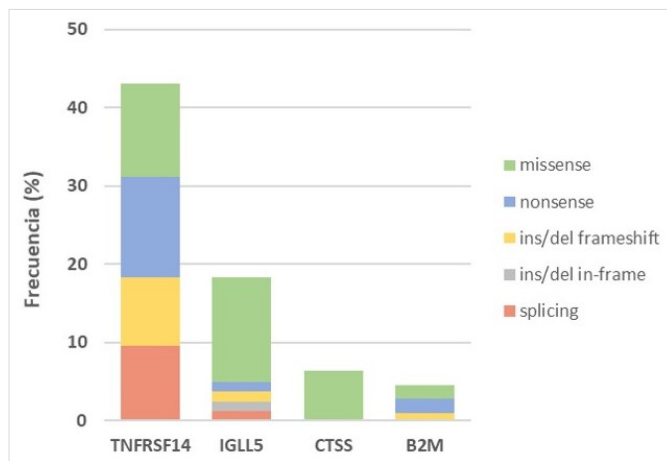


Figura 23. Frecuencia mutacional en los genes de la vía de respuesta inmunológica

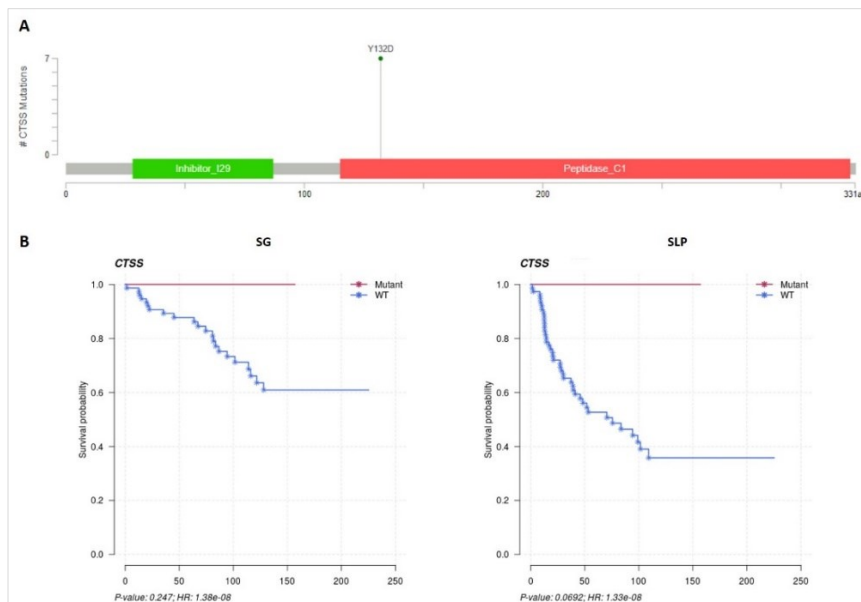


Figura 24. Mutación hotspot y curvas de supervivencia del gen CTSS

A: Variante hotspot Tyr132Asp en el gen CTSS. B: Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) para el gen CTSS.

► **Mutaciones en la vía de señalización BCR**

Las mutaciones en los genes implicados en la vía de señalización BCR están mayoritariamente representadas por los genes *CARD11* (16,5%) y *FOXO1* (10,1%), mientras que el resto presentan una frecuencia inferior al 6%, como se muestra en la Figura 25. Ambos genes forman parte del modelo de predicción pronóstico m7-FLIPI, asociados a mal pronóstico. Sin embargo, en esta cohorte no se detectaron diferencias significativas ni tendencias en cuanto a la supervivencia de los pacientes (Figura 26) ni se han hallado correlaciones clínicas, si bien el número de casos afectados es bajo.

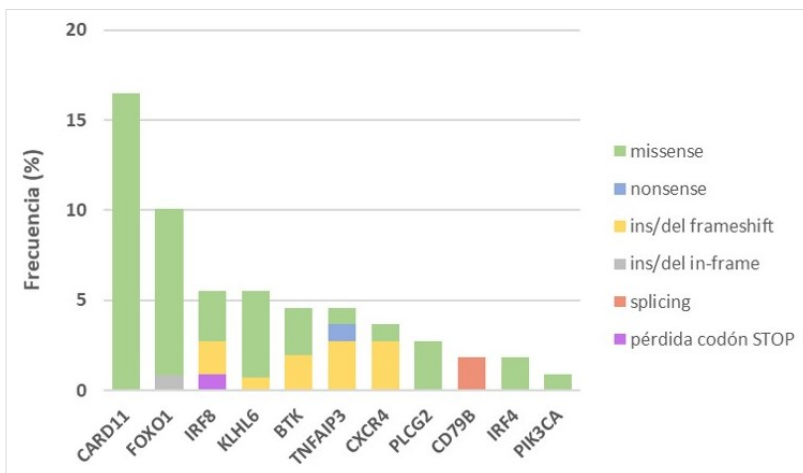


Figura 25. Frecuencia mutacional en los genes de la vía de señalización BCR

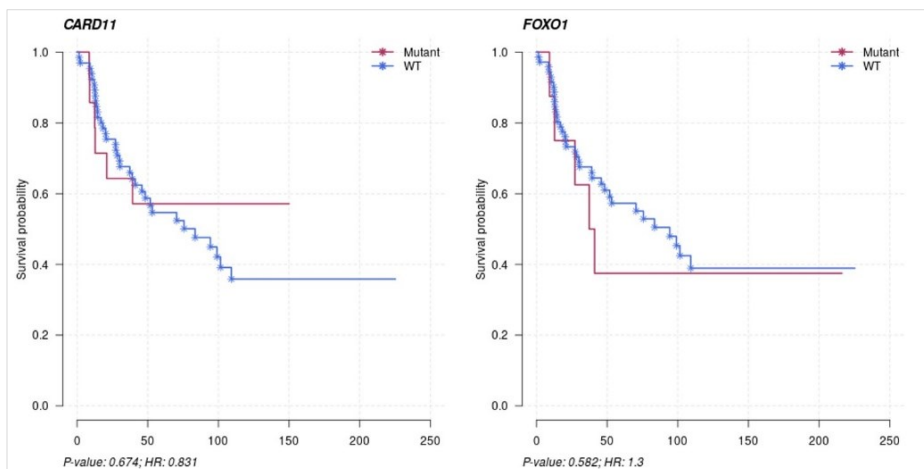


Figura 26. SLP de los 2 genes de la vía de señalización BCR incluidos en el modelo m7-FLIPI



### ► Mutaciones en la vía de señalización mTORC1

El 32% de los pacientes (35/109) mostraron mutaciones en uno o más genes de los cuatro analizados implicados en esta vía (Figura 27). Los pacientes con mutaciones en el gen *ATP6V1B2* eran significativamente más jóvenes al diagnóstico (51,9 vs 58,7;  $p=0,017$ ).

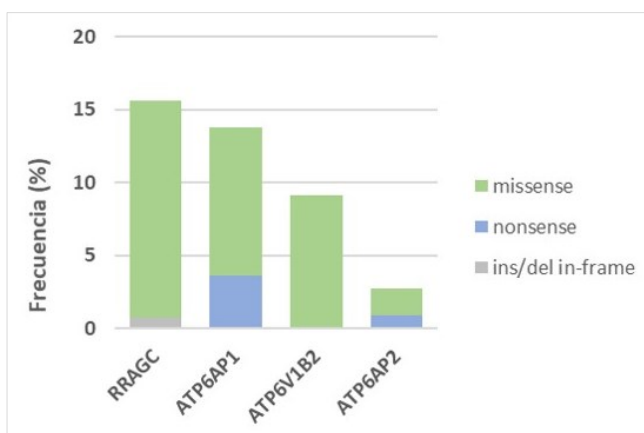
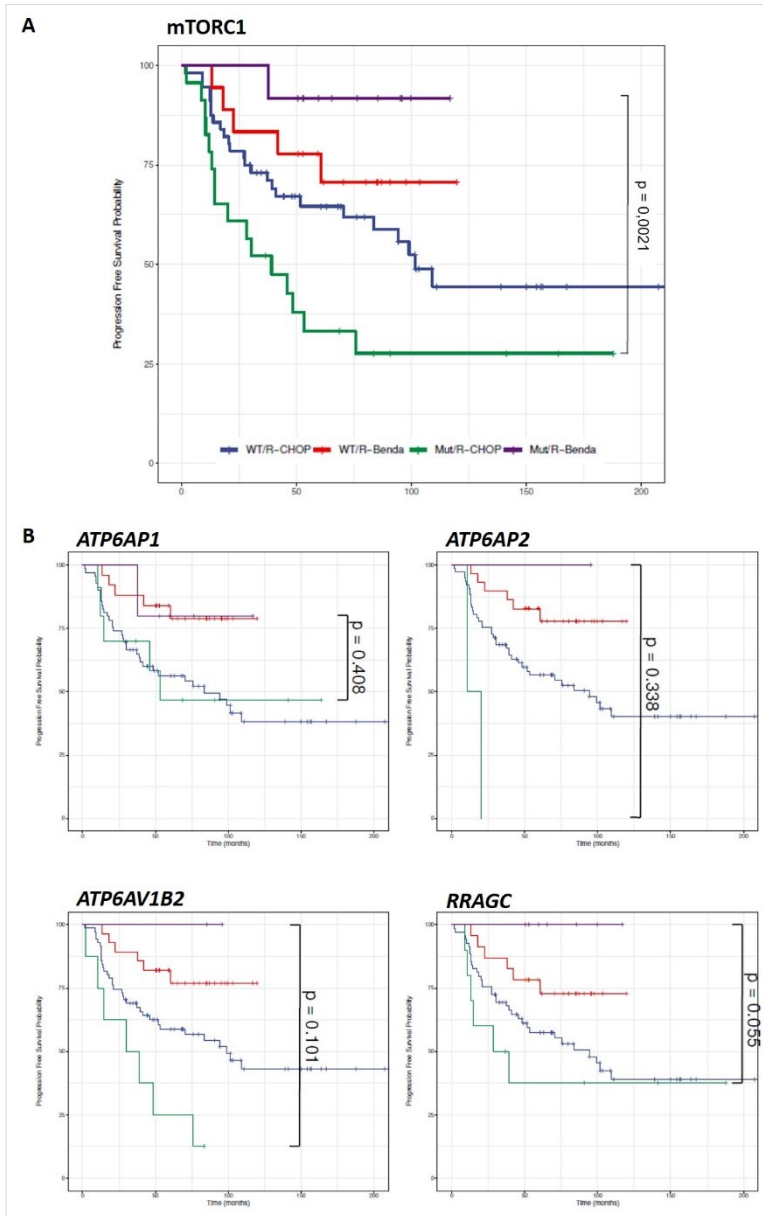


Figura 27. Frecuencia mutacional en los genes de la vía de señalización mTORC1

El estado mutacional al diagnóstico de la vía mTORC1 mostró un impacto pronóstico diferencial en función del tratamiento administrado: los pacientes mutados que habían sido tratados con R-CHOP/CHOP-*like* mostraban una peor SLP, mientras que los pacientes mutados que habían sido tratados con R-B presentaban una SLP superior ( $p=0,0021$ ) (Figura 28A). De forma individual, ninguno de los cuatro genes alcanzó significancia estadística en esta comparativa (Figura 28B).



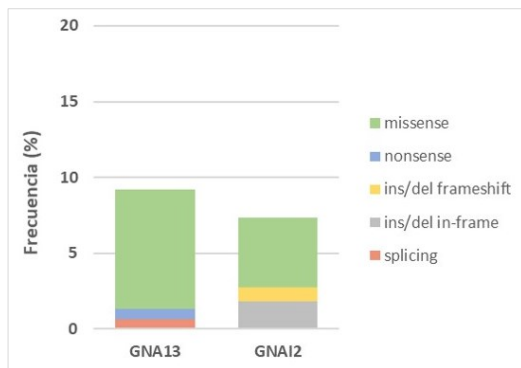
**Figura 28. Curvas de supervivencia libre de progresión de la vía mTORC1**

**A.** SLP analizando globalmente los cuatro genes de la vía mTORC1. **B.** SLP individual de cada gen. WT: wild-type (no mutado).

► **Mutaciones en la vía de migración celular**

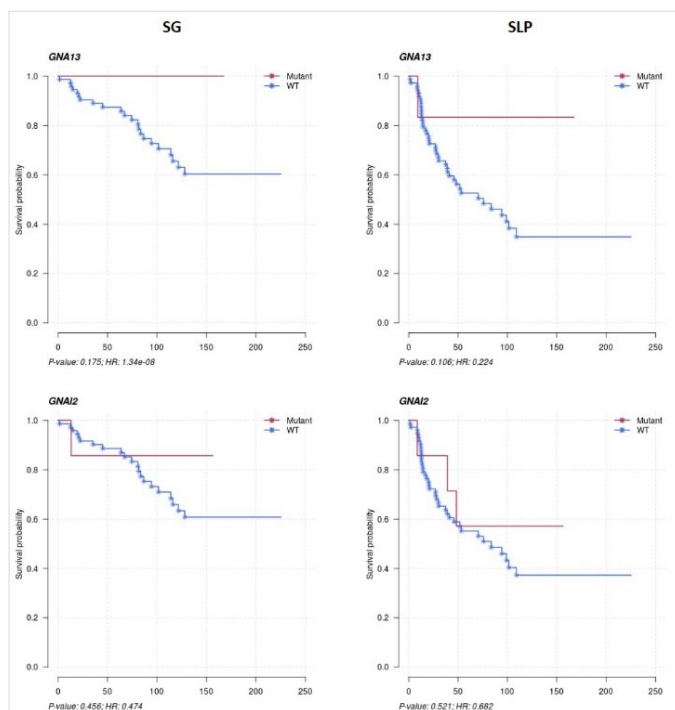
Los genes *GNAI3* y *GNAI2* forman parte de la vía de señalización del BCR como transductores de señales hacia la vía PI3K-AKT, y se analizaron conjuntamente

debido a su concreto papel en la migración celular. La frecuencia mutacional observada en estos genes es inferior al 10%, como se muestra en la Figura 29. En global, un 16% de casos presentaban mutaciones en alguno de los dos genes (1 caso con coexistencia de ambos).

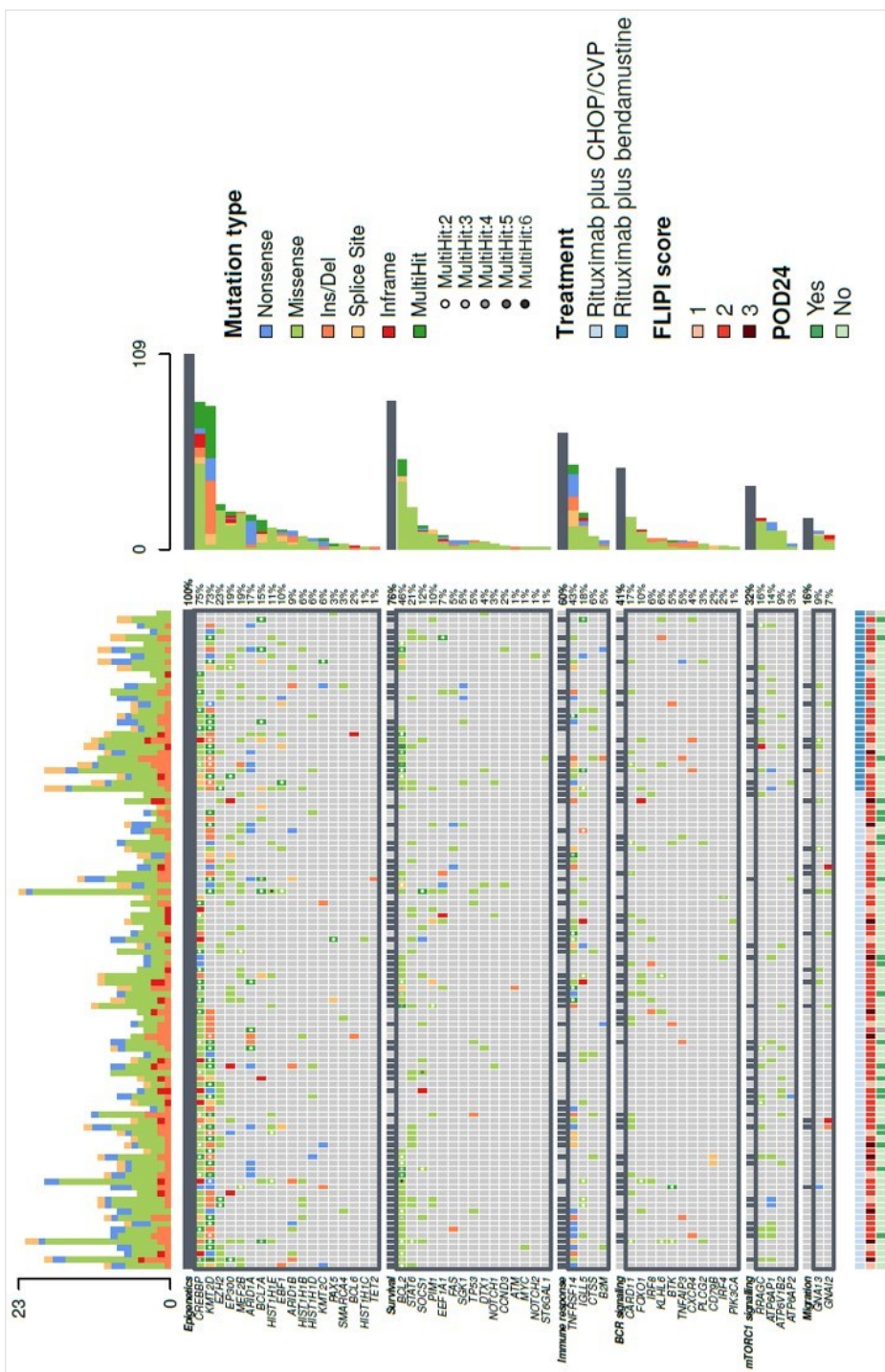


**Figura 29.** Frecuencia mutacional en los genes de la vía de migración celular

Para el gen *GNA13* se observó una tendencia de buen pronóstico, sin resultar significativas las diferencias de supervivencia (Figura 30).



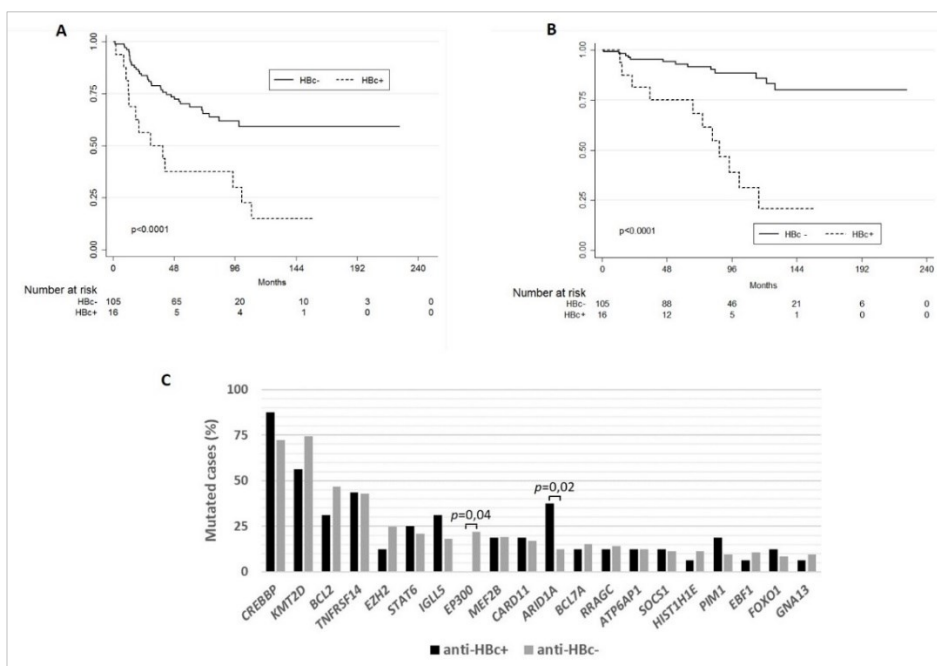
**Figura 30.** Curvas de supervivencia de los genes *GNA13* y *GNAI2*  
 SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión.



**Figura 31. Representación global (oncoplot) de las alteraciones detectadas**  
 Genes mutados y sus frecuencias en la cohorte. En la parte baja de la figura se representan los tratamientos administrados, el índice FLIPI y el POD24. Codificación FLIFI: score 1: 0-1 (bajo), score 2: 2 (intermedio), score 3: 3-5 (alto).

### ► Papel pronóstico de la infección por el virus de la hepatitis B

Como hallazgo adicional del estudio de esta cohorte, se observaron varios parámetros asociados a la infección por el virus de la hepatitis B (VHB). La infección por VHB se ha asociado en estudios epidemiológicos a linfomas B no-Hodgkin, especialmente LDCGB y LF, con indicios de peor pronóstico en los casos con LDCGB, mientras que no se conoce el impacto en LF. Para este análisis se incluyeron 121 pacientes de la cohorte, de los cuales 16 (13,2%) presentaban infección oculta por el VHB (presencia de DNA del virus en hígado y/o suero, sin antígeno de superficie detectable -HBsAg<sup>-</sup> en los que se detecta proteína del core -anti-HBc<sup>+</sup>-). Estos casos presentaban mayor edad al diagnóstico (68,1 vs 57,2 años,  $p=0,007$ ), una  $\beta 2$ -microglobulina más elevada (56,3% vs 28,9%,  $p=0,04$ ) y un peor pronóstico, con una SLP a 10 años del 12,9% vs 58,3% ( $p<0,0001$ ; Figura 32A) y una SG de 22,0% vs 86,2% ( $p<0,0001$ ; Figura 32B). Genéticamente, mostraron mayor frecuencia de mutaciones en el gen *ARID1A* (37,5 vs 12,4%,  $p=0,02$ ) y ausencia de mutaciones en *EP300* (0% vs 29,1%,  $p=0,04$ ), dos importantes reguladores epigenéticos en el LF (Figura 32C).



**Figura 32. Supervivencia y mutaciones según el estado de anti-HBc**

**A:** SLP, supervivencia libre de progresión. **B:** SG, supervivencia global. **C:** Se representan los 20 genes con mayor frecuencia de mutación, según el estado de anti-HBc (HBV positivos en negro, HBV negativos en gris).

## **DISCUSIÓN**

En este trabajo se analiza una cohorte retrospectiva de 191 pacientes con LF al diagnóstico. De los 191 pacientes iniciales, finalmente se incluyeron 109, que cumplían los criterios de inclusión y tratamiento (R-CVP, R-CHOP/R-CHOP-like o R-B), se disponía de material sobrante de su biopsia diagnóstica y se pudieron analizar satisfactoriamente mediante NGS.

El 23% de las biopsias secuenciadas se descartaron por resultar no valorables, detectadas gracias a que se utilizó un panel que incorpora la tecnología de los UMIs. Esta tecnología permitió detectar aquellos resultados que, si bien obtuvieron un número de lecturas totales suficiente, éstas suponían en realidad réplicas de PCR obtenidas a partir de un bajo número de moléculas iniciales de DNA, por lo que la sensibilidad real para la detección de mutaciones era deficiente. Los casos fallidos correspondían a biopsias significativamente más antiguas, si bien la antigüedad media de las biopsias estudiadas en la serie global era superior a los 3 años, tiempo máximo de archivado recomendable para los estudios de NGS en biopsias parafinadas<sup>221,222</sup>. Además, se desconocían algunas condiciones pre-analíticas relevantes, como el tiempo de fijación en formol, el tipo de formol utilizado (tamponado o no) o las condiciones de almacenamiento de los bloques. Para minimizar los efectos de las condiciones pre-analíticas sobre los resultados, se estableció un punto de corte del 10% de VAF, en base al porcentaje de alteraciones C:G>T:A (artefacto característico derivado de la fijación en formol), y del 4% de VAF para aquellas alteraciones bien conocidas o recurrentes. Una gran cantidad de estudios se han centrado en las estrategias para minimizar los efectos perjudiciales de la fijación en los estudios de NGS. Las principales prácticas recomendadas incluyen minimizar el tiempo de fijación, archivar los bloques de tejido a 4°C y limitar en lo posible la exposición al calor durante el procesado de la muestra y en la extracción de los ácidos nucleicos<sup>223,224</sup>. También el sistema de extracción resulta relevante, puesto que cada método permite obtener diferentes grados de rendimiento y pureza; en este sentido, cada vez existe una mayor oferta de kits de extracción específicos para NGS, que incluyen tratamientos enzimáticos para corregir la fragmentación, la desaminación de citosinas y otros artefactos<sup>225</sup>. Un estudio piloto del *100.000 Genomes Project* exploró la viabilidad de las muestras fijadas en formol y parafinadas para ser analizadas mediante secuenciación del genoma (WGS),

mostrando que la correlación entre el tejido congelado y el fijado en formol era sólo del 0,44. Sin embargo, estos resultados mejoraron disminuyendo la temperatura de incubación durante el proceso de purificación del DNA a 65°C y se pudieron detectar el 98% de las variantes clínicamente accionables<sup>226</sup>. El uso de algoritmos bioinformáticos específicos para tejido parafinado, permite también mejorar los resultados<sup>227</sup>. En general, se asume que aunque existen claramente errores detectables cuando se usan biopsias parafinadas para el estudio mediante NGS, éstos son negligibles en la práctica clínica, dada la practicidad de su utilización<sup>222,228-230</sup>. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que puede resultar limitante en otro tipo de análisis, como RNA-seq o análisis de metilación<sup>224</sup>.

En nuestro estudio, todos los pacientes analizados mostraron variantes interpretadas como relacionadas con el tumor, aun con un límite de detección del 10% de VAF y del 4% para alteraciones bien conocidas o recurrentes. Un contenido tumoral insuficiente en la muestra, puede dar lugar a falsos negativos, un problema recurrente en los estudios de NGS, especialmente en la detección de CNA y genes de fusión<sup>231-233</sup>. La revisión histológica para la selección del material previa a la extracción del ADN, fue clave para obtener unos resultados adecuados, con representación tumoral en todos los casos.

Una tercera parte de las variantes incluidas en los análisis fueron clasificadas como probablemente patogénicas. Estas variantes corresponden a mutaciones *missense* que no se encontraban descritas en las bases de datos mutacionales, algo que es común en los linfomas<sup>201,205</sup>. En este caso, deben usarse criterios de patogenicidad con un nivel de evidencia menos robusto, como la agregación de mutaciones regiones próximas, la relevancia funcional del dominio afectado en la proteína y los algoritmos predictivos *in-silico*, criterios sujetos a una mayor subjetividad<sup>203</sup>. A ello se suma el proceso de hipermutación somática aberrante que afecta las células del LF y que introduce mayoritariamente mutaciones *missense*, que pueden ser o no patogénicas<sup>234</sup>. Bajo estas condiciones, es posible que algunas de las variantes incluidas en los análisis representen en realidad alteraciones irrelevantes para el desarrollo de la enfermedad<sup>107</sup>. Pese a esto, las frecuencias mutacionales observadas fueron muy similares a las descritas en la literatura y de hecho, aunque las mutaciones genéticas se consideran a menudo de forma binaria, como eventos conductores o *driver* (alteraciones que



promueven directamente el desarrollo o la progresión del tumor), o bien como eventos pasajeros (alteraciones con poco o ningún efecto en la biología de la enfermedad), el LF no resulta de un único *driver* dominante, sino de la adquisición seriada de alteraciones genéticas que cooperan en la linfomagénesis<sup>10</sup>.

Bajo esta complejidad molecular, hasta ahora apenas se han establecido coocurrencias significativas entre genes mutados, más allá de las mutaciones de *STAT6* y *TNFRSF14*, características del LF de subtipo difuso t(14;18) negativo con expresión de CD23<sup>109</sup>. En este estudio se identificó una elevada probabilidad de co-mutación entre los genes *GNA13* y *FOXO1*; ambos genes activan la vía de señalización PI3K-AKT cuando se encuentran mutados, siendo Gα13 una proteína G implicada en la transducción de señales transmembranal y FOXO1 una proteína efectora principal al final de la vía. mTOR se encuentra también en este eje de señalización, aunque puede actuar de forma independiente a PI3K-AKT<sup>235</sup>. La redundancia de alteraciones en vías de proliferación es común en los tumores y tiene una gran importancia en la estrategia terapéutica. Recientemente se ha descrito que el estado mutacional de *FOXO1* podría suponer un factor determinante en la respuesta a inhibidores de esta vía, como los anticuerpos CD20 (rituximab y otros), inhibidores de BTK y de Pi3K y en LDCGB se está testando la combinación de algunos de estos tratamientos con inhibidores de Aurora cinasa, para sobrepasar este mecanismo<sup>236-238</sup>. En nuestra serie, 11/109 casos portaban mutaciones de *FOXO1*, 5 de ellos con coexistencia de mutaciones en *GNA13*, lo que remarca la potencial relevancia del estado mutacional de *FOXO1* como mecanismo de resistencia primaria recurrente ante inhibidores que actúan sobre proteínas *upstream* en esta vía.

Las alteraciones moleculares en reguladores epigenéticos y transcripcionales suponen el sello molecular del LF y se vieron representadas en nuestra serie acorde con las frecuencias descritas con anterioridad. Aunque ninguno de los genes implicados se asoció de forma significativa con el pronóstico de los pacientes, las curvas de supervivencia para los genes *ARID1A* y *MEF2B* mostraron tendencias al borde de la significancia estadística. Es remarcable que los pacientes con mutación de *ARID1A* tendían a un peor pronóstico en la serie global y en aquellos tratados con R-CHOP/CHOP-like, mientras que en índice m7-FLIPI se asocian a una mayor supervivencia libre de fallo<sup>64</sup>. Dos estudios publicados el

pasado año evaluaron la validez del índice pronóstico m7-FLIPI en pacientes de LF tratados con rituximab (R). En el primer estudio, las mutaciones en *ARID1A* se asociaron a una peor supervivencia global en pacientes tratados con R o R-interferon- $\alpha$ 2a<sup>67</sup>. En el segundo, que analizaba casos exclusivamente tratados con R-CHOP, se halló una tendencia a una peor supervivencia libre de fallo<sup>68</sup>. Nuestros resultados se encuentran en línea con estos hallazgos, apoyando que el modelo m7-FLIPI para la predicción del riesgo en LF, no resulta reproducible bajo estos tratamientos. Sin embargo, detectamos que los pacientes tratados con R-bendamustina (R-B) y mutaciones de *ARID1A* sí tendían a un mejor pronóstico. Las mutaciones en *ARID1A*, que son predominantemente disruptivas, dando lugar a una pérdida de función de la proteína, causan deficiencias en la reparación del daño a DNA y una consecuente elevada inestabilidad genética<sup>98</sup>. Se ha sugerido que esto podría sensibilizar las células del LF ante la radiación y ante agentes anticancerígenos que dañen el DNA<sup>239</sup>. La bendamustina es un agente alquilante y antimetabólico, con un mecanismo de acción particular respecto a otros agentes alquilantes, que se caracteriza por inducir un extensivo daño al DNA. Así, estos resultados suponen un primer indicio de que los pacientes con mutaciones de *ARID1A* podrían beneficiarse del tratamiento preferencial con R-B.

Para las mutaciones de *MEF2B*, se detectó una tendencia hacia el buen pronóstico y a un menor riesgo de POD24 y también se encontraron enriquecidas en el subgrupo de pacientes con mejor respuesta, en línea con los estudios previos<sup>64,67</sup>. Además, hallamos una fuerte asociación entre estas mutaciones y la afectación de la médula ósea. Esta relación no se había descrito hasta la fecha, aunque uno de los principales estudios en modelos murinos sobre el papel linfomageno de las mutaciones de *MEF2B*, sugiere que éstas se asociarían a una enfermedad diseminada, implicando médula ósea, múltiples ganglios y bazo<sup>122</sup>.

El gen *BCL2* es clave para la patogénesis del LF, puesto que la t(14;18) (*IGH/BCL2*) supone el primer evento oncogénico conocido en esta enfermedad. Sin embargo, el impacto de las mutaciones de *BCL2* en el pronóstico de los pacientes continúa siendo controvertido<sup>24,64,123,124</sup>. Las mutaciones de *BCL2* se asocian a una mayor expresión de la enzima AID<sup>123</sup>. La actividad de AID es necesaria para los procesos fisiológicos de hipermutación somática y cambio de isotipo en el especializado

contexto del CG, permitiendo generar anticuerpos de alta afinidad. Aunque esta actividad está predominantemente restringida a los genes de las inmunoglobulinas, la actividad aberrante de AID en el LF induce mutaciones también en otros *loci*, incluido *BCL2*, y continúa durante el desarrollo de la enfermedad, llevando a inestabilidad genética y heterogeneidad clonal en el LF<sup>12,240,241</sup>. En nuestro estudio, la frecuencia, el tipo y la distribución de las mutaciones de *BCL2*, concordaron con el patrón previamente descrito asociado a la hipermutación somática aberrante mediada por AID en el contexto de la t(14;18): predominio de SNVs distribuidas a lo largo de toda la secuencia codificante, que en su mayoría corresponden a transiciones. Es posible que *BCL2* acumule mutaciones durante el transcurso de la enfermedad como consecuencia del proceso de hipermutación somática aberrante, a menudo silenciosas o de bajo impacto patogénico, que se detectarían en mayor número en una rebiopsia posterior (al momento de la transformación), sin implicar un riesgo añadido. Aunque las evidencias más recientes, incluido este estudio, sugieren que las mutaciones de *BCL2* no tienen un rol en el pronóstico del LF por sí mismas, está por ver hasta qué punto interfieren en la enfermedad como fuente de heterogeneidad genética intratumoral.

Las mutaciones del gen *STAT6* se han asociado sobre todo al LF de tipo difuso, caracterizado por la ausencia de t(14;18), pérdida de 1p36 y/o mutaciones en *TNFRSF14*, una elevada frecuencia de mutaciones en *CREBBP* y expresión de CD23<sup>109,110</sup>. En el LF convencional, un 10-20% de pacientes presentan mutaciones activadoras de *STAT6*, que afectan al dominio de unión al DNA, promoviendo la vía de señalización IL4-JAK-STAT, sin haberse asociado hasta la fecha con características clínicas o biológicas<sup>108</sup>. En el presente estudio, las mutaciones de *STAT6* se asociaron con un grado histológico e índice de proliferación bajos, mientras que los pacientes con mutación del aminoácido Asp419 (12,8% del total de casos) mostraron una marcada tendencia hacia una peor supervivencia libre de progresión. Actualmente se encuentran en fase de reclutamiento varios ensayos que analizan la eficacia de los inhibidores de JAK en LNH, incluyendo el LF<sup>165,242,243</sup>. Sin embargo, cabe remarcar que *STAT6* es el factor de transcripción que actúa como último efector de la vía y las mutaciones inducen su actividad constitutiva, con independencia de las señales de fosforilación *upstream* a través

de IL4-JAK (Figura 6E); por tanto, las mutaciones activadoras de *STAT6* podrían significar un mecanismo de resistencia en aquellos fármacos que ejercen inhibición a nivel de las proteínas JAK.

Las mutaciones en el gen supresor *TP53*, aunque infrecuentes (5% de casos) suponen un marcador de mal pronóstico, asociadas también a progresión temprana y transformación histológica<sup>15,64,81</sup>. En nuestra serie, un 4,6% de casos presentaban mutación de *TP53*, la mayoría subclonales, pero no se pudieron establecer correlaciones pronósticas, probablemente debido a un número insuficiente de pacientes estudiados, aunque sí se asociaron a un mayor grado histológico. En este sentido, Burack y colaboradores detectaron hasta un 23% de casos de con mutaciones patogénicas en *TP53* usando métodos de elevada sensibilidad, obteniendo una frecuencia alélica mediana del 2%; pese a que la mayoría de las mutaciones eran subclonales (VAF inferior al 10% en el 81% de casos), se asociaron a peor supervivencia global y libre de progresión en el grupo tratado con radio-inmunoterapia<sup>244</sup>. Estos resultados están en línea con hallazgos similares en otras neoplasias hematológicas, como la leucemia linfática crónica o la leucemia mieloide aguda, poniendo de manifiesto la importancia de estudiar las alteraciones de *TP53* mediante técnicas de alta sensibilidad, en especial en pacientes bajo tratamientos que causan daño extensivo en el DNA<sup>245,246</sup>. Pese a que el papel pronóstico de *TP53* en el LF se conoce desde principios de los años 90, no se encuentra incluido en los sistemas de predicción del riesgo, aunque es de esperar que esto cambie en los próximos años, con el desarrollo de nuevos *scores* pronósticos, en el contexto de la incorporación de técnicas de NGS de alta sensibilidad al ámbito de la rutina clínica.

El LF depende en gran manera de las interacciones que establecen las células tumorales con el microambiente que las rodea, formado principalmente por células inmunológicas y del estroma<sup>28</sup>. En los últimos años, las terapias que reclutan y fortalecen el sistema inmunitario del paciente para atacar los tumores han cobrado una enorme importancia, como la inmunoterapia y las células CAR-T. Por tanto, la caracterización de las interacciones entre las células tumorales con el microambiente ha ganado relevancia, ya que puede revelar nuevos conocimientos sobre la patogénesis de la enfermedad, así como nuevas oportunidades terapéuticas. *TNFRSF14* es uno de los principales genes

involucrados en la interacción con el microambiente y además se encuentra entre los más comúnmente alterados, aunque las consecuencias funcionales de estas alteraciones no se han caracterizado en profundidad. En nuestra cohorte, un 43% de los pacientes mostraron mutaciones de *TNFRSF14*, todos ellos portadores de la t(14;18) (a diferencia del LF difuso, comentado anteriormente) y no se hallaron diferencias en cuanto a la supervivencia. Los estudios iniciales en este gen, habían correlacionado las mutaciones disruptivas de *TNFRSF14* con un peor pronóstico y un mayor riesgo de transformación en el LF<sup>81,142</sup>. Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado esta relación, incluso recientemente se ha descrito que la pérdida de expresión de *TNFRSF14* estaría asociada a un mejor pronóstico, por lo que su papel pronóstico continúa siendo incierto<sup>143</sup>.

Las alteraciones en el gen *CTSS* han ganado relevancia recientemente, gracias a que varios estudios han caracterizado su relevante papel en la comunicación con las células T del microambiente, que favorecen el escape inmune del tumor<sup>145,146</sup>. Las alteraciones activadoras recurrentes en el aminoácido Tyr132 (domino peptidasa), aunque infrecuentes, parecen estar restringidas al LF. En el presente estudio, se identificaron 7 pacientes con la mutación Tyr132Asp (6,4%), que mostraron una notable mejor supervivencia, aunque sin alcanzar la significancia estadística. Hasta la fecha, únicamente Bararia y colaboradores han reportado el papel pronóstico de las alteraciones de *CTSS* en LF, que en su serie de pacientes tratados con R-CHOP se relacionó con una mejor supervivencia libre de fallo, si bien se analizaron conjuntamente los casos con la mutación Y132D y aquellos que presentaban un aumento de expresión de la proteína, contra los pacientes no mutados o con baja expresión<sup>146</sup>. Esta alteración supone un interesante marcador terapéutico en el LF, puesto que el bloqueo de la proteína *CTSS* hiperactivada, podría convertir estos tumores en reconocibles para las células T citotóxicas. Dicho bloqueo podría llevarse a cabo, por ejemplo, a través de moléculas anti-PD1/PD-L1 o inhibidores específicos de cisteína proteasas, un campo de estudio asegurado en un futuro próximo<sup>31,247</sup>.

Los estudios de secuenciación del exoma en LF han revelado múltiples genes mutados en la vía de señalización del receptor de células B (BCR), aunque la mayoría afectan a una baja proporción de casos<sup>24,78,80,82</sup>. *CARD11* (16,5%) y *FOXO1* (10,1%) fueron los 2 genes más frecuentemente alterados en nuestra serie

dentro de este grupo, ambos incluidos en el índice pronóstico m7-FLIPI, asociados a una menor supervivencia libre de fallo<sup>64</sup>. Sin embargo, no observamos correlación entre el estado mutacional de estos genes y el pronóstico de los pacientes, como tampoco en los estudios más recientes que reevaluaron la validez de este índice<sup>67,68</sup>.

Una tercera parte de los pacientes en nuestra serie presentó mutaciones en uno o más de los cuatro genes analizados que forman parte del complejo de señalización mTORC1 (*RRAGC*, *ATP6AP1*, *ATP6AP2* y *ATP6V1B2*). La vía mTOR integra señales intra- y extracelulares, actuando como regulador central del metabolismo, proliferación y supervivencia. Las mutaciones en estos genes, potencian la activación autónoma de las células B, alterando el control paracrino positivo por parte de las células T del microambiente a través del eje PI3K-AKT<sup>128</sup>. Estas mutaciones son muy infrecuentes en otros linfomas o neoplasias sólidas, por lo que parece que tendrían un efecto particular en la fisiopatología del LF. En nuestro estudio, identificamos una respuesta diferencial en los pacientes con mutaciones en los genes del complejo mTORC1 en función del tratamiento administrado, observando una SLP muy superior en aquellos pacientes tratados con R-B, mientras que los pacientes tratados con R-CHOP mostraban una peor SLP. Estos hallazgos, sugieren que el análisis de mutaciones en los genes del complejo mTORC1 al diagnóstico en el LF, permitiría identificar un subgrupo de pacientes que se beneficiaría del tratamiento con R-B. Además, se ha descrito que estas mutaciones sensibilizan *in vitro* las células del LF ante los inhibidores de mTOR o inhibidores bi-funcionales de PI3K/mTOR<sup>128</sup>. Estos inhibidores han mostrado excelentes respuestas en una fracción de pacientes con LF, que podrían estar causadas, al menos en parte, por la presencia de estas mutaciones<sup>248,249</sup>. Otras alteraciones comunes en el LF, como las mutaciones recurrentes de *EZH2* y la delección de *SESNI* (del6q), juegan un importante papel en la regulación de la vía mTOR, por lo que también podrían tener impacto en la respuesta a estos tratamientos<sup>134</sup>. Conjuntamente, los hallazgos de nuestro estudio y las evidencias previas, resaltan la potencial relevancia de analizar al diagnóstico los marcadores que afectan a la regulación de la vía mTOR en el manejo de los pacientes con LF.

Finalmente, identificamos que los pacientes con infección oculta o resuelta de VHB, presentaban una SG y una SLP muy inferiores al resto, independientemente

de otros factores de riesgo clínico bien conocidos. Aunque la infección por VHB se había asociado a un mal pronóstico en LDCGB, el impacto en el LF era hasta ahora desconocido<sup>250-252</sup>. Estos casos presentaban una mayor frecuencia de mutaciones en *ARID1A* y ausencia de mutaciones en *EP300*, sugiriendo una regulación epigenética diferencial. La ausencia de mutaciones en *EP300* se ha descrito también en casos con LDCGB asociados al VHB<sup>251</sup>. Es sabido que las modificaciones epigenéticas que ocurren durante el curso de la infección, tanto en el DNA del virus como en el del huésped, modulan la actividad viral y probablemente contribuyen al desarrollo neoplásico, si bien todavía no se conocen en detalle cuáles son los mecanismos implicados<sup>253</sup>.





## **CONCLUSIONES**



Las conclusiones de esta tesis son:

1. La secuenciación masiva permite analizar el perfil mutacional de los pacientes con linfoma folicular a partir de la biopsia diagnóstica de rutina. La mayoría de pacientes muestran mutaciones en reguladores epigenéticos y transcripcionales y una elevada heterogeneidad de diferentes alteraciones implicadas en otras vías de señalización, sin hallarse patrones o coexistencias que definan subgrupos, por lo que la secuenciación masiva supone un enfoque técnico apropiado para el estudio de esta enfermedad.
2. Los genes que presentan alteraciones concretas recurrentes muestran un impacto pronóstico más definido. Los pacientes con mutaciones de *STAT6*<sup>Asp419</sup> presentan mal pronóstico y aquellos con la mutación de *CTSS*<sup>Tyr132Asp</sup> muestran una supervivencia muy superior y ausencia de afectación de la médula ósea, con potenciales implicaciones en el manejo y el tratamiento.
3. Los pacientes con mutaciones en el gen *ARID1A* y aquellos con mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del complejo mTORC1, mostraron una mejor supervivencia en los casos bajo terapia con rituximab-bendamustina, por lo que la detección de estas alteraciones al diagnóstico del LF podría ser relevante en la elección del tratamiento.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4t. IARC: Lyon, 2017.
- 2 Carbone A, Roulland S, Gloghini A, Younes A, von Keudell G, López-Guillermo A *et al.* Follicular lymphoma. *Nat Rev Dis Prim* 2019; **5**: 1–20.
- 3 Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin* 2016; **66**: 443–459.
- 4 Linfomas no Hodgkin - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/linfoma-no-hodgkin?showall=1> (accessed 24 Dec2020).
- 5 Szumera-Ciećkiewicz A, Wojciechowska U, Didkowska J, Poleszczuk J, Rymkiewicz G, Paszkiewicz-Kozik E *et al.* Population-based epidemiological data of follicular lymphoma in Poland: 15 years of observation. *Sci Rep* 2020; **10**. doi:10.1038/s41598-020-71579-6.
- 6 Arber DA, Orazi A, Hasserjian RR, 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.
- 7 Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; **229**: 1390–1393.
- 8 Limpens J, De Jong D, Van Krieken JHJM, Price CGA, Young BD, Van Ommen GJB *et al.* Bcl-2/J(H) rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 1991; **6**: 2271–2276.
- 9 Limpens J, Stad R, Vos C, De Vlaam C, De Jong D, Van Ommen GJB *et al.* Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1995; **85**: 2528–2536.
- 10 Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: A translational perspective on follicular lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**: 224–239.
- 11 Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson

- NO *et al.* Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 18470–18476.
- 12 Hardianti MS, Tatsumi E, Syampurnawati M, Furuta K, Saigo K, Nakamachi Y *et al.* Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular lymphoma: Association between AID expression and ongoing mutation in FL. *Leukemia* 2004; **18**: 826–831.
- 13 Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 22–33.
- 14 Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. p53 Mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993; **82**: 2289–2295.
- 15 O’Shea D, O’Riain C, Taylor C, Waters R, Carlotti E, MacDougall F *et al.* The presence of *TP53* mutation at diagnosis of Follicular Lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* 2008; **112**: 3126–3129.
- 16 Sorigue M, Sancho JM. Current prognostic and predictive factors in follicular lymphoma. *Ann Hematol* 2018; **97**: 209–227.
- 17 Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, McKay P, Phillips T, Assouline S *et al.* Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2020; **21**: 1433–1442.
- 18 US Food & Drug Admini. FDA granted accelerated approval to tazemetostat for follicular lymphoma. 2020. <https://www.fda.gov/drugs/fda-granted-accelerated-approval-tazemetostat-follicular-lymphoma> (accessed 1 Jan2021).
- 19 National Comprehensive Cancer Network. B-Cell Lymphomas (Version 4.2020). 2020.
- 20 Choi SM, Betz BL, Perry AM. Follicular lymphoma diagnostic caveats and updates. *Arch Pathol Lab Med* 2018; **142**: 1330–1340.
- 21 Horning SJ, Rosenberg SA. The Natural History of Initially Untreated Low-Grade Non-Hodgkin’s Lymphomas. *N Engl J Med* 1984; **311**: 1471–1475.

- 22 Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; **24**: 147–163.
- 23 Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ *et al.* Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 5165–5169.
- 24 Pasqualucci L, Khiabanian H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes AB *et al.* Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep* 2014; **6**: 130–140.
- 25 Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented? *Blood* 2017; **130**: 258–266.
- 26 Sarkozy C, Trneny M, Xerri L, Wickham N, Feugier P, Leppa S *et al.* Risk factors and outcomes for patients with follicular lymphoma who had histologic transformation after response to first-line immunochemotherapy in the PRIMA trial. *J Clin Oncol* 2016; **34**: 2575–2582.
- 27 Silberstein L, Anastasi J. *Hematology*. 7th ed. Elsevier: Philadelphia, 2017.
- 28 Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 517–534.
- 29 Sugimoto T, Watanabe T. Follicular Lymphoma: The Role of the Tumor Microenvironment in Prognosis. *J Clin Exp Hematop* 2016; **56**: 1–19.
- 30 Stenner F, Renner C. Cancer immunotherapy and the immune response in follicular lymphoma. *Front Oncol* 2018; **8**. doi:10.3389/fonc.2018.00219.
- 31 Riether C, Ochsenein AF. Genetic Alterations Impact Immune Microenvironment Interactions in Follicular Lymphoma. *Cancer Cell* 2020; **37**: 621–622.
- 32 Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, Zhou X, Farber CM, Flowers CR *et al.* Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 2516–2522.
- 33 Sortais C, Lok A, Tessoulin B, Gastinne T, Mahé B, Dubruille V *et al.* Progression of disease within 2 years (POD24) is a clinically relevant

- endpoint to identify high-risk follicular lymphoma patients in real life. *Ann Hematol* 2020; **99**: 1595–1604.
- 34 Moccia AA, Schär S, Hayoz S, Piroso MC, Taverna C, Novak U *et al.* Prognostic value of POD24 validation in follicular lymphoma patients initially treated with chemotherapy-free regimens in a pooled analysis of three randomized trials of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Br J Haematol* 2020. doi:10.1111/bjh.17045.
- 35 Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC *et al.* Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 1989; **7**: 1630–1636.
- 36 Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E *et al.* Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. *J. Clin. Oncol.* 2014; **32**: 3059–3067.
- 37 Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM *et al.* Comparison of a Standard Regimen (CHOP) with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1002–1006.
- 38 Fisher RL, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 8447–8452.
- 39 Czuczman MS, Weaver R, Alkuzweny B, Berlfein J, Grillo-López AJ. Prolonged clinical and molecular remission in patients with low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma treated with rituximab plus CHOP chemotherapy: 9-Year follow-up. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 4659–4664.
- 40 Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R *et al.* Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: R. *Blood* 2005; **106**: 3725–3732.
- 41 Salles G, Seymour JF, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, Xerri L *et al.* Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden



- follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011; **377**: 42–51.
- 42 Watanabe T, Tobinai K, Wakabayashi M, Morishima Y, Kobayashi H, Kinoshita T *et al.* Outcomes after R-CHOP in patients with newly diagnosed advanced follicular lymphoma: a 10-year follow-up analysis of the JCOG0203 trial. *Lancet Haematol* 2018; **5**: e520–e531.
- 43 Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat GA, von Grünhagen U, Losem C *et al.* Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2013; **381**: 1203–1210.
- 44 Flinn IW, Van Der Jagt R, Kahl BS, Wood P, Hawkins TE, MacDonald D *et al.* Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: The BRIGHT study. *Blood* 2014; **123**: 2944–2952.
- 45 Freeman CL, Kridel R, Moccia AA, Savage KJ, Villa DR, Scott DW *et al.* Early progression after bendamustine-rituximab is associated with high risk of transformation in advanced stage follicular lymphoma. *Blood* 2019; **134**: 761–764.
- 46 Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C *et al.* Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *N Engl J Med* 2017; **377**: 1331–1344.
- 47 Hiddemann W, Barbui AM, Canales MA, Cannell PK, Collins GP, Dürig J *et al.* Immunochemotherapy with obinutuzumab or rituximab for previously untreated follicular lymphoma in the GALLIUM study: Influence of chemotherapy on efficacy and safety. *J Clin Oncol* 2018; **36**: 2395–2404.
- 48 Seymour JF, Marcus R, Davies A, Evans EG, Grigg A, Haynes A *et al.* Association of early disease progression and very poor survival in the GALLIUM study in follicular lymphoma: Benefit of obinutuzumab in reducing the rate of early progression. *Haematologica* 2019; **104**: 1202–1208.
- 49 Bannerji R, Allan JN, Arnason JE, Brown JR, Advani RH, Barnes JA *et al.* Clinical Activity of REGN1979, a Bispecific Human, Anti-CD20 x Anti-

- CD3 Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory (R/R) B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL). *Blood* 2019; **134**: 762.
- 50 Morschhauser F, Fowler NH, Feugier P, Bouabdallah R, Tilly H, Palomba ML *et al.* Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. *N Engl J Med* 2018; **379**: 934–947.
- 51 Leonard JP, Trneny M, Izutsu K, Fowler NH, Hong X, Zhu J *et al.* AUGMENT: A Phase III study of lenalidomide plus rituximab versus placebo plus rituximab in relapsed or refractory indolent lymphoma. *J Clin Oncol* 2019; **37**: 1188–1199.
- 52 Phillips TJ, Michot JM, Ribrag V. Can Next-Generation PI3K Inhibitors Unlock the Full Potential of the Class in Patients With B-Cell Lymphoma? *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 2020. doi:10.1016/j.clml.2020.08.022.
- 53 Zinzani PL, Flinn IW, Yuen SLS, Topp MS, Rusconi C, Fleury I *et al.* Venetoclax-rituximab ± bendamustine vs bendamustine-rituximab in relapsed/refractory follicular lymphoma: CONTRALTO. *Blood* 2020; **12**: 2628–2637.
- 54 Hawkes EA, Manos K, Chong G, Palmer J, MacManus MP, Keane C *et al.* Phase I study of radiotherapy (RT) & durvalumab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) & follicular lymphoma (FL): The RADD study. *J Clin Oncol* 2020; **38**: TPS8075–TPS8075.
- 55 Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* 2017; **377**: 2545–2554.
- 56 Jacobson CA, Chavez JC, Sehgal AR, William BM, Munoz J, Salles GA *et al.* Interim analysis of ZUMA-5: A phase II study of axicabtagene ciloleucel (axi-cel) in patients (pts) with relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (R/R iNHL). *J Clin Oncol* 2020; **38**: 8008–8008.
- 57 Kahl BSBBS, Yang DT, MacLennan I, Basso K, Dalla-Favera R, Roulland S *et al.* Follicular lymphoma: evolving therapeutic strategies. *Blood* 2016; **127**: 2055–2063.
- 58 Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R *et al.* Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004; **104**: 1258–1265.

- 59 Buske C, Hoster E, Dreyling M, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vinc. *Blood* 2006; **108**: 1504–1508.
- 60 Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U *et al.* Follicular lymphoma international prognostic index 2: A new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 4555–4562.
- 61 Bachy E, Maurer MJ, Habermann TM, Gelas-Dore B, Maucort-Boulch D, Estell JA *et al.* A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood* 2018; **132**: 49–58.
- 62 Kimby E, Lockmer S, Holte H, Hagberg H, Wahlin BE, Brown P *et al.* The simplified follicular lymphoma PRIMA-prognostic index is useful in patients with first-line chemo-free rituximab-based therapy. *Br J Haematol* 2020; **191**: 738–747.
- 63 Mir F, Mattiello F, Grigg A, Herold M, Hiddemann W, Marcus R *et al.* Follicular Lymphoma Evaluation Index (FLEX): A new clinical prognostic model that is superior to existing risk scores for predicting progression-free survival and early treatment failure after frontline immunochemotherapy. *Am J Hematol* 2020; **95**: 1503–1510.
- 64 Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M *et al.* Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015; **16**: 1111–1122.
- 65 Jurinovic V, Kridel R, Staiger AM, Szczepanowski M, Horn H, Dreyling MH *et al.* Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy. *Blood* 2016; **128**: 1112–1120.
- 66 Huet S, Tesson B, Jais JP, Feldman AL, Magnano L, Thomas E *et al.* A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in

- three international cohorts. *Lancet Oncol* 2018; **19**: 549–561.
- 67 Lockmer S, Ren W, Brodtkorb M, Østenstad B, Wahlin BE, Pan-Hammarström Q *et al.* M7-FLIPI is not prognostic in follicular lymphoma patients with first-line rituximab chemo-free therapy. *Br J Haematol* 2020; **188**: 259–267.
- 68 Alig S, Jurinovic V, Esfahani MS, Haebe S, Passerini V, Hellmuth JC *et al.* Evaluating upfront high-dose consolidation after R-CHOP for follicular lymphoma by clinical and genetic risk models. *Blood Adv* 2020; **4**: 4451–4462.
- 69 Weigert O, Weinstock DM. The promises and challenges of using gene mutations for patient stratification in follicular lymphoma. *Blood* 2017; **130**: 1491–1498.
- 70 Lipof JJ, Barr PM. Early Progression of Follicular Lymphoma: Biology and Treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* 2020; **34**: 757–769.
- 71 Barr PM, Patel T, Dela Cruz SE, Hussein MA, Castine MJ, Farris BY *et al.* Real-world practice patterns in follicular lymphoma (FL) care at community oncology centers. *J Clin Oncol* 2020; **38**: 231–231.
- 72 Kahl BS. Follicular lymphoma: Are we ready for a risk-adapted approach? *Hematology* 2017; **2017**: 358–364.
- 73 Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosom Cancer* 2001; **30**: 375–382.
- 74 Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M *et al.* Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002; **99**: 3806–3812.
- 75 Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJM. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007; **21**: 18–29.
- 76 Cheung KJJ, Shah SP, Steidl C, Johnson N, Relander T, Telenius A *et al.* Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood* 2009; **113**: 137–148.
- 77 Alhejaily A, Day AG, Feilotter HE, Baetz T, LeBrun DP. Inactivation of the

- CDKN2A tumor-suppressor gene by deletion or methylation is common at diagnosis in follicular lymphoma and associated with poor clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 1676–1686.
- 78 Green MR, Gentles AJ, Nair R V., Irish JM, Kihira S, Liu CL *et al.* Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* 2013; **121**: 1604–1611.
- 79 Brodtkorb M, Lingjaerde OC, Huse K, Troen G, Hystad M, Hilden VI *et al.* Whole-genome integrative analysis reveals expression signatures predicting transformation in follicular lymphoma. *Blood* 2014; **123**: 1051–1054.
- 80 Okosun J, Bödör C, Wang J, Araf S, Yang C-YY, Pan C *et al.* Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet* 2014; **46**: 176–181.
- 81 Kridel R, Chan FC, Mottok A, Boyle M, Farinha P, Tan K *et al.* Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS Med* 2016; **13**: e1002197.
- 82 Krysiak K, Gomez F, White BS, Matlock M, Miller CA, Trani L *et al.* Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood* 2016; **129**: 473–483.
- 83 Béguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M *et al.* EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation. *Cancer Cell* 2013; **23**: 677–692.
- 84 Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee J-E, Holmes AB, Bansal M *et al.* Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med* 2015; **21**: 1190–1198.
- 85 Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, Pan H, Jiang Y, Zhao C *et al.* The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med* 2015; **21**: 1199–1208.
- 86 Zhang J, Vlasevska S, Wells VA, Nataraj S, Holmes AB, Duval R *et al.* The CREBBP acetyltransferase is a haploinsufficient tumor suppressor in B-cell lymphoma. *Cancer Discov* 2017; **7**: 323–337.

- 87 Jiang Y, Ortega-Molina A, Geng H, Ying HY, Hatzi K, Parsa S *et al.* CREBBP inactivation promotes the development of HDAC3-dependent lymphomas. *Cancer Discov* 2017; **7**: 38–53.
- 88 García-Ramírez I, Tadros S, González-Herrero I, Martín-Lorenzo A, Rodríguez-Hernández G, Moore D *et al.* Crebbp loss cooperates with Bcl2 overexpression to promote lymphoma in mice. *Blood* 2017; **129**: 2645–2656.
- 89 Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations. *Epigenetics* 2017; **12**: 370–377.
- 90 Green MR, Kihira S, Liu CL, Nair R V, Salari R, Gentles AJ *et al.* Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: E1116–1125.
- 91 Green MR. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. *Blood*. 2018; **131**: 595–604.
- 92 Baliñas-Gavira C, Rodríguez MI, Andrades A, Cuadros M, Álvarez-Pérez JC, Álvarez-Prado ÁF *et al.* Frequent mutations in the amino-terminal domain of BCL7A impair its tumor suppressor role in DLBCL. *Leukemia* 2020; **34**: 2722–2735.
- 93 Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD *et al.* Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011; **476**: 298–303.
- 94 Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, Lorenz IC, Hussein S, Bansal M *et al.* MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Immunol* 2013; **14**: 1084–1092.
- 95 Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V *et al.* Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011; **471**: 189–195.
- 96 Li H, Kaminski MS, Li Y, Yildiz M, Ouillette P, Jones S *et al.* Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D and E, OCT2 (POU2F2), IRF8 and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2014; **123**: 1487–1498.
- 97 Wu JN, Roberts CWM. ARID1A mutations in cancer: Another epigenetic

- tumor suppressor? *Cancer Discov* 2013; **3**: 35–43.
- 98 Shen J, Peng Y, Wei L, Zhang W, Yang L, Lan L *et al.* ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Discov* 2015; **5**: 752–767.
- 99 Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégret J, Storck S *et al.* Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009; **10**: 1292–1299.
- 100 Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**: 229–243.
- 101 Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW *et al.* Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008; **319**: 1676–1679.
- 102 Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; **463**: 88–92.
- 103 Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula S V, Brahmachary M, Shen Q *et al.* Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- $\kappa$ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009; **459**: 717–721.
- 104 Rui L, Schmitz R, Ceribelli M, Staudt LM. Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol* 2011; **12**: 933–940.
- 105 Xia Z, Zhang X, Liu P, Zhang R, Huang Z, Li D *et al.* GNA13 regulates BCL2 expression and the sensitivity of GCB-DLBCL cells to BCL2 inhibitors in a palmitoylation-dependent manner. *Cell Death Dis* 2021; **12**. doi:10.1038/s41419-020-03311-1.
- 106 Pangault C, Amé-Thomas P, Ruminy P, Rossille D, Caron G, Baia M *et al.* Follicular lymphoma cell niche: Identification of a preeminent IL-4-dependent TFH-B cell axis. *Leukemia* 2010; **24**: 2080–2089.
- 107 Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2018; **31**: 2–14.
- 108 Yildiz M, Li H, Bernard D, Amin NA, Ouillet P, Jones S *et al.* Lymphoid neoplasia: Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood* 2015; **125**: 668–679.

- 109 Siddiqi IN, Friedman J, Barry-Holson KQ, Ma C, Thodima V, Kang I *et al.* Characterization of a variant of t(14;18) negative nodal diffuse follicular lymphoma with CD23 expression, 1p36/TNFRSF14 abnormalities, and STAT6 mutations. *Mod Pathol* 2016; **29**: 570–581.
- 110 Xian RR, Xie Y, Haley LM, Yonescu R, Pallavajjala A, Pittaluga S *et al.* CREBBP and STAT6 co-mutation and 16p13 and 1p36 loss define the t(14;18)-negative diffuse variant of follicular lymphoma. *Blood Cancer J* 2020; **10**. doi:10.1038/s41408-020-0335-0.
- 111 Nann D, Ramis-Zaldivar JE, Müller I, Gonzalez-Farre B, Schmidt J, Egan C *et al.* Follicular lymphoma t(14;18)-negative is genetically a heterogeneous disease. *Blood Adv* 2020; **4**: 5652–5665.
- 112 Saito M, Novak U, Piovan E, Basso K, Sumazin P, Schneider C *et al.* BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 11294–11299.
- 113 Pasqualucci L. Molecular pathogenesis of germinal center-derived B cell lymphomas. *Immunol. Rev.* 2019; **288**: 240–261.
- 114 Mlynarczyk C, Fontán L, Melnick A. Germinal center-derived lymphomas: The darkest side of humoral immunity. *Immunol Rev* 2019; **288**: 214–239.
- 115 Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: A harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003; **102**: 1443–1448.
- 116 Yang H, Green MR. Epigenetic Programing of B-Cell Lymphoma by BCL6 and Its Genetic Deregulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019; **7**. doi:10.3389/fcell.2019.00272.
- 117 Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L *et al.* BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 11816–11821.
- 118 Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, Quattrone S, Migliaretti G, Fassone L *et al.* Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* 2000; **95**: 651–659.
- 119 Meyer SN, Scuoppo C, Vlasevska S, Bal E, Holmes AB, Holloman M *et al.* Unique and Shared Epigenetic Programs of the CREBBP and EP300



- Acetyltransferases in Germinal Center B Cells Reveal Targetable Dependencies in Lymphoma. *Immunity* 2019; **51**: 535-547.e9.
- 120 Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early Steps of Follicular Lymphoma Pathogenesis. In: *Advances in Immunology*. Academic Press Inc., 2011, pp 1–46.
- 121 Pon JR, Wong J, Saberi S, Alder O, Moksa M, Grace Cheng SW *et al*. *MEF2B* mutations in non-Hodgkin lymphoma dysregulate cell migration by decreasing *MEF2B* target gene activation. *Nat Commun* 2015; **6**. doi:10.1038/ncomms8953.
- 122 Brescia P, Schneider C, Holmes AB, Shen Q, Hussein S, Pasqualucci L *et al*. *MEF2B* Instructs Germinal Center Development and Acts as an Oncogene in B Cell Lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2018; **34**: 453-465.e9.
- 123 Correia C, Schneider PA, Dai H, Dogan A, Maurer MJ, Church AK *et al*. *BCL2* mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood* 2015; **125**: 658–667.
- 124 Huet S, Szafer-Glusman E, Tesson B, Xerri L, Fairbrother WJ, Mukhyala K *et al*. *BCL2* mutations do not confer adverse prognosis in follicular lymphoma patients treated with rituximab. *Am J Hematol* 2017; **92**: 515–519.
- 125 Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 935–945.
- 126 Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Science (80- )* 2011; **334**: 678–683.
- 127 Ying ZX, Jin M, Peterson LF, Bernard D, Saiya-Cork K, Yildiz M *et al*. Recurrent mutations in the MTOR regulator RRAGC in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 5383–5393.
- 128 Ortega-Molina A, Deleyto-Seldas N, Carreras J, Sanz A, Lebrero-Fernández C, Menéndez C *et al*. Oncogenic Rag GTPase signalling enhances B cell activation and drives follicular lymphoma sensitive to pharmacological inhibition of mTOR. *Nat Metab* 2019; **1**: 775–789.
- 129 Calimeri T, Ferreri AJM. m-TOR inhibitors and their potential role in

- haematological malignancies. *Br J Haematol* 2017; **177**: 684–702.
- 130 Magnoli F, Tibiletti MG, Uccella S. Unraveling Tumor Heterogeneity in an Apparently Monolithic Disease: BCL2 and Other Players in the Genetic Landscape of Nodal Follicular Lymphoma. *Front Med* 2019; **6**: 44.
- 131 Li VD, Li KH, Li JT. TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; **145**: 625–636.
- 132 Sander C, Yano T, Clark H, Harris C, Longo D, Jaffe E *et al.* p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993; **82**: 1994–2004.
- 133 Onaindia A, Medeiros LJ, Patel KP. Clinical utility of recently identified diagnostic, prognostic, and predictive molecular biomarkers in mature B-cell neoplasms. *Mod Pathol* 2017; **30**: 1338–1366.
- 134 Oricchio E, Katanayeva N, Donaldson MC, Sungalee S, Joyce PP, Béguelin W *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of SESTRIN1 controls mTORC1 and response to EZH2 inhibition in follicular lymphoma. *Sci Transl Med* 2017; **9**. doi:10.1126/scitranslmed.aak9969.
- 135 Budanov A V., Karin M. p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling. *Cell* 2008; **134**: 451–460.
- 136 Cheung KJJ, Delaney A, Ben-Neriah S, Schein J, Lee T, Shah SP *et al.* High resolution analysis of follicular lymphoma genomes reveals somatic recurrent sites of copy-neutral loss of heterozygosity and copy number alterations that target single genes. *Genes Chromosom Cancer* 2010; **49**: 669–681.
- 137 Linley A, Krysov S, Ponzoni M, Johnson PW, Packham G, Stevenson FK. Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood* 2015; **126**: 1902–1910.
- 138 Launay E, Pangault C, Bertrand P, Jardin F, Lamy T, Tilly H *et al.* High rate of *TNFRSF14* gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia* 2012; **26**: 559–562.
- 139 Mintz MA, Felce JH, Chou MY, Mayya V, Xu Y, Shui JW *et al.* The HVEM-

- BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity* 2019; **51**: 310-323.e7.
- 140 Boice M, Salloum D, Mourcin F, Sanghvi V, Amin R, Oricchio E *et al.* Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* 2016; **167**: 405-418.e13.
- 141 Schmidt J, Gong S, Marafioti T, Mankel B, Gonzalez-Farre B, Balagué O *et al.* Genome-wide analysis of pediatric-type follicular lymphoma reveals low genetic complexity and recurrent alterations of *TNFRSF14* gene. *Blood* 2016; **128**: 1101–1111.
- 142 Cheung KJJ, Johnson NA, Affleck JG, Severson T, Steidl C, Ben-Neriah S *et al.* Acquired *TNFRSF14* mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. *Cancer Res* 2010; **70**: 9166–9174.
- 143 Carreras J, Lopez-Guillermo A, Kikuti YY, Itoh J, Masashi M, Ikoma H *et al.* High *TNFRSF14* and low BTLA are associated with poor prognosis in Follicular Lymphoma and in Diffuse Large B-cell Lymphoma transformation. *J Clin Exp Hematop* 2019; **59**: 1–16.
- 144 Guo-Ping S, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Lijuan G, Haley KJ *et al.* Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 1999; **10**: 197–206.
- 145 Dheilily E, Battistello E, Katanayeva N, Sungalee S, Michaux J, Duns G *et al.* Cathepsin S Regulates Antigen Processing and T Cell Activity in Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Cell* 2020; **37**: 674-689.e12.
- 146 Bararia D, Hildebrand JA, Stolz S, Haebe S, Alig S, Trevisani CP *et al.* Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma. *Cell Rep* 2020; **31**. doi:10.1016/j.celrep.2020.107522.
- 147 Béguelin W, Teater M, Meydan C, Hoehn KB, Phillip JM, Soshnev AA *et al.* Mutant EZH2 Induces a Pre-malignant Lymphoma Niche by Reprogramming the Immune Response. *Cancer Cell* 2020; **37**: 655-673.e11.
- 148 Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP *et al.* Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision

- Medicine Working Group. *Ann Oncol* 2020; **31**: 1491–1505.
- 149 Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. *J Mol Diagnostics* 2017; **19**: 4–23.
- 150 Chakravarty D, Gao J, Phillips S, Kundra R, Zhang H, Wang J *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* 2017; **1**: 1–16.
- 151 Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH *et al.* Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors guideline from the college of American pathologists, the international association for the study of lung cancer, and the A. *Arch Pathol Lab Med* 2018; **142**: 321–346.
- 152 National Comprehensive Cancer Network. Acute Myeloid Leukemia (Version 2.2021). 2020. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf).
- 153 Haferlach T. Advancing leukemia diagnostics: Role of next generation sequencing (NGS) in acute myeloid leukemia. *Hematol Rep* 2020; **12**: 1–12.
- 154 Malcovati L, Galli A, Travaglio E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E *et al.* Predictive Value of Mutation Analysis in the Diagnostic Approach to Patients with Unexplained Cytopenia. *Blood* 2016; **128**: 298.
- 155 Lindsley RC, Saber W, Mar BG, Redd R, Wang T, Haagenson MD *et al.* Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2017; **376**: 536–547.
- 156 Oberling F, Hollard D. Myelodysplastic syndromes. *Nouv Rev Fr Hematol* 1991; **33**: 159–160.
- 157 National Comprehensive Cancer Network. Myelodysplastic Syndromes (Version 3.2021). 2021. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf).
- 158 Mina AA, Stein B. Next-Generation Sequencing in Myeloproliferative Neoplasms: Is This Indicated in All Patients? *Curr Hematol Malig Rep* 2019; **14**: 137–144.

- 159 National Comprehensive Cancer Network. Myeloproliferative Neoplasms (Version 1.2020). 2020.[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/mpn.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/mpn.pdf).
- 160 Rosenquist R, Rosenwald A, Du MQ, Gaidano G, Groenen P, Wotherspoon A *et al*. Clinical impact of recurrently mutated genes on lymphoma diagnostics: State-of-the-art and beyond. *Haematologica* 2016; **101**: 1002–1009.
- 161 Sujobert P, Le Bris Y, De Leval L, Gros A, Merlio JP, Pastoret C *et al*. The Need for a Consensus Next-generation Sequencing Panel for Mature Lymphoid Malignancies. *HemaSphere* 2019; **3**: e169.
- 162 Heimann P, Dewispelaere L. Indications of next-generation sequencing in non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2020; **32**: 391–397.
- 163 Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R *et al*. Ibrutinib in previously treated Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2015; **372**: 1430–40.
- 164 Crisci S, Francia R Di, Mele S, Vitale P, Ronga G, De Filippi R *et al*. Overview of targeted drugs for mature B-cell non-hodgkin lymphomas. *Front Oncol* 2019; **9**: 443.
- 165 Wang L, Qin W, Huo YJ, Li X, Shi Q, Rasko JEJ *et al*. Advances in targeted therapy for malignant lymphoma. *Signal Transduct Target Ther* 2020; **5**: 1–46.
- 166 US Food and Drug Administration (FDA). Hematology/Oncology (Cancer) Approvals & Safety Notifications. 2019<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/hematologyoncology-cancer-approvals-safety-notifications> (accessed 6 Feb2021).
- 167 US Food and Drug Administration. List of cleared or approved companion diagnostic devices (in vitro and imaging tools ) Available from <https://www.fda.gov/medicalDevices/productsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm> (cessed 2020). 2020.<https://www.fda.gov/medical-devices/vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-vitro-and-imaging-tools> (accessed 6 Feb2021).
- 168 Goodman AM, Choi M, Wieduwilt M, Mulroney C, Costello C, Frampton

- G *et al.* Next-Generation Sequencing Reveals Potentially Actionable Alterations in the Majority of Patients With Lymphoid Malignancies. *JCO Precis Oncol* 2017; **1**: 1–13.
- 169 Pillonel V, Juskevicius D, Bihl M, Stenner F, Halter JP, Dirnhofer S *et al.* Routine next generation sequencing of lymphoid malignancies: clinical utility and challenges from a 3-Year practical experience. *Leuk Lymphoma* 2020; **61**: 2568–2583.
- 170 Scott AJ, Tokaz MC, Shango M, Devata S, Carty SA, Kaminski MS *et al.* Clinical application of next generation sequencing in lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2020. doi:10.1080/10428194.2020.1846734.
- 171 Davis AR, Stone SL, Oran AR, Sussman RT, Bhattacharyya S, Morrisette JJD *et al.* Targeted massively parallel sequencing of mature lymphoid neoplasms: assessment of empirical application and diagnostic utility in routine clinical practice. *Mod Pathol* 2020. doi:10.1038/s41379-020-00720-7.
- 172 Shevchenko Y, Bale S. Clinical versus research sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; **6**. doi:10.1101/cshperspect.a025809.
- 173 Bewicke-Copley F, Arjun Kumar E, Palladino G, Korfi K, Wang J. Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019; **17**: 1348–1359.
- 174 Ohgami RS, Rosenwald A, Bagg A. Next-Generation Sequencing for Lymphomas: Perfecting a Pipeline for Personalized Pathobiologic and Prognostic Predictions. *J Mol Diagnostics* 2018; **20**: 163–165.
- 175 Hung SS, Meissner B, Chavez EA, Ben-Neriah S, Ennishi D, Jones MR *et al.* Assessment of Capture and Amplicon-Based Approaches for the Development of a Targeted Next-Generation Sequencing Pipeline to Personalize Lymphoma Management. *J Mol Diagnostics* 2018; **20**: 203–214.
- 176 Guillermin Y, Lopez J, Chabane K, Hayette S, Bardel C, Salles G *et al.* What Does This Mutation Mean? The Tools and Pitfalls of Variant Interpretation in Lymphoid Malignancies. *Int J Mol Sci* 2018; **19**. doi:10.3390/ijms19041251.
- 177 Cassidy DP, Chapman JR, Lopez R, White K, Fan YS, Casas C *et al.* Comparison between Integrated Genomic DNA/RNA Profiling and

- Fluorescence in Situ Hybridization in the Detection of MYC, BCL-2, and BCL-6 Gene Rearrangements in Large B-Cell Lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2020; **153**: 353–359.
- 178 Szankasi P, Bolia A, Liew M, Schumacher JA, Gee EPS, Matynia AP *et al.* Comprehensive detection of chromosomal translocations in lymphoproliferative disorders by massively parallel sequencing. *J Hematop* 2019; **12**: 121–133.
- 179 Scheijen B, Meijers RWJ, Rijntjes J, van der Klift MY, Möbs M, Steinhilber J *et al.* Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia* 2019; **33**: 2227–2240.
- 180 Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram J, Boudjogrha M, Bystry V *et al.* Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia* 2019; **33**: 2241–2253.
- 181 Gupta SK, Viswanatha DS, Patel KP. Evaluation of Somatic Hypermutation Status in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) in the Era of Next Generation Sequencing. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 357.
- 182 Colomer R, Mondejar R, Romero-Laorden N, Alfranca A, Sanchez-Madrid F, Quintela-Fandino M. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer? *EClinicalMedicine* 2020; **25**. doi:10.1016/j.eclinm.2020.100487.
- 183 Vasef MA, Bromley C, Sturm M, Medeiros LJ. Effects of six different tissue fixatives on DNA quality as determined by polymerase chain reaction amplification of genes ranging from 100 to 574 base pairs. *J Histotechnol* 2003; **26**: 111–115.
- 184 Piskorz AM, Ennis D, Macintyre G, Goranova TE, Eldridge M, Segui-Gracia N *et al.* Methanol-based fixation is superior to buffered formalin for next-generation sequencing of DNA from clinical cancer samples. *Ann Oncol* 2016; **27**: 532–539.
- 185 Perry C, Chung JY, Ylaya K, Choi CH, Simpson A, Matsumoto KT *et al.* A Buffered Alcohol-Based Fixative for Histomorphologic and Molecular Applications. *J Histochem Cytochem* 2016; **64**: 425–440.

- 186 Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: Causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 2015; **61**: 64–71.
- 187 Ademà V, Torres E, Solé F, Serrano S, Bellosillo B. Paraffin Treasures: Do They Last Forever? *Biopreserv Biobank* 2014; **12**: 281–283.
- 188 Cree IA, Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJLL, Groenen P, Van Krieken JH *et al.* Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014; **67**: 923–931.
- 189 Prentice LM, Miller RR, Knaggs J, Mazloomian A, Hernandez RA, Franchini P *et al.* Formalin fixation increases deamination mutation signature but should not lead to false positive mutations in clinical practice. *PLoS One* 2018; **13**: e0196434.
- 190 Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Nakagawa S, Sato N, Kaneko K *et al.* Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. *J Surg Res* 2017; **220**: 125–132.
- 191 Araf S, Wang J, Korfi K, Pangault C, Kotsiou E, Rio-Machin A *et al.* Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia* 2018; **32**: 1258–1263.
- 192 Delfau-Larue MH, Van Der Gucht A, Dupuis J, Jais JP, Nel I, Beldi-Ferchiou A *et al.* Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: Distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood Adv* 2018; **2**: 807–816.
- 193 Huet S, Salles G. Potential of Circulating Tumor DNA for the Management of Patients With Lymphoma. *JCO Oncol Pract* 2020; **16**: 561–568.
- 194 Andrade-Campos MM, Salar A, Sanchez-Gonzalez B, Fernández-Rodríguez C, Gimeno E, Ruiz L *et al.* Assessment of Cell-Free DNA (cfDNA) in 221 Patients with Lymphoproliferative Malignancies at Diagnosis and during Follow-up. *Blood* 2019; **134**: 492–492.
- 195 Froyen G, Le Mercier M, Lierman E, Vandepoele K, Nollet F, Boone E *et al.* Standardization of Somatic Variant Classifications in Solid and Haematological Tumours by a Two-Level Approach of Biological and Clinical Classes: An Initiative of the Belgian ComPerMed Expert Panel. *Cancers (Basel)* 2019; **11**: 2030.
- 196 Leeksa OC, De Miranda NF, Veelken H. Germline mutations



- predisposing to diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J* 2017; **7**: e532.
- 197 Mosquera Orgueira A, Antelo Rodríguez B, Alonso Vence N, Díaz Arias JÁ, Díaz Varela N, Pérez Encinas MM *et al.* The association of germline variants with chronic lymphocytic leukemia outcome suggests the implication of novel genes and pathways in clinical evolution. *BMC Cancer* 2019; **19**: 515.
- 198 Wang X, Song Y, Chen W, Ding N, Liu W, Xie Y *et al.* Germline variants of DNA repair genes in early onset mantle cell lymphoma. *Oncogene* 2021; **40**: 551–563.
- 199 Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020; **581**: 434–443.
- 200 Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge. *Wspolczesna Onkol* 2015; **1A**: A68–A77.
- 201 Nadarajah N, Wagner A, Bejar R, Ewalt M, Kim AS, Le Beau MM *et al.* Creating a Variant Database for the American Society of Hematology By Consensus Variant Classification of Common Genes Associated with Hematologic Malignancies. *Blood* 2020; **136**: 4–5.
- 202 Sukhai MA, Craddock KJ, Thomas M, Hansen AR, Zhang T, Siu L *et al.* A classification system for clinical relevance of somatic variants identified in molecular profiling of cancer. *Genet Med* 2016; **18**: 128–136.
- 203 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; **17**: 405–424.
- 204 Leichsenring J, Horak P, Kreutzfeldt S, Heining C, Christopoulos P, Volckmar AL *et al.* Variant classification in precision oncology. *Int J Cancer* 2019; **145**: 2996–3010.
- 205 Baer C, Walter W, Hutter S, Twardziok S, Meggendorfer M, Kern W *et al.* “Somatic” and “pathogenic”-Is the classification strategy applicable in times of large-scale sequencing? *Haematologica* 2019; **104**: 1515–1520.

- 206 Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoun SF *et al.* Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med* 2014; **371**: 2477–2487.
- 207 Yokoyama A, Kakiuchi N, Yoshizato T, Nannya Y, Suzuki H, Takeuchi Y *et al.* Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature* 2019; **565**: 312–317.
- 208 Husby S, Favero F, Nielsen C, Sørensen BS, Bæch J, Grell K *et al.* Clinical impact of clonal hematopoiesis in patients with lymphoma undergoing ASCT: a national population-based cohort study. *Leukemia* 2020; **34**: 3256–3268.
- 209 Treon SP, Xu L, Hunter Z. MYD88 Mutations and Response to Ibrutinib in Waldenström’s Macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2015; **373**: 584–586.
- 210 Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G *et al.* Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med* 2015; **21**: 922–926.
- 211 Liu M, Watson LT, Zhang L. Predicting the combined effect of multiple genetic variants. *Hum Genomics* 2015; **9**. doi:10.1186/s40246-015-0040-4.
- 212 Kent DG, Green AR. Order matters: The order of somatic mutations influences cancer evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017; **7**. doi:10.1101/cshperspect.a027060.
- 213 Wallis Y, Payne S, Mcanulty C, Bodmer D, Sistermans E, Robertson K *et al.* Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. 2013. [https://www.acgs.uk.com/media/10791/evaluation\\_and\\_reporting\\_of\\_sequence\\_variants\\_bpgs\\_june\\_2013\\_-\\_finalpdf.pdf](https://www.acgs.uk.com/media/10791/evaluation_and_reporting_of_sequence_variants_bpgs_june_2013_-_finalpdf.pdf) (accessed 14 Feb 2021).
- 214 Kato S, Kim KH, Lim HJ, Boichard A, Nikanjam M, Weihe E *et al.* Real-world data from a molecular tumor board demonstrates improved outcomes with a precision N-of-One strategy. *Nat Commun* 2020; **11**: 1–9.
- 215 Koopman B, van der Wekken AJ, ter Elst A, Hiltermann TJN, Vilacha JF, Groves MR *et al.* Relevance and Effectiveness of Molecular Tumor Board Recommendations for Patients With Non–Small–Cell Lung Cancer With Rare or Complex Mutational Profiles. *JCO Precis Oncol* 2020; **4**: 393–410.

- 216 Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD *et al.* Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet* 2016; **98**: 1067–1076.
- 217 Rieke DT, Lamping M, Schuh M, Le Tourneau C, Basté N, Burkard ME *et al.* Comparison of Treatment Recommendations by Molecular Tumor Boards Worldwide. *JCO Precis Oncol* 2018; **2**: 1–14.
- 218 Sundaram L, Gao H, Padigepati SR, McRae JF, Li Y, Kosmicki JA *et al.* Predicting the clinical impact of human mutation with deep neural networks. *Nat Genet* 2018; **50**: 1161–1170.
- 219 Xu C, Gu X, Padmanabhan R, Wu Z, Peng Q, DiCarlo J *et al.* Smcounter2: An accurate low-frequency variant caller for targeted sequencing data with unique molecular identifiers. *Bioinformatics* 2019; **35**: 1299–1309.
- 220 Mayakonda A, Lin DC, Assenov Y, Plass C, Koeffler HP. Maftools: Efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res* 2018; **28**: 1747–1756.
- 221 Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, Hein A-MK, Hamilton-Dutoit SJ, Vang S *et al.* Next-Generation Sequencing of RNA and DNA Isolated from Paired Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples of Human Cancer and Normal Tissue. *PLoS One* 2014; **9**: e98187.
- 222 Carrick DM, Mehaffey MG, Sachs MC, Altekruze S, Camalier C, Chuaqui R *et al.* Robustness of next generation sequencing on older formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *PLoS One* 2015; **10**: e0127353.
- 223 Arreaza G, Qiu P, Pang L, Albright A, Hong LZ, Marton MJ *et al.* Pre-analytical considerations for successful next-generation sequencing (NGS): Challenges and opportunities for formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue (FFPE) samples. *Int J Mol Sci* 2016; **17**: 1579.
- 224 Ascierto PA, Bifulco C, Palmieri G, Peters S, Sidiropoulos N. Preanalytic Variables and Tissue Stewardship for Reliable Next-Generation Sequencing (NGS) Clinical Analysis. *J. Mol. Diagnostics.* 2019; **21**: 756–767.
- 225 Mcdonough SJ, Bhagwate A, Sun Z, Wang C, Zschunke M, Gorman JA *et al.* Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. *PLoS One* 2019; **14**.

- doi:10.1371/journal.pone.0211400.
- 226 Robbe P, Popitsch N, Knight SJ, Antoniou P, Becq J, He M *et al.* Clinical whole-genome sequencing from routine formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: pilot study for the 100,000 Genomes Project. doi:10.1038/gim.2017.241.
- 227 Kato M, Nakamura H, Nagai M, Kubo T, Elzawahry A, Totoki Y *et al.* A computational tool to detect DNA alterations tailored to formalin-fixed paraffin-embedded samples in cancer clinical sequencing. *Genome Med* 2018; **10**. doi:10.1186/s13073-018-0547-0.
- 228 Spencer DH, Sehn JK, Abel HJ, Watson MA, Pfeifer JD, Duncavage EJ. Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens. *J Mol Diagnostics* 2013; **15**: 623–633.
- 229 Einaga N, Yoshida A, Noda H, Suemitsu M, Nakayama Y, Sakurada A *et al.* Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. *PLoS One* 2017; **12**: e0176280.
- 230 Mathieson W, Thomas GA. Why Formalin-fixed, Paraffin-embedded Biospecimens Must Be Used in Genomic Medicine: An Evidence-based Review and Conclusion. *J Histochem Cytochem* 2020; **68**: 543–552.
- 231 Teo SM, Pawitan Y, Ku CS, Chia KS, Salim A. Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. *Bioinformatics* 2012; **28**: 2711–2718.
- 232 Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J *et al.* Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagnostics* 2017; **19**: 341–365.
- 233 Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D *et al.* NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol* 2020; **33**: 38–46.
- 234 Halldórsdóttir AM, Frühwirth M, Deutsch A, Aigelsreiter A, Beham-Schmid C, Agnarsson BA *et al.* Quantifying the role of aberrant somatic

- hypermethylation in transformation of follicular lymphoma. *Leuk Res* 2008; **32**: 1015–1021.
- 235 Blachly JS, Baiocchi RA. Targeting PI3-kinase (PI3K), AKT and mTOR axis in lymphoma. *Br J Haematol* 2014; **167**: 19–32.
- 236 Pyrzynska B, Dwojak M, Zerrouqi A, Morlino G, Zapala P, Miazek N *et al*. FOXO1 promotes resistance of non-Hodgkin lymphomas to anti-CD20-based therapy. *Oncoimmunology* 2018; **7**: e1423183.
- 237 Kapoor I, Li Y, Sharma A, Zhu H, Bodo J, Xu W *et al*. Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies. *Cell Death Dis* 2019; **10**: 1–12.
- 238 Kelly KR, Friedberg JW, Park SI, McDonagh K, Hayslip J, Persky D *et al*. Phase I Study of the Investigational Aurora A Kinase Inhibitor Alisertib plus Rituximab or Rituximab/Vincristine in Relapsed/Refractory Aggressive B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2018; **24**: 6150–6159.
- 239 Bararia D, Heide M, Welner RS, Romashova T, Pastore A, Mathur R *et al*. Disruptive ARID1A Mutations in Follicular Lymphoma Impair DNA Repair Efficiency and Are Associated with Favorable Outcome in Patients Receiving First-Line Immunochemotherapy. *Blood* 2015; **126**: 571.
- 240 Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP, Mungall AJ, Mungall KL, Bolger-Munro M *et al*. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget* 2012; **3**: 1308–1319.
- 241 Burkhard R, Bhagat G, Cogliatti SB, Rossi D, Gaidano G, Pasqualucci L *et al*. *BCL2* mutation spectrum in B-cell non-Hodgkin lymphomas and patterns associated with evolution of follicular lymphoma. *Hematol Oncol* 2015; **33**: 23–30.
- 242 Smith SD, Munoz J, Stevens D, Smith SM, Feldman TA, Ye JC *et al*. Rapid and Durable Responses with the SYK/JAK Inhibitor Cerdulatinib in a Phase 2 Study in Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma-Alone or in Combination with Rituximab. *Blood* 2019; **134**: 3981–3981.
- 243 Search of: Non-hodgkin Lymphoma, B Cell - List Results - ClinicalTrials.gov.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=Non-hodgkin+Lymphoma%2CB+Cell&term=&cntry=&state=&city=&dist=>

- (accessed 14 Mar2021).
- 244 Burack R, Li H, Spence JM, Adlowitz D, Rimsza LM, Braziel RM *et al.* Subclonal Mutations of TP53 Are Common in Untreated Follicular Lymphoma and Mutation Status Is Predictive of PFS When CHOP Is Combined with 131-Iodine Tositumomab but Not with Rituximab: An Analysis of SWOG S0016. *Blood* 2018; **132**: 919.
- 245 Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M *et al.* Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1 and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; **127**: 2122–2130.
- 246 Short NJ, Montalban-Bravo G, Hwang H, Ning J, Franquiz MJ, Kanagal-Shamanna R *et al.* Prognostic and therapeutic impacts of mutant TP53 variant allelic frequency in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 2020; **4**: 5681–5689.
- 247 Dobaño-lópez C, Araujo-ayala F, Serrat N, Valero JG, Pérez-galán P. Follicular lymphoma microenvironment: An intricate network ready for therapeutic intervention. *Cancers (Basel)*. 2021; **13**: 1–22.
- 248 Bennani NN, LaPlant BR, Ansell SM, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef IN *et al.* Efficacy of the oral mTORC1 inhibitor everolimus in relapsed or refractory indolent lymphoma. *Am J Hematol* 2017; **92**: 448–453.
- 249 Brown JR, Hamadani M, Hayslip J, Janssens A, Wagner-Johnston N, Ottmann O *et al.* Voxtalisib (XL765) in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma or chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Haematol* 2018; **5**: e170–e180.
- 250 Deng L, Song Y, Young KH, Hu S, Ding N, Song W *et al.* Hepatitis B virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: Unique clinical features, poor outcome, and hepatitis B surface antigen-driven origin. *Oncotarget* 2015; **6**: 25061–25075.
- 251 Ren W, Ye X, Su H, Li W, Liu D, Pirmoradian M *et al.* Genetic landscape of hepatitis B virus-associated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2018; **131**: 2670–2681.
- 252 Kang X, Bai L, Han C, Qi X. Clinical analysis and prognostic significance of hepatitis B virus infections with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*

*Manag Res* 2020; **12**: 2839–2851.

- 253 Dandri M. Epigenetic modulation in chronic hepatitis B virus infection. *Semin Immunopathol* 2020; **42**: 173–185.

## **ANEXOS**



## ► Listado de mutaciones detectadas

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>ARID1A</i>	chr1:27023405	c.511C>T	p.(Gln171Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023405	c.511C>T	p.(Gln171Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023447	c.553C>T	p.(Gln185Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023525	c.631C>T	p.(Gln211Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023525	c.631C>T	p.(Gln211Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023525	c.631C>T	p.(Gln211Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023525	c.631C>T	p.(Gln211Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023525	c.631C>T	p.(Gln211Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27023545	c.653del	p.(Asn218ThrfsTer14)	frameshift_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27023549	c.655C>T	p.(Arg219Cys)	missense_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27057661	c.1369C>T	p.(Gln457Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27057661	c.1369C>T	p.(Gln457Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27057976	c.1684C>T	p.(Gln562Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27087889	c.2178_2193del	p.(Arg727SerfsTer10)	frameshift_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27088638	c.2252-5A>G		splice_region_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27088648	c.2257A>G	p.(Met753Val)	missense_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27099947	c.3826C>T	p.(Arg1276Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27099947	c.3826C>T	p.(Arg1276Ter)	stop_gained
<i>ARID1A</i>	chr1:27101626	c.4909del	p.(Arg1637GlyfsTer17)	frameshift_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27101631	c.4913A>G	p.(Asp1638Gly)	missense_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27106649	c.6260G>A	p.(Gly2087Glu)	missense_variant
<i>ARID1A</i>	chr1:27106982	c.6595del	p.(Leu2199Ter)	frameshift_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157099414	c.351_354delinsACA	p.(Gln118HisfsTer62)	frameshift_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157099511	c.448C>T	p.(Pro150Ser)	missense_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157099761	c.698A>T	p.(Tyr233Phe)	missense_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157100388	c.1328_1329del	p.(Pro443GlnfsTer91)	frameshift_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157100465	c.1402C>T	p.(Gln468Ter)	stop_gained
<i>ARID1B</i>	chr6:157100606	c.1542+1G>T		splice_donor_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157222615	c.1882C>T	p.(Gln628Ter)	stop_gained
<i>ARID1B</i>	chr6:157469925	c.2720_2723dup	p.(Phe909ThrfsTer34)	frameshift_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157521945	c.4217A>G	p.(Gln1406Arg)	missense_variant
<i>ARID1B</i>	chr6:157528557	c.6284dup	p.(Asn2095LysfsTer12)	frameshift_variant
<i>ATM</i>	chr11:108115566	c.716del	p.(Phe239SerfsTer16)	frameshift_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153657081	c.43C>T	p.(Arg15Ter)	stop_gained
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153657081	c.43C>T	p.(Arg15Ter)	stop_gained
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153657081	c.43C>T	p.(Arg15Ter)	stop_gained
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153657081	c.43C>T	p.(Arg15Ter)	stop_gained
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153661982	c.600T>A	p.(Asp200Glu)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153661982	c.600T>A	p.(Asp200Glu)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153662783	c.914C>T	p.(Ser305Phe)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153663715	c.1067T>C	p.(Phe356Ser)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153664076	c.1252T>G	p.(Cys418Gly)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153664076	c.1252T>G	p.(Cys418Gly)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153664076	c.1252T>G	p.(Cys418Gly)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153664107	c.1283T>G	p.(Met428Arg)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153664108	c.1284G>A	p.(Met428Ile)	missense_variant
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153664108	c.1284G>A	p.(Met428Ile)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>ATP6AP1</i>	chrX:153664108	c.1284G>A	p.(Met428Ile)	missense_variant
<i>ATP6AP2</i>	chrX:40458890	c.635A>C	p.(Tyr212Ser)	missense_variant
<i>ATP6AP2</i>	chrX:40464849	c.895T>G	p.(Tyr299Asp)	missense_variant
<i>ATP6AP2</i>	chrX:40464941	c.987G>A	p.(Trp329Ter)	stop_gained
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20068098	c.404C>T	p.(Ser135Leu)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20073957	c.1112A>G	p.(Tyr371Cys)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20073957	c.1112A>G	p.(Tyr371Cys)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20074768	c.1199G>A	p.(Arg400Gln)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20074768	c.1199G>A	p.(Arg400Gln)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20074768	c.1199G>A	p.(Arg400Gln)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20074768	c.1199G>A	p.(Arg400Gln)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20074768	c.1199G>A	p.(Arg400Gln)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20074768	c.1199G>C	p.(Arg400Pro)	missense_variant
<i>ATP6V1B2</i>	chr8:20074768	c.1199G>A	p.(Arg400Gln)	missense_variant
<i>B2M</i>	chr15:45003764	c.20T>C	p.(Leu7Ser)	missense_variant
<i>B2M</i>	chr15:45003764	c.20T>G	p.(Leu7Ter)	stop_gained
<i>B2M</i>	chr15:45003779	c.35T>C	p.(Leu12Pro)	missense_variant
<i>B2M</i>	chr15:45003785	c.45_48del	p.(Ser16AlafsTer27)	frameshift_variant
<i>B2M</i>	chr15:45007672	c.119C>A	p.(Ser40Ter)	stop_gained
<i>BCL2</i>	chr18:60985307	c.585+8C>T		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985307	c.585+8C>T		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985308	c.585+7G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985311	c.585+4G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985311	c.585+4G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985311	c.585+4G>A		splice_region_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985361	c.539A>T	p.(Tyr180Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985361	c.539A>T	p.(Tyr180Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985361	c.539A>T	p.(Tyr180Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985406	c.494A>G	p.(Glu165Gly)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985406	c.493_494delinsAG	p.(Glu165Arg)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985407	c.493G>A	p.(Glu165Lys)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985418	c.482G>A	p.(Ser161Asn)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985436	c.464G>C	p.(Gly155Ala)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985458	c.442G>C	p.(Val148Leu)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985472	c.428A>G	p.(Asn143Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985472	c.428A>G	p.(Asn143Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985472	c.428A>G	p.(Asn143Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985508	c.392C>T	p.(Ala131Val)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985508	c.392C>G	p.(Ala131Gly)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985508	c.392C>T	p.(Ala131Val)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985508	c.392C>T	p.(Ala131Val)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985508	c.392C>T	p.(Ala131Val)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>BCL2</i>	chr18:60985514	c.386G>A	p.(Arg129His)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985514	c.386G>A	p.(Arg129His)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985542	c.358C>G	p.(His120Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985549	c.351C>A	p.(Ser117Arg)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985562	c.338C>G	p.(Ala113Gly)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985563	c.337G>C	p.(Ala113Pro)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985566	c.334T>C	p.(Phe112Leu)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985578	c.322T>C	p.(Tyr108His)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985632	c.268C>T	p.(Pro90Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985644	c.256C>T	p.(Leu86Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985644	c.256C>T	p.(Leu86Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985644	c.256C>T	p.(Leu86Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985644	c.256C>T	p.(Leu86Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985644	c.256C>T	p.(Leu86Phe)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985719	c.181G>T	p.(Ala61Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985719	c.181G>A	p.(Ala61Thr)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985719	c.181G>A	p.(Ala61Thr)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985719	c.181G>A	p.(Ala61Thr)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985721	c.179C>T	p.(Ala60Val)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985721	c.179C>A	p.(Ala60Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985721	c.179C>T	p.(Ala60Val)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985721	c.179C>T	p.(Ala60Val)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985724	c.176C>T	p.(Pro59Leu)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985724	c.176C>T	p.(Pro59Leu)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985725	c.175C>G	p.(Pro59Ala)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985743	c.157C>T	p.(Pro53Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985743	c.157C>T	p.(Pro53Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985743	c.157C>T	p.(Pro53Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985743	c.157C>T	p.(Pro53Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985743	c.157C>T	p.(Pro53Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985753	c.147C>G	p.(Phe49Leu)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985760	c.140G>A	p.(Gly47Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985760	c.140G>A	p.(Gly47Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985760	c.140G>A	p.(Gly47Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985760	c.140G>A	p.(Gly47Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985760	c.140G>A	p.(Gly47Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985761	c.139G>A	p.(Gly47Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985764	c.136C>G	p.(Pro46Ala)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985803	c.97G>A	p.(Gly33Arg)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985803	c.97G>A	p.(Gly33Arg)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985809	c.91G>A	p.(Asp31Asn)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985809	c.91G>A	p.(Asp31Asn)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985813	c.87G>C	p.(Glu29Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985813	c.87G>C	p.(Glu29Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985813	c.87G>C	p.(Glu29Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985840	c.60T>A	p.(His20Gln)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985861	c.39G>C	p.(Glu13Asp)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985866	c.34C>T	p.(Arg12Trp)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>BCL2</i>	chr18:60985876	c.23_24delinsTA	p.(Gly8Val)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985877	c.23G>A	p.(Gly8Glu)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985877	c.23G>C	p.(Gly8Ala)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985880	c.20C>T	p.(Thr7Ile)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985880	c.20C>T	p.(Thr7Ile)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985880	c.20C>T	p.(Thr7Ile)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985880	c.20C>T	p.(Thr7Ile)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985881	c.19A>G	p.(Thr7Ala)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985883	c.17G>A	p.(Arg6Lys)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985883	c.17G>C	p.(Arg6Thr)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985887	c.13G>C	p.(Gly5Arg)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985890	c.10G>A	p.(Ala4Thr)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985890	c.10G>T	p.(Ala4Ser)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985890	c.10G>A	p.(Ala4Thr)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985893	c.7C>T	p.(His3Tyr)	missense_variant
<i>BCL2</i>	chr18:60985896	c.4G>A	p.(Ala2Thr)	missense_variant
<i>BCL6</i>	chr3:187442786	c.1914_1919del	p.(Phe639_Arg640del)	inframe_deletion
<i>BCL6</i>	chr3:187443324	c.1800_1801dup	p.(Pro601ArgfsTer46)	frameshift_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460007	c.10A>G	p.(Arg4Gly)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460008	c.12_23del	p.(Arg4_Ala8delinsSer)	inframe_deletion
<i>BCL7A</i>	chr12:122460024	c.27G>C	p.(Glu9Asp)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460029	c.32G>T	p.(Arg11Met)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460029	c.32G>A	p.(Arg11Lys)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460029	c.32G>A	p.(Arg11Lys)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460029	c.32G>C	p.(Arg11Thr)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460030	c.33G>C	p.(Arg11Ser)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460030	c.33G>T	p.(Arg11Ser)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460037	c.40G>C	p.(Ala14Pro)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460040	c.43A>T	p.(Lys15Ter)	stop_gained
<i>BCL7A</i>	chr12:122460052	c.55A>T	p.(Lys19Ter)	stop_gained
<i>BCL7A</i>	chr12:122460078	c.83_86del	p.(Val28AlafsTer8)	frameshift_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460085	c.88A>G	p.(Lys30Glu)	missense_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460085	c.89_92+11del		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460088	c.92+1dup		splice_region_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460089	c.92_92+1delinsTA		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460090	c.92+1G>T		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460090	c.92+1G>A		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460090	c.92+1G>A		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460090	c.92+1G>A		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460090	c.92+1G>A		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460090	c.92+1G>T		splice_donor_variant
<i>BCL7A</i>	chr12:122460094	c.92+5G>A		splice_region_variant
<i>BTK</i>	chrX:100609668	c.1581T>G	p.(Cys527Trp)	missense_variant
<i>BTK</i>	chrX:100613340	c.1060A>C	p.(Thr354Pro)	missense_variant
<i>BTK</i>	chrX:100613340	c.1060A>C	p.(Thr354Pro)	missense_variant
<i>BTK</i>	chrX:100613408	c.987_991del	p.(Val330ThrfsTer17)	frameshift_variant
<i>BTK</i>	chrX:100613669	c.910T>C	p.(Phe304Leu)	missense_variant
<i>BTK</i>	chrX:100629548	c.215dup	p.(Asn72LysfsTer13)	frameshift_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>BTK</i>	chrX:100630214	c.58del	p.(Thr20HisfsTer4)	frameshift_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2977614	c.1070A>T	p.(Asp357Val)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2979495	c.752T>C	p.(Leu251Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2979499	c.748T>C	p.(Ser250Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2979499	c.748T>C	p.(Ser250Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2979499	c.748T>C	p.(Ser250Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2979499	c.748T>C	p.(Ser250Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2979501	c.746A>C	p.(Gln249Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2979513	c.734T>C	p.(Leu245Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2984153	c.377G>A	p.(Gly126Asp)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2984162	c.368G>A	p.(Gly123Asp)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2984163	c.367G>A	p.(Gly123Ser)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2985462	c.349A>C	p.(Thr117Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2985465	c.346T>C	p.(Ser116Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2985465	c.346T>C	p.(Ser116Pro)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2985519	c.292T>G	p.(Tyr98Asp)	missense_variant
<i>CARD11</i>	chr7:2985519	c.292T>G	p.(Tyr98Asp)	missense_variant
<i>CCND3</i>	chr6:41903709	c.848C>T	p.(Thr283Ile)	missense_variant
<i>CCND3</i>	chr6:41903844	c.713A>G	p.(Asp238Gly)	missense_variant
<i>CD79B</i>	chr17:62006836	c.553-1G>A		splice_acceptor_variant
<i>CD79B</i>	chr17:62007128	c.552+2T>A		splice_donor_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3777960	c.7088C>T	p.(Pro2363Leu)	missense_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3778567	c.6481A>G	p.(Met2161Val)	missense_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3778728	c.6307_6319del	p.(Gln2103SerfsTer36)	frameshift_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3781322	c.5040_5042del	p.(Leu1681del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781323	c.5039_5041del	p.(Ser1680del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781329	c.5033_5035del	p.(Phe1678del)	inframe_deletion
<i>CREBBP</i>	chr16:3781805	c.4862T>G	p.(Leu1621Arg)	missense_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3786035	c.4728+2T>C		splice_donor_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3786035	c.4728+2T>C		splice_donor_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3786137	c.4628A>T	p.(Asp1543Val)	missense_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3786146	c.4619T>C	p.(Phe1540Ser)	missense_variant
<i>CREBBP</i>	chr16:3786205	c.4561-1G>A		splice_acceptor_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
CREBBP	chr16:3786703	c.4508A>T	p.(Tyr1503Phe)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786703	c.4508A>T	p.(Tyr1503Phe)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786703	c.4508A>G	p.(Tyr1503Cys)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786703	c.4508A>T	p.(Tyr1503Phe)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>A	p.(Tyr1503Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>A	p.(Tyr1503Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>A	p.(Tyr1503Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>A	p.(Tyr1503Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>G	p.(Tyr1503Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>C	p.(Tyr1503His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>C	p.(Tyr1503His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>A	p.(Tyr1503Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>C	p.(Tyr1503His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>A	p.(Tyr1503Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>C	p.(Tyr1503His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>C	p.(Tyr1503His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>C	p.(Tyr1503His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786704	c.4507T>C	p.(Tyr1503His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786706	c.4505G>T	p.(Trp1502Leu)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786715	c.4496T>G	p.(Leu1499Arg)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786740	c.4471C>A	p.(Gln1491Lys)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786748	c.4463C>T	p.(Pro1488Leu)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786748	c.4463C>T	p.(Pro1488Leu)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786761	c.4450T>G	p.(Phe1484Val)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786764	c.4447A>T	p.(Ile1483Phe)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786767	c.4444T>A	p.(Tyr1482Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786767	c.4444T>A	p.(Tyr1482Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786767	c.4444T>A	p.(Tyr1482Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786787	c.4424C>T	p.(Pro1475Leu)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786787	c.4424C>T	p.(Pro1475Leu)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786797	c.4414T>A	p.(Trp1472Arg)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786797	c.4414T>A	p.(Trp1472Arg)	missense_variant
CREBBP	chr16:3786797	c.4395-6_4413del		splice_acceptor_variant
CREBBP	chr16:3786810	c.4397_4400del	p.(Tyr1466Ter)	frameshift_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>G	p.(Tyr1450Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>A	p.(Tyr1450Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>G	p.(Tyr1450Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>G	p.(Tyr1450Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>G	p.(Tyr1450Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>G	p.(Tyr1450Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>A	p.(Tyr1450Asn)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>G	p.(Tyr1450Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>G	p.(Tyr1450Asp)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788606	c.4348T>C	p.(Tyr1450His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788617	c.4337G>A	p.(Arg1446His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788617	c.4337G>A	p.(Arg1446His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788617	c.4337G>A	p.(Arg1446His)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788617	c.4337G>T	p.(Arg1446Leu)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788618	c.4336C>T	p.(Arg1446Cys)	missense_variant
CREBBP	chr16:3788618	c.4336C>T	p.(Arg1446Cys)	missense_variant



Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>CXCR4</i>	chr2:136872520	c.987_990del	p.(Ser329ArgfsTer4)	frameshift_variant
<i>CXCR4</i>	chr2:136872528	c.959_981del	p.(Ala320ValfsTer20)	frameshift_variant
<i>CXCR4</i>	chr2:136872537	c.971_972del	p.(Val324GlufsTer23)	frameshift_variant
<i>CXCR4</i>	chr2:136872842	c.668A>T	p.(Tyr223Phe)	missense_variant
<i>DTX1</i>	chr12:113496059	c.62A>C	p.(Asn21Thr)	missense_variant
<i>DTX1</i>	chr12:113496146	c.149A>G	p.(Asn50Ser)	missense_variant
<i>DTX1</i>	chr12:113496239	c.242A>T	p.(Gln81Leu)	missense_variant
<i>DTX1</i>	chr12:113515336	c.367A>T	p.(Met123Leu)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158204483	c.974T>C	p.(Val325Ala)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158500444	c.514A>G	p.(Asn172Asp)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158500474	c.486-2A>T		splice_acceptor_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158511678	c.481T>C	p.(Cys161Arg)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158523374	c.332G>A	p.(Arg111Gln)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158523981	c.291+1G>C		splice_donor_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158523997	c.275del	p.(Phe92SerfsTer29)	frameshift_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158524071	c.202T>C	p.(Phe68Leu)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158524075	c.198C>G	p.(Asn66Lys)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158524082	c.191A>T	p.(Lys64Ile)	missense_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158526348	c.134+5G>A		splice_region_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158526348	c.134+5G>A		splice_region_variant
<i>EBF1</i>	chr5:158526397	c.90G>A	p.(Trp30Ter)	stop_gained
<i>EEF1A1</i>	chr6:74227563	c.1359G>C	p.(Lys453Asn)	missense_variant
<i>EEF1A1</i>	chr6:74227625	c.1297G>A	p.(Val433Ile)	missense_variant
<i>EEF1A1</i>	chr6:74228229	c.877G>A	p.(Glu293Lys)	missense_variant
<i>EEF1A1</i>	chr6:74228503	c.660_689del	p.(Asp220_Leu229del)	inframe_deletion
<i>EEF1A1</i>	chr6:74228688	c.588G>A	p.(Trp196Ter)	stop_gained
<i>EEF1A1</i>	chr6:74229178	c.195_205del	p.(Glu66TrpfsTer5)	frameshift_variant
<i>EEF1A1</i>	chr6:74229179	c.205C>T	p.(Arg69Cys)	missense_variant
<i>EEF1A1</i>	chr6:74229602	c.144+4T>G		splice_region_variant
<i>EEF1A1</i>	chr6:74229634	c.116T>C	p.(Ile39Thr)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41523522	c.938C>T	p.(Pro313Leu)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41545790	c.2405C>T	p.(Pro802Leu)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41546158	c.2773C>A	p.(Pro925Thr)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41546158	c.2773C>A	p.(Pro925Thr)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41556727	c.3671+1G>A		splice_donor_variant
<i>EP300</i>	chr22:41564866	c.4167C>A	p.(Asn1389Lys)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41565529	c.4195G>A	p.(Asp1399Asn)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41565529	c.4195G>A	p.(Asp1399Asn)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41565570	c.4237_4242dup	p.(Val1413_Tyr1414dup)	inframe_insertion
<i>EP300</i>	chr22:41565575	c.4241A>G	p.(Tyr1414Cys)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41565575	c.4241A>G	p.(Tyr1414Cys)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41566459	c.4336T>A	p.(Tyr1446Asn)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41566459	c.4336T>A	p.(Tyr1446Asn)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41566522	c.4399T>C	p.(Tyr1467His)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41566522	c.4399T>C	p.(Tyr1467His)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41566522	c.4399T>A	p.(Tyr1467Asn)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41566522	c.4399T>C	p.(Tyr1467His)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41566523	c.4400A>G	p.(Tyr1467Cys)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41568577	c.4527G>A	p.(Trp1509Ter)	stop_gained



Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>EP300</i>	chr22:41568591	c.4541A>G	p.(Glu1514Gly)	missense_variant
<i>EP300</i>	chr22:41574340	c.6627_6638del	p.(Asn2209_Gln2213delinsLys)	inframe_deletion
<i>EP300</i>	chr22:41574340	c.6627_6638del	p.(Asn2209_Gln2213delinsLys)	inframe_deletion
<i>EP300</i>	chr22:41574510	c.6798_6800del	p.(Gln2268del)	inframe_deletion
<i>EP300</i>	chr22:41574510	c.6798_6800del	p.(Gln2268del)	inframe_deletion
<i>EZH2</i>	chr7:148504773	c.2221T>A	p.(Tyr741Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148506437	c.2075C>T	p.(Ala692Val)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148506467	c.2045C>G	p.(Ala682Gly)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508714	c.1947+3A>G		splice_region_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508714	c.1947+3A>G		splice_region_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508714	c.1947+3A>G		splice_region_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>T	p.(Tyr646Phe)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>T	p.(Tyr646Phe)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>C	p.(Tyr646Ser)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>G	p.(Tyr646Cys)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>C	p.(Tyr646Ser)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>G	p.(Tyr646Cys)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>T	p.(Tyr646Phe)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>C	p.(Tyr646Ser)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>C	p.(Tyr646Ser)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508727	c.1937A>C	p.(Tyr646Ser)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.(Tyr646Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>C	p.(Tyr646His)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.(Tyr646Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.(Tyr646Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>C	p.(Tyr646His)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>C	p.(Tyr646His)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.(Tyr646Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.(Tyr646Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.(Tyr646Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>A	p.(Tyr646Asn)	missense_variant
<i>EZH2</i>	chr7:148508728	c.1936T>C	p.(Tyr646His)	missense_variant
<i>FAS</i>	chr10:90768666	c.355_357delinsCTA	p.(Cys119Leu)	missense_variant
<i>FAS</i>	chr10:90771810	c.625del	p.(Ser209LeufsTer7)	frameshift_variant
<i>FAS</i>	chr10:90773947	c.748C>T	p.(Arg250Ter)	stop_gained
<i>FAS</i>	chr10:90773948	c.749G>A	p.(Arg250Gln)	missense_variant
<i>FAS</i>	chr10:90774001	c.802C>T	p.(Gln268Ter)	stop_gained
<i>FOXO1</i>	chr13:41239733	c.617C>T	p.(Ser206Leu)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240265	c.76_84del	p.(Pro26_Pro28del)	inframe_deletion
<i>FOXO1</i>	chr13:41240279	c.71C>T	p.(Thr24Ile)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240279	c.71C>T	p.(Thr24Ile)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240279	c.71C>T	p.(Thr24Ile)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240285	c.65C>G	p.(Ser22Trp)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240288	c.62G>A	p.(Arg21His)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240288	c.62G>A	p.(Arg21His)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240288	c.62G>A	p.(Arg21His)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240288	c.62G>C	p.(Arg21Pro)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>FOXO1</i>	chr13:41240289	c.61C>T	p.(Arg21Cys)	missense_variant
<i>FOXO1</i>	chr13:41240289	c.61C>T	p.(Arg21Cys)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63010633	c.876G>C	p.(Lys292Asn)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63010737	c.772G>A	p.(Glu258Lys)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63010781	c.728T>C	p.(Ile243Thr)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63010844	c.665A>T	p.(Asp222Val)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63010845	c.664G>A	p.(Asp222Asn)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63010948	c.562-1G>T		splice_acceptor_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63014381	c.551T>C	p.(Leu184Pro)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63049837	c.293T>A	p.(Val98Glu)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63049838	c.292G>A	p.(Val98Met)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63052431	c.281A>C	p.(Lys94Thr)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63052432	c.280A>G	p.(Lys94Glu)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63052525	c.187A>T	p.(Thr63Ser)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63052528	c.184T>C	p.(Ser62Pro)	missense_variant
<i>GNA13</i>	chr17:63052633	c.79C>T	p.(Gln27Ter)	stop_gained
<i>GNAI2</i>	chr3:50293695	c.536G>A	p.(Arg179His)	missense_variant
<i>GNAI2</i>	chr3:50293703	c.544A>G	p.(Thr182Ala)	missense_variant
<i>GNAI2</i>	chr3:50294169	c.608G>A	p.(Gly203Asp)	missense_variant
<i>GNAI2</i>	chr3:50294199	c.638T>A	p.(Ile213Asn)	missense_variant
<i>GNAI2</i>	chr3:50294396	c.751T>A	p.(Phe251Ile)	missense_variant
<i>GNAI2</i>	chr3:50294432	c.788del	p.(Thr263SerfsTer22)	frameshift_variant
<i>GNAI2</i>	chr3:50294455	c.814_816del	p.(Lys272del)	inframe_deletion
<i>GNAI2</i>	chr3:50295080	c.1027_1029del	p.(Val343del)	inframe_deletion
<i>HIST1H1B</i>	chr6:27834997	c.311C>G	p.(Ala104Gly)	missense_variant
<i>HIST1H1B</i>	chr6:27835000	c.308G>A	p.(Gly103Asp)	missense_variant
<i>HIST1H1B</i>	chr6:27835006	c.302G>A	p.(Gly101Asp)	missense_variant
<i>HIST1H1B</i>	chr6:27835074	c.234G>C	p.(Lys78Asn)	missense_variant
<i>HIST1H1B</i>	chr6:27835074	c.234G>C	p.(Lys78Asn)	missense_variant
<i>HIST1H1B</i>	chr6:27835074	c.234G>C	p.(Lys78Asn)	missense_variant
<i>HIST1H1B</i>	chr6:27835074	c.234G>C	p.(Lys78Asn)	missense_variant
<i>HIST1H1C</i>	chr6:26056356	c.301G>A	p.(Ala101Thr)	missense_variant
<i>HIST1H1D</i>	chr6:26234629	c.533T>A	p.(Val178Glu)	missense_variant
<i>HIST1H1D</i>	chr6:26234759	c.403G>C	p.(Ala135Pro)	missense_variant
<i>HIST1H1D</i>	chr6:26234857	c.305C>T	p.(Ala102Val)	missense_variant
<i>HIST1H1D</i>	chr6:26234876	c.286C>T	p.(Gln96Ter)	stop_gained
<i>HIST1H1D</i>	chr6:26234928	c.234C>G	p.(Asn78Lys)	missense_variant
<i>HIST1H1D</i>	chr6:26234938	c.224A>C	p.(Glu75Ala)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156744	c.126G>C	p.(Glu42Asp)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156744	c.126G>C	p.(Glu42Asp)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156744	c.126G>C	p.(Glu42Asp)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156866	c.248G>A	p.(Gly83Asp)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156872	c.254A>C	p.(Lys85Thr)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156926	c.308G>C	p.(Gly103Ala)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156929	c.311C>T	p.(Ser104Phe)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156929	c.311C>T	p.(Ser104Phe)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156929	c.311C>T	p.(Ser104Phe)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156929	c.311C>T	p.(Ser104Phe)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156937	c.319C>G	p.(Leu107Val)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156976	c.358G>A	p.(Ala120Thr)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26156985	c.367G>A	p.(Ala123Thr)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26157031	c.413C>G	p.(Pro138Arg)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26157057	c.439C>T	p.(Pro147Ser)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26157109	c.491C>T	p.(Ala164Val)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26157159	c.541C>T	p.(Pro181Ser)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26157198	c.580G>A	p.(Val194Ile)	missense_variant
<i>HIST1H1E</i>	chr6:26157204	c.586C>T	p.(Pro196Ser)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230253	c.20_21delinsCG	p.(Gln7Pro)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230254	c.21A>T	p.(Gln7His)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230254	c.21A>T	p.(Gln7His)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230254	c.21A>T	p.(Gln7His)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230254	c.21A>T	p.(Gln7His)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230258	c.25G>C	p.(Gly9Arg)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230267	c.34A>C	p.(Thr12Pro)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230267	c.34A>C	p.(Thr12Pro)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230267	c.34A>C	p.(Thr12Pro)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230267	c.34A>C	p.(Thr12Pro)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230278	c.45G>C	p.(Glu15Asp)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230315	c.82C>A	p.(Leu28Met)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230315	c.82C>A	p.(Leu28Met)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230319	c.86T>G	p.(Leu29Arg)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230327	c.94G>T	p.(Ala32Ser)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230347	c.116_117insACT	p.(Leu39dup)	inframe_insertion
<i>IGLL5</i>	chr22:23230347	c.116_117insACT	p.(Leu39dup)	inframe_insertion
<i>IGLL5</i>	chr22:23230373	c.142_149del	p.(Gly48ArgfsTer41)	frameshift_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230388	c.155C>G	p.(Pro52Arg)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230394	c.161C>T	p.(Ala54Val)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230394	c.161C>T	p.(Ala54Val)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230394	c.161C>T	p.(Ala54Val)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230397	c.164C>G	p.(Ser55Ter)	stop_gained
<i>IGLL5</i>	chr22:23230415	c.182C>G	p.(Ser61Cys)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230415	c.182C>G	p.(Ser61Cys)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230432	c.202_203dup	p.(Arg69AlafsTer41)	frameshift_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230434	c.201G>A	p.(Trp67Ter)	stop_gained
<i>IGLL5</i>	chr22:23230439	c.206G>A	p.(Arg69Lys)	missense_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230440	c.206+1G>A		splice_donor_variant
<i>IGLL5</i>	chr22:23230440	c.206+1G>C		splice_donor_variant
<i>IRF4</i>	chr6:393206	c.49_54delinsATGAGA	p.(Val17_Ser18delinsMetArg)	missense_variant
<i>IRF4</i>	chr6:393324	c.172_173delinsAA	p.(Gly58Asn)	missense_variant
<i>IRF4</i>	chr6:393341	c.189C>A	p.(Asn63Lys)	missense_variant
<i>IRF4</i>	chr6:394899	c.295T>C	p.(Cys99Arg)	missense_variant
<i>IRF8</i>	chr16:85942671	c.250T>C	p.(Cys84Arg)	missense_variant
<i>IRF8</i>	chr16:85942674	c.253G>A	p.(Ala85Thr)	missense_variant
<i>IRF8</i>	chr16:85954865	c.1262del	p.(Asn421ThrfsTer32)	frameshift_variant
<i>IRF8</i>	chr16:85954882	c.1275_1276insTG	p.(Val426TrpfsTer28)	frameshift_variant
<i>IRF8</i>	chr16:85954883	c.1276G>A	p.(Val426Ile)	missense_variant
<i>IRF8</i>	chr16:85954887	c.1280A>C	p.(Ter427SerextTer24)	stop_lost
<i>KLHL6</i>	chr3:183210327	c.1519A>G	p.(Lys507Glu)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>KLHL6</i>	chr3:183210419	c.1427G>A	p.(Gly476Glu)	missense_variant
<i>KLHL6</i>	chr3:183211915	c.1302A>T	p.(Arg434Ser)	missense_variant
<i>KLHL6</i>	chr3:183273161	c.280_281delinsTA	p.(Ser94Tyr)	missense_variant
<i>KLHL6</i>	chr3:183273174	c.268C>G	p.(Leu90Val)	missense_variant
<i>KLHL6</i>	chr3:183273228	c.210_213dup	p.(Thr72SerfsTer40)	frameshift_variant
<i>KLHL6</i>	chr3:183273248	c.194T>C	p.(Leu65Pro)	missense_variant
<i>KLHL6</i>	chr3:183273257	c.185T>C	p.(Leu62Pro)	missense_variant
<i>KMT2C</i>	chr7:151879276	c.5669G>A	p.(Arg1890Gln)	missense_variant
<i>KMT2C</i>	chr7:151879448	c.5497C>T	p.(Gln1833Ter)	stop_gained
<i>KMT2C</i>	chr7:151882659	c.5065del	p.(Glu1689LysfsTer28)	frameshift_variant
<i>KMT2C</i>	chr7:151882659	c.5065del	p.(Glu1689LysfsTer28)	frameshift_variant
<i>KMT2C</i>	chr7:151970884	c.918T>G	p.(Tyr306Ter)	stop_gained
<i>KMT2C</i>	chr7:151970884	c.918T>G	p.(Tyr306Ter)	stop_gained
<i>KMT2C</i>	chr7:152027693	c.382A>T	p.(Lys128Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49415846	c.16501C>T	p.(Arg5501Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49416088	c.16383_16386del	p.(Ile5461MetfsTer4)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49416111	c.16363del	p.(Ile5455Ter)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49416416	c.16295G>A	p.(Arg5432Gln)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49416443	c.16268T>G	p.(Val5423Gly)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49416500	c.16211C>T	p.(Ser5404Phe)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49418394	c.16019G>C	p.(Arg5340Pro)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49418394	c.16019G>C	p.(Arg5340Pro)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49419963	c.15784+2T>G		splice_donor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49420073	c.15671_15675dup	p.(Cys5226ValfsTer19)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49420098	c.15651G>A	p.(Trp5217Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49420622	c.15127A>T	p.(Thr5043Ser)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49420670	c.15079C>T	p.(Arg5027Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49421628	c.14601T>A	p.(Tyr4867Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49421822	c.14485G>T	p.(Glu4829Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49422612	c.14381A>G	p.(Lys4794Arg)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49422842	c.14251+2T>A		splice_donor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49422877	c.14217del	p.(Val4740SerfsTer57)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49423253	c.14006C>G	p.(Ser4669Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49424062	c.13999+1G>A		splice_donor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424172	c.13889del	p.(Pro4630HisfsTer10)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424442	c.13780dup	p.(Ala4594GlyfsTer12)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424494	c.13727_13728del	p.(Phe4576CysfsTer29)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424494	c.13727_13728del	p.(Phe4576CysfsTer29)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424494	c.13727_13728del	p.(Phe4576CysfsTer29)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424494	c.13727_13728del	p.(Phe4576CysfsTer29)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424681	c.13666A>T	p.(Lys4556Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49424709	c.13636_13637del	p.(Arg4546GlyfsTer28)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49424990	c.13498C>T	p.(Gln4500Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49425239	c.13249C>T	p.(Gln4417Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49425446	c.13040_13041del	p.(Gln4347ArgfsTer24)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49425473	c.13011_13014del	p.(Thr4339IlefsTer44)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49425473	c.13011_13014del	p.(Thr4339IlefsTer44)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49425498	c.12983_12989del	p.(Ser4328PhefsTer54)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49425509	c.12978dup	p.(Ser4327GlnfsTer7)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49425787	c.12701G>C	p.(Ser4234Thr)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>KMT2D</i>	chr12:49426832	c.11656C>T	p.(Gln3886Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49426955	c.11533C>T	p.(Gln3845Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49427243	c.11245G>T	p.(Gly3749Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49427243	c.11245G>T	p.(Gly3749Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49427453	c.11035C>T	p.(Gln3679Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49427564	c.10924C>T	p.(Gln3642Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49427654	c.10834C>T	p.(Gln3612Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49427919	c.10670del	p.(Pro3557GlnfsTer101)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49428364	c.10440+1G>A		splice_donor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49428364	c.10440+1G>A		splice_donor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49428445	c.10360C>T	p.(Gln3454Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49428450	c.10356-1G>A		splice_acceptor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49431178	c.9961C>T	p.(Arg3321Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49431178	c.9961C>T	p.(Arg3321Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49431178	c.9961C>T	p.(Arg3321Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49431401	c.9733_9737del	p.(Leu3245ProfsTer4)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49431628	c.9510del	p.(Pro3172HisfsTer25)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49431763	c.9376G>T	p.(Gly3126Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49431885	c.9253del	p.(Leu3085CysfsTer34)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432000	c.9139T>A	p.(Phe3047Ile)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432281	c.8853_8857del	p.(His2951GlnfsTer20)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432281	c.8853_8857del	p.(His2951GlnfsTer20)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432341	c.8796_8797del	p.(Lys2933ThrfsTer8)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432341	c.8796_8797del	p.(Lys2933ThrfsTer8)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432341	c.8796_8797del	p.(Lys2933ThrfsTer8)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432341	c.8796_8797del	p.(Lys2933ThrfsTer8)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432358	c.8776_8780del	p.(Val2926ArgfsTer14)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432396	c.8743C>T	p.(Arg2915Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49432408	c.8727_8730del	p.(Ser2910ArgfsTer32)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49432742	c.8397T>A	p.(Tyr2799Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49432774	c.8367-2A>C		splice_acceptor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433311	c.8132_8135del	p.(Ala2711GlnfsTer21)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433343	c.8104C>T	p.(Gln2702Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49433370	c.8076del	p.(Gln2693SerfsTer40)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433524	c.8027_8028del	p.(Glu2676AlafsTer47)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433524	c.8027_8028del	p.(Glu2676AlafsTer47)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433650	c.7903C>T	p.(Arg2635Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49433745	c.7807dup	p.(Glu2603GlyfsTer52)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433782	c.7769_7770dup	p.(Gly2591ArgfsTer101)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433786	c.7766del	p.(Pro2589HisfsTer102)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49433786	c.7766del	p.(Pro2589HisfsTer102)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49434075	c.7478G>A	p.(Gly2493Glu)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49434136	c.7417C>T	p.(Gln2473Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49434307	c.7246C>T	p.(Gln2416Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49434353	c.7199dup	p.(Arg2401SerfsTer33)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49434567	c.6985_6986insA	p.(Ala2329AspfsTer48)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49434818	c.6734del	p.(Leu2245ProfsTer19)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49434957	c.6595del	p.(Tyr2199IlefsTer65)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49434957	c.6595del	p.(Tyr2199IlefsTer65)	frameshift_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>KMT2D</i>	chr12:49435056	c.6496del	p.(Gln2166ArgfsTer98)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49436593	c.5713C>T	p.(Gln1905Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49436662	c.5645-1G>T		splice_acceptor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49436872	c.5627_5630del	p.(Asp1876GlyfsTer38)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49437701	c.5269C>T	p.(Arg1757Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49438018	c.5153C>T	p.(Ala1718Val)	missense_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49438072	c.5098del	p.(Met1700TrpfsTer22)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49438273	c.4995del	p.(Lys1665AsnfsTer57)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49438708	c.4780_4781del	p.(Glu1594AsnfsTer8)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49440076	c.4549del	p.(Glu1517ArgfsTer4)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49441815	c.4168dup	p.(Ala1390GlyfsTer42)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49441847	c.4135_4136del	p.(Met1379ValfsTer52)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49441847	c.4135_4136del	p.(Met1379ValfsTer52)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49442553	c.4021-1G>A		splice_acceptor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49443490	c.3880delT	p.(Ser1294ProfsTer36)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49443561	c.3808_3809del	p.(Ser1270ThrfsTer15)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49443762	c.3608del	p.(Asp1203AlafsTer9)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49443896	c.3475G>T	p.(Glu1159Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49444022	c.3344_3348del	p.(Phe1115TrpfsTer13)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49444041	c.3325_3329dup	p.(Ala1111ProfsTer10)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49444193	c.3168_3177del	p.(Ser1056ArgfsTer3)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49444552	c.2819C>A	p.(Ser940Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49444701	c.2764del	p.(Glu922SerfsTer8)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49444646	c.1137_1139delinsCGG	p.(Thr380GlyfsTer4)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49446697	c.1112+1G>A		splice_donor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49446697	c.1112+1G>A		splice_donor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49446816	c.993del	p.(Glu332AsnfsTer2)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447077	c.866del	p.(Leu289TrpfsTer15)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447106	c.840-2A>G		splice_acceptor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447308	c.785_789del	p.(Ala262GlyfsTer9)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447361	c.736dup	p.(Ser246LysfsTer27)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447381	c.717T>A	p.(Cys239Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49447381	c.717T>A	p.(Cys239Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49447385	c.713T>A	p.(Leu238Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49447875	c.558dup	p.(Pro187ThrfsTer33)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447875	c.558dup	p.(Pro187ThrfsTer33)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447875	c.558dup	p.(Pro187ThrfsTer33)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49447875	c.558dup	p.(Pro187ThrfsTer33)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49448103	c.497C>A	p.(Ser166Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49448103	c.497C>A	p.(Ser166Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49448362	c.349C>T	p.(Gln117Ter)	stop_gained
<i>KMT2D</i>	chr12:49448364	c.346del	p.(Ser116HisfsTer14)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49448447	c.263del	p.(Pro88HisfsTer42)	frameshift_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49448535	c.177-1G>A		splice_acceptor_variant
<i>KMT2D</i>	chr12:49448750	c.108del	p.(His37MetfsTer93)	frameshift_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19256608	c.1105T>C	p.(Ter369GlnextTer68)	stop_lost
<i>MEF2B</i>	chr19:19258565	c.335A>G	p.(Lys112Arg)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19258629	c.271A>G	p.(Arg91Gly)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19258629	c.271A>G	p.(Arg91Gly)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>MEF2B</i>	chr19:19260045	c.248A>T	p.(Asp83Val)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260045	c.248A>G	p.(Asp83Gly)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260045	c.248A>T	p.(Asp83Val)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260045	c.248A>T	p.(Asp83Val)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260045	c.248A>C	p.(Asp83Ala)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260045	c.248A>C	p.(Asp83Ala)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260084	c.209C>G	p.(Thr70Arg)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260084	c.209C>G	p.(Thr70Arg)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260088	c.205T>C	p.(Tyr69His)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260088	c.205T>C	p.(Tyr69His)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260124	c.169T>G	p.(Tyr57Asp)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260193	c.98_99del	p.(Tyr33Ter)	frameshift_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260214	c.79G>A	p.(Gly27Arg)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260214	c.79G>A	p.(Gly27Arg)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19260224	c.69G>T	p.(Lys23Asn)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19261528	c.17T>A	p.(Ile6Asn)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19261535	c.10A>G	p.(Lys4Glu)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19261535	c.10A>G	p.(Lys4Glu)	missense_variant
<i>MEF2B</i>	chr19:19261538	c.7A>G	p.(Arg3Gly)	missense_variant
<i>MYC</i>	chr8:128750692	c.229T>G	p.(Ser77Ala)	missense_variant
<i>NOTCH1</i>	chr9:139390767	c.7424C>T	p.(Pro2475Leu)	missense_variant
<i>NOTCH1</i>	chr9:139399434	c.4709C>T	p.(Ala1570Val)	missense_variant
<i>NOTCH1</i>	chr9:139413934	c.826G>A	p.(Val276Met)	missense_variant
<i>NOTCH2</i>	chr1:120496288	c.2243G>A	p.(Gly748Asp)	missense_variant
<i>PAX5</i>	chr9:36966544	c.780+2T>A		splice_donor_variant
<i>PAX5</i>	chr9:37002663	c.586A>T	p.(Lys196Ter)	stop_gained
<i>PAX5</i>	chr9:37002702	c.547G>C	p.(Gly183Arg)	missense_variant
<i>PAX5</i>	chr9:37002713	c.536A>T	p.(Tyr179Phe)	missense_variant
<i>PIK3CA</i>	chr3:178916726	c.113G>A	p.(Arg38His)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138308	c.230G>C	p.(Ser77Thr)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138412	c.334C>G	p.(His112Asp)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138414	c.336C>A	p.(His112Gln)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138424	c.346C>G	p.(Leu116Val)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138424	c.346C>G	p.(Leu116Val)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138424	c.346C>G	p.(Leu116Val)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138424	c.346C>G	p.(Leu116Val)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138791	c.497C>T	p.(Ser166Phe)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138805	c.511C>T	c.(511C>T(p.=))	splice_region_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138805	c.511C>T	c.(511C>T(p.=))	splice_region_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37138937	c.550C>G	p.(Leu184Val)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37139063	c.676G>A	p.(Glu226Lys)	missense_variant
<i>PIM1</i>	chr6:37139210	c.823C>T	p.(Leu275Phe)	missense_variant
<i>PLCG2</i>	chr16:81944262	c.1871G>A	p.(Cys624Tyr)	missense_variant
<i>PLCG2</i>	chr16:81944262	c.1871G>A	p.(Cys624Tyr)	missense_variant
<i>PLCG2</i>	chr16:81953208	c.2174T>A	p.(Leu725His)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39321486	c.535A>G	p.(Lys179Glu)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322645	c.347A>T	p.(Asp116Val)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322649	c.343T>C	p.(Trp115Arg)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322684	c.308A>G	p.(Asp103Gly)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322691	c.298_300dup	p.(Tyr100dup)	inframe_insertion


Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>RRAGC</i>	chr1:39322696	c.296T>A	p.(Ile99Asn)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322697	c.295A>T	p.(Ile99Phe)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322697	c.295A>T	p.(Ile99Phe)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322702	c.290A>G	p.(Asn97Ser)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322723	c.269C>A	p.(Thr90Asn)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322732	c.260C>T	p.(Pro87Leu)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322732	c.260C>T	p.(Pro87Leu)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322737	c.255G>A	p.(Met85Ile)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39322737	c.255G>A	p.(Met85Ile)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39325092	c.226_227delinsAA	p.(Ser76Asn)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39325095	c.224C>T	p.(Ser75Phe)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39325095	c.224C>T	p.(Ser75Phe)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39325096	c.223T>G	p.(Ser75Ala)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39325098	c.221A>G	p.(Lys74Arg)	missense_variant
<i>RRAGC</i>	chr1:39325134	c.185C>G	p.(Pro62Arg)	missense_variant
<i>SGK1</i>	chr6:134492843	c.1099C>T	p.(Gln367Ter)	stop_gained
<i>SGK1</i>	chr6:134492843	c.1099C>T	p.(Gln367Ter)	stop_gained
<i>SGK1</i>	chr6:134493876	c.871G>A	p.(Glu291Lys)	missense_variant
<i>SGK1</i>	chr6:134495154	c.501_502delinsTG	p.(Pro168Ala)	missense_variant
<i>SGK1</i>	chr6:134495724	c.362C>G	p.(Ala121Gly)	missense_variant
<i>SMARCA4</i>	chr19:11138543	c.3299T>C	p.(Leu1100Pro)	missense_variant
<i>SMARCA4</i>	chr19:11143993	c.3574C>T	p.(Arg1192Cys)	missense_variant
<i>SMARCA4</i>	chr19:11143993	c.3574C>T	p.(Arg1192Cys)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11348711	c.625T>C	p.(Phe209Leu)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11348807	c.529C>G	p.(Leu177Val)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11348837	c.499C>T	p.(Arg167Cys)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11348893	c.443T>C	p.(Phe148Ser)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11348945	c.391C>T	p.(Gln131Ter)	stop_gained
<i>SOCS1</i>	chr16:11348972	c.364G>A	p.(Gly122Arg)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349059	c.265_276del	p.(Ala89_Arg92del)	inframe_deletion
<i>SOCS1</i>	chr16:11349080	c.256G>T	p.(Val86Leu)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349099	c.237C>G	p.(Phe79Leu)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349137	c.199A>T	p.(Ile67Phe)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349174	c.162C>A	p.(His54Gln)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349176	c.160C>G	p.(His54Asp)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349287	c.46_49delinsACAA	p.(Ala16_Ala17delinsThrThr)	frameshift_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349290	c.46G>T	p.(Ala16Ser)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349290	c.46G>A	p.(Ala16Thr)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349316	c.20T>C	p.(Val7Ala)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349329	c.7G>A	p.(Ala3Thr)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349331	c.5T>C	p.(Val2Ala)	missense_variant
<i>SOCS1</i>	chr16:11349331	c.5T>A	p.(Val2Glu)	missense_variant
<i>ST6GAL1</i>	chr3:186761047	c.556G>C	p.(Val186Leu)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57493818	c.1568A>G	p.(Asp523Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57493819	c.1567G>A	p.(Asp523Asn)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57493830	c.1556A>T	p.(Asp519Val)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>C	p.(Asp419Ala)	missense_variant



Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>C	p.(Asp419Ala)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496661	c.1256A>G	p.(Asp419Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496662	c.1255G>A	p.(Asp419Asn)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496662	c.1255G>C	p.(Asp419His)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496662	c.1255G>A	p.(Asp419Asn)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496662	c.1255G>A	p.(Asp419Asn)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496662	c.1255G>A	p.(Asp419Asn)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496671	c.1246G>C	p.(Gly416Arg)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496671	c.1246G>C	p.(Gly416Arg)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57496671	c.1246G>C	p.(Gly416Arg)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57498329	c.1130A>G	p.(Glu377Gly)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57498330	c.1129G>A	p.(Glu377Lys)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57498345	c.1114G>A	p.(Glu372Lys)	missense_variant
<i>STAT6</i>	chr12:57498345	c.1114G>A	p.(Glu372Lys)	missense_variant
<i>TET2</i>	chr4:106157615	c.2518del	p.(Leu840Ter)	frameshift_variant
<i>TNFAIP3</i>	chr6:138196119	c.433G>T	p.(Glu145Ter)	stop_gained
<i>TNFAIP3</i>	chr6:138196859	c.523dup	p.(Ala175GlyfsTer79)	frameshift_variant
<i>TNFAIP3</i>	chr6:138199732	c.1150G>A	p.(Asp384Asn)	missense_variant
<i>TNFAIP3</i>	chr6:138199944	c.1368dup	p.(Pro457AlafsTer16)	frameshift_variant
<i>TNFAIP3</i>	chr6:138200458	c.1880_1881del	p.(Cys627PhefsTer44)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488116	c.13G>T	p.(Gly5Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488123	c.20G>A	p.(Trp7Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488124	c.21G>A	p.(Trp7Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488138	c.35G>A	p.(Trp12Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488138	c.35G>A	p.(Trp12Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488138	c.35G>A	p.(Trp12Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488138	c.35G>A	p.(Trp12Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488139	c.36G>A	p.(Trp12Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488140	c.37A>T	p.(Arg13Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488165	c.63_69+3del		splice_donor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488172	c.69G>C	c.(69G>C(p.=))	splice_region_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2488174	c.69+2T>C		splice_donor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489187	c.93delA	p.(Ala32ProfsTer32)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489189	c.99delC	p.(Cys34AlafsTer30)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489189	c.99dup	p.(Cys34LeufsTer43)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489234	c.141_144dup	p.(Val49ProfsTer29)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489235	c.140A>G	p.(Tyr47Cys)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489235	c.140A>G	p.(Tyr47Cys)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489258	c.163C>A	p.(Pro55Thr)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489781	c.179-1G>A		splice_acceptor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489781	c.179-1G>A		splice_acceptor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489782	c.179G>A	p.(Gly60Asp)	splice_region_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489818	c.218_219del	p.(Thr73SerfsTer3)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489880	c.277T>C	p.(Cys93Arg)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489880	c.277T>C	p.(Cys93Arg)	missense_variant

Gen	Posición cromosómica	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Consecuencia
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489886	c.283C>T	p.(Gln95Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489889	c.286T>A	p.(Cys96Ser)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489892	c.289C>T	p.(Gln97Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489908	c.304+2dup		splice_donor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2489908	c.304+1G>A		splice_donor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491261	c.305-1G>A		splice_acceptor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491289	c.332G>A	p.(Cys111Tyr)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491303	c.348_364del	p.(Asn116LysfsTer112)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491304	c.347A>T	p.(Asn116Ile)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491313	c.356G>A	p.(Cys119Tyr)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491332	c.377delT	p.(Phe126SerfsTer64)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491336	c.379T>C	p.(Cys127Arg)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491337	c.380G>A	p.(Cys127Tyr)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491337	c.380G>A	p.(Cys127Tyr)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491360	c.403T>C	p.(Cys135Arg)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2491366	c.409G>C	p.(Ala137Pro)	missense_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2492067	c.469_470del	p.(Gln158GlyfsTer75)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2492074	c.472C>T	p.(Gln158Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2492074	c.472C>T	p.(Gln158Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2492110	c.513_514del	p.(Pro172GlnfsTer61)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2492154	c.551+3_551+29del		splice_donor_variant,
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2493109	c.552-3C>T		splice_region_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2493120	c.560G>A	p.(Trp187Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2493153	c.595_598dup	p.(His200LeufsTer35)	frameshift_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2493163	c.603G>A	p.(Trp201Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2493169	c.609G>A	p.(Trp203Ter)	stop_gained
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2493255	c.694+1G>C		splice_donor_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2493258	c.694+4A>G		splice_region_variant
<i>TNFRSF14</i>	chr1:2494616	c.757del	p.(Thr253GlnfsTer49)	frameshift_variant
<i>TP53</i>	chr17:7577120	c.818G>T	p.(Arg273Leu)	missense_variant
<i>TP53</i>	chr17:7577120	c.818G>T	p.(Arg273Leu)	missense_variant
<i>TP53</i>	chr17:7577538	c.743G>A	p.(Arg248Gln)	missense_variant
<i>TP53</i>	chr17:7578513	c.417G>C	p.(Lys139Asn)	missense_variant
<i>TP53</i>	chr17:7579584	c.102dup	p.(Pro36AlafsTer7)	frameshift_variant

► **Publicaciones como primera autora durante la tesis**

 Letters to the Editor

2104

**MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma**

*Leukemia* (2014) **28**, 2104–2106; doi:10.1038/leu.2014.184

C Fernández-Rodríguez<sup>1,2,6</sup>, B Bellosillo<sup>1,3,4,6</sup>, M García-García<sup>3</sup>,  
B Sánchez-González<sup>1,5</sup>, E Gimeno<sup>1,5</sup>, MC Vela<sup>3</sup>, S Serrano<sup>3</sup>,  
C Besse<sup>1,5</sup> and A Salar<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Grup de Recerca Clínica Aplicada en Neoplàsies Hematològiques-Hospital del Mar-IMIM, Barcelona, Spain;  
<sup>2</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain;  
<sup>3</sup>Department of Pathology, Hospital del Mar-IMIM, Barcelona, Spain;  
<sup>4</sup>Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain and  
<sup>5</sup>Department of Hematology, Hospital del Mar-IMIM, Barcelona, Spain  
E-mail: asalar@parcdesalutmar.cat  
<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work.

*Leukemia & Lymphoma*, March 2016; 57(3): 692–699  
© 2015 Informa UK, Ltd.  
ISSN: 1042-8194 print / 1079-2403 online  
DOI: 10.3109/10428194.2015.1063143

**informa**  
healthcare

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

**Anti-tumor activity of the combination of bendamustine with vorinostat in diffuse large B-cell lymphoma cells**

Concepción Fernández-Rodríguez<sup>1,2</sup>, Antonio Salar<sup>2,3</sup>, Alfons Navarro<sup>4</sup>, Eva Gimeno<sup>2,3</sup>,  
Silvia Pairet<sup>2,5</sup>, Laura Camacho<sup>2</sup>, Mariana Ferraro<sup>3</sup>, Sergi Serrano<sup>5</sup>, Carles Besse<sup>2,3</sup>, Beatriz Bellosillo<sup>2,5,6</sup>  
& Blanca Sanchez-Gonzalez<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>2</sup>IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Servei d'Hematologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Human Anatomy Unit, School of Medicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, and <sup>6</sup>Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS *14*: 75–82 (2017)  
doi:10.21873/cgp.20020

**MicroRNAs 142-3p, miR-155 and miR-203 Are Deregulated in Gastric MALT Lymphomas Compared to Chronic Gastritis**

CONCEPCIÓN FERNÁNDEZ<sup>1,2,3</sup>, BEATRIZ BELLOSILLO<sup>1,2,4\*</sup>, MARIANA FERRARO<sup>3,5</sup>,  
AGUSTÍN SEOANE<sup>6</sup>, BLANCA SÁNCHEZ-GONZÁLEZ<sup>2,5</sup>, SILVIA PAIRET<sup>1,2</sup>, AINA PONS<sup>2</sup>,  
LUIS BARRANCO<sup>6</sup>, MARÍA CARMEN VELA<sup>1</sup>, EVA GIMENO<sup>2,5</sup>, LLUÍS COLOMO<sup>1</sup>,  
CARLES BESSES<sup>2,5</sup>, ALFONS NAVARRO<sup>7\*</sup> and ANTONIO SALAR<sup>2,3,5,6</sup>

<sup>1</sup>Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain;  
<sup>2</sup>IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain;  
<sup>3</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain;  
<sup>4</sup>Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain;  
<sup>5</sup>Hematology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain;  
<sup>6</sup>Digestive Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain;  
<sup>7</sup>Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain



► **Publicaciones en colaboración durante la tesis**

1. Espinet B, Ferrer A, Bellosillo B, Nonell L, Salar A, **Fernández-Rodríguez C**, Puigdecamet E, Gimeno J, Garcia-Garcia M, Vela MC, Luno E, Collado R, Navarro JT, Banda E, Abrisqueta P, Arenillas L, Serrano C, Lloreta J, Minana B, Cerutti A, Florensa L, Orfao A, Sanz F, Sole F, Dominguez-Sola D, Serrano S. *Distinction between Asymptomatic Monoclonal B-cell Lymphocytosis with Cyclin D1 Overexpression and Mantle Cell Lymphoma: From Molecular Profiling to Flow Cytometry*. Clin Cancer Res. 2014;20(4):1007-1019. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1077
2. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, Kerguelen A, Hernández-Boluda JC, Martínez-Avilés L, **Fernández-Rodríguez C**, Gómez M, Lombardía L, Angona A, Ancochea A, Senín A, Longarón R, Navarro B, Collado M, Besses, Carlos. *JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events*. Am J Hematol. 2014;89(5):517-523. doi:10.1002/ajh.23676
3. Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, Camacho L, Fernández-Rodríguez C, Pairet S, Longarón R, Ancochea A, Senín A, Florensa L, Besses C, **Fernández-Rodríguez C**, Pairet S, Longarón R, Ancochea Á, Senín A, Florensa L, Besses C. *Hematopoietic clonal dominance, stem cell mutations and evolutionary pattern of JAK2V617F allele burden in polycythemia vera*. Eur J Haematol. 2014;94(3):251-257. doi:10.1111/ejh.12425
4. Puiggros A, Venturas M, Salido M, Blanco G, **Fernández-Rodríguez C**, Collado R, Valiente A, Ruiz-Xivillé N, Carrió A, Ortuño FJ, Luño E, Calasanz MJ, Ardanaz MT, Piñán MÁ, Talavera E, González MT, Ortega M, Marugán I, Ferrer A, Gimeno E, Bellosillo B, Delgado J, Hernández JA, Hernández-Rivas JM, Espinet B. *Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia: Different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical*

- outcome*. Genes, Chromosom Cancer. 2014;53(9):788-797. doi:10.1002/gcc.22188
5. Senín A, Arenillas L, Martínez-Avilés L, **Fernández-Rodríguez C**, Bellosillo B, Florensa L, Besses C, Álvarez-Larrán A. *Caracterización molecular de la leucemia mieloide crónica atípica y la leucemia neutrofilica crónica*. Med Clin (Barc). 2015;144(11):487-490. doi:10.1016/j.medcli.2014.03.020
  6. Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Longarón R, **Fernández-Rodríguez C**, Besses C. *Dynamics of JAK2 V617F allele burden of CD34 + haematopoietic progenitor cells in patients treated with ruxolitinib*. Br J Haematol. 2015;172(4):639-642. doi:10.1111/bjh.13535
  7. Ancochea Á, Salar A, García-Pallarols F, Gimeno E, **Fernández-Rodríguez C**, Sánchez-González B. [Prognostic impact of anthracyclines in the treatment of aggressive lymphoma in patients over 70 years]. Med Clin (Barc). 2015;144(12):544-547. doi:10.1016/j.medcli.2014.04.026
  8. Angona A, Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Longarón R, Camacho L, **Fernández-Rodríguez C**, Pairet S, Besses C. *Characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in JAK2V617F and CALR-mutated myeloproliferative neoplasms*. Leuk Res. 2016;48:11-15. doi:10.1016/j.leukres.2016.06.009
  9. Alvarez-Larrán A, Angona A, Ancochea A, García-Pallarols F, **Fernández-Rodríguez C**, Longarón R, Bellosillo B, Besses C. *Masked polycythaemia vera: presenting features, response to treatment and clinical outcomes*. Eur J Haematol. 2016;96(1):83-89. doi:10.1111/ejh.12552
  10. Navarro A, Pairet S, Álvarez-Larrán A, Pons A, Ferrer G, Longarón R, **Fernández-Rodríguez C**, Camacho L, Monzó M, Besses C, Bellosillo B. *miR-203 and miR-221 regulate SOCS1 and SOCS3 in essential thrombocythemia*. Blood Cancer J. 2016;6(3):e406. doi:10.1038/bcj.2016.10
  11. Angona A, **Fernández-Rodríguez C**, Alvarez-Larrán A, Camacho L, Longarón R, Torres E, Pairet S, Besses C, Bellosillo B. *Molecular characterisation of triple negative essential thrombocythaemia patients by*

- platelet analysis and targeted sequencing*. Blood Cancer J. 2016;6(8):e463. doi:10.1038/bcj.2016.75
12. Senín A, **Fernández-Rodríguez C**, Bellosillo B, Camacho L, Longarón R, Angona A, Besses C, Álvarez-Larrán A. *Non-driver mutations in patients with JAK2V617F-mutated polycythemia vera or essential thrombocythemia with long-term molecular follow-up*. Ann Hematol. 2017;97(3):443-451. doi:10.1007/s00277-017-3193-5
  13. Alvarez-Larrán A, Senín A, **Fernández-Rodríguez C**, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Gómez M, Ferrer-Marin F, Martínez-López J, Camacho L, Colomer D, Angona A, Navarro B, Cervantes F, Besses C, Bellosillo B, Hernández-Boluda JC. *Impact of genotype on leukaemic transformation in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia*. Br J Haematol. 2017;178(5):764-771. doi:10.1111/BJH.14762
  14. Moliner L, **Fernández-Rodríguez C**, Clavé S, Arriola E. *Accurate Identification of Predictive Biomarkers of Response to Targeted Therapies in Lung Cancer With Next Generation Sequencing*. Arch Bronconeumol. 2019;55(5):268-269. doi:10.1016/j.arbres.2018.07.014
  15. Garcia-Gisbert N, Fernández-Ibarrondo L, **Fernández-Rodríguez C**, Gibert J, Andrade-Campos M, Arenillas L, Camacho L, Angona A, Longarón Raquel, Salar A, Calvo X, Besses C, Bellosillo B. *Circulating cell-free DNA improves the molecular characterisation of Ph-negative myeloproliferative neoplasms*. Br J Haematol. 2020;192(2):300-309. doi:10.1111/bjh.17087
  16. Garcia-Gisbert N, Camacho L, Fernández-Ibarrondo L, **Fernández-Rodríguez C**, Longarón R, Gibert J, Angona A, Andrade-Campos M, Salar A, Besses C, Bellosillo B. *Analysis of saliva samples and cluster of differentiation 3 (CD3)+ lymphocytes as a source of germline DNA in myeloproliferative neoplasms*. Br J Haematol. 2020;189(5):e204-e207. doi:10.1111/bjh.16624
  17. Taus Á, Camacho L, Rocha P, Hernández A, Longarón R, Clavé S, Fernández-Ibarrondo L, Salido M, Hardy-Werbin M, **Fernández-Rodríguez C**, Albanell J, Bellosillo B, Arriola E. *Plasmatic KRAS Kinetics for*

- the Prediction of Treatment Response and Progression in Patients With KRAS-mutant Lung Adenocarcinoma.* Arch Bronconeumol. 2020. doi:10.1016/j.arbres.2020.01.023
18. Gadea A, Hernández-Muñoz I, Vicente A, Andrades E, García-Calvente M, Camacho L, **Fernández-Rodríguez C**, Bellosillo B, Pujol R, Toll A. *Molecular characterisation of oncogenic urothelial mosaic mutations in patients with extensive keratinocytic epidermal naevi.* J Med Genet. 2020;57(9):601-604. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106296
19. Calvo X, Garcia-Gisbert N, Parraga I, Gibert J, Florensa L, Andrade-Campos M, Merchan B, Garcia-Ávila S, Montesdeoca S, **Fernández-Rodríguez C**, Salido M, Puiggros A, Espinet B, Colomo L, Roman-Bravo D, Bellosillo B, Ferrer A, Arenillas L. *Oligomonocytic and overt chronic myelomonocytic leukemia show similar clinical, genomic, and immunophenotypic features.* Blood Adv. 2020;4(20):5285-5296. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2020002206
20. Ferrer-Marín F, Arroyo AB, Bellosillo B, Cuenca EJ, Zamora L, Hernández-Rivas JM, Hernández-Boluda JC, **Fernández-Rodríguez C**, Luño E, García Hernández C, Kerguelen A, Fiallo-Suárez DV, Gómez-Casares MT, Ayala R, Vélez P, Boqué C, García-Gutiérrez V, Arrizabalaga B, Estrada N, Cifuentes R, Arcas I, de los Reyes-García AM, Besses C, Vicente V, Álvarez-Larrán, A, Teruel-Montoya R, González-Conejero R, Martínez C. *miR-146a rs2431697 identifies myeloproliferative neoplasm patients with higher secondary myelofibrosis progression risk.* Leukemia. 2020;34(10):2648-2659. doi:10.1038/s41375-020-0767-3



## AGRADECIMIENTOS

A Antonio y Bea, por ser mis guías en este camino y dos enormes ejemplos de dedicación.

A Silvia, Laura, Lierni y Nieves, por ser siempre, de principio a fin, una luz.

A Gemma y Sergi, por ser los mejores compañeros que podría tener.

A todos los compañeros (los que son y los que fueron) del Grup de Recerca Clínica Aplicada en Neoplàsies Hematològiques, por el maravilloso tiempo compartido y todo lo aprendido.

A todos los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular, por los buenos ratos y por ayudarme siempre.

A todos los compañeros (los que son y los que fueron) de Hematología Clínica, Citología Hematológica, Citogenética y Patología del Hospital del Mar, por contagiarme la pasión y excelencia con la que trabajan y por su inestimable ayuda.

A los compañeros del Hospital Universitario de Son Espases y de MD Anderson Madrid, por prestar su valiosísima colaboración en este proyecto.

A los pacientes que han participado en el estudio. Este trabajo es por y para ellos.

A los míos, por ser una fuente de apoyo y amor incondicionales y mi auténtica inspiración.