



MEMORIA CONVOCATORIA 2025 – 2026

TÍTULO: Papel de <i>ERCC6L2</i> en la predisposición al Síndrome Mielodisplásico
INVESTIGADOR PRINCIPAL: María Díez Campelo
RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto) (ajustarse al espacio disponible): <p>Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de trastornos hematológicos que se caracterizan por una hematopoyesis ineficaz, lo que da lugar a citopenias periféricas, una médula ósea normo o hiper celular con alteraciones morfológicas (hematopoyesis displásica) y riesgo aumentado de desarrollar una leucemia mieloide aguda. La enfermedad surge principalmente debido a la adquisición de alteraciones citogenéticas y mutaciones somáticas en las células progenitoras hematopoyéticas. Aunque el número de alteraciones adquiridas es amplio en su mayoría suelen ser recurrentes y presentar asociaciones clínicas robustas que permiten certificar su patogenicidad.</p> <p>Pero además de las alteraciones de carácter somático, en los últimos años el número de pacientes con SMD de carácter germinal ha aumentado notablemente. Tanto es así que la Organización Mundial de la Salud incluyó en 2017 una nueva categoría: neoplasias mieloides con predisposición en la línea germinal. Sin embargo, este catálogo de alteraciones parece estar incompleto debido en gran medida a la dificultad para determinar con precisión la patogenicidad real de las variantes encontradas.</p> <p>En esta propuesta partimos de los resultados obtenidos a partir de la secuenciación del exoma completo de la serie más larga (220) de pacientes jóvenes con SMD reclutados de 31 hospitales en España, en el seno del Grupo Español de SMD. Nuestro equipo pretende profundizar en el estudio de las mutaciones localizadas en genes implicados en respuesta al daño en el ADN, la vía más prometedora del estudio previamente mencionado. Y más concretamente, pretendemos analizar el papel que <i>ERCC6L2</i> podría tener en la predisposición y patogenicidad de los SMD de carácter germinal. Los resultados obtenidos no solo contribuirían a aumentar el catálogo de mutaciones germinales asociadas a SMD y por consiguiente a un mejor diagnóstico de los mismos si no que establecerían las bases para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a este subconjunto de enfermos lo que llevaría a una medicina más personalizada en los SMD.</p>



ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA (Citar las referencias incluidas en el apartado siguiente) (Máximo 3 páginas)

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son definidos por la organización Mundial de la Salud (OMS) como un cáncer hematopoyético caracterizado por una medula ósea ineficaz (manifestado como displasias morfológicas y citopenias periféricas) y una mayor probabilidad de evolucionar a leucemia mieloide aguda (LMA) (1). **La enfermedad surge principalmente debido a la adquisición y acumulación de alteraciones citogenéticas y mutaciones somáticas en las células progenitoras hematopoyéticas.** Alrededor del 90% de los pacientes presentan al menos una alteración de carácter somático al momento del diagnóstico (2).

Durante los últimos 10 años, el desarrollo de la secuenciación genómica a gran escala ha permitido describir el perfil mutacional de carácter somático de la mayoría de los tipos de cáncer (3). Pero curiosamente, además de brindar información sobre el significado diagnóstico y pronóstico de estas alteraciones adquiridas, la evaluación del material no tumoral o de la línea germinal mostró que un inesperado 8% de pacientes adultos presentaban una variante patogénica de la línea germinal (4). Algo similar ha sucedido en los SMD, y en reconocimiento al creciente número de casos de SMD o LMA asociados con mutaciones de la línea germinal, la reciente clasificación de la OMS (2022) incluye una **nueva categoría: neoplasias mieloides con predisposición en la línea germinal.** Esta clasificación incluye neoplasias mieloides con predisposición germinal sin disfunción orgánica ni enfermedad plaquetaria previa (con mutación en los genes *CEBPA*, *DDX41* o *TP53*), neoplasias mieloides con predisposición germinal y trastorno plaquetario previo (con mutaciones en *RUNX1*, *ANKRD26* o *ETV6*) y neoplasias mieloides con predisposición germinal y otras alteraciones orgánicas (con mutación en los genes *GATA2*, *SAMD9*, *SAMD9L* o *BLM*) (1).

Por tanto, aunque la génesis del SMD ha sido tradicionalmente asociada con alteraciones adquiridas en las células progenitoras hematopoyéticas, **el creciente número de casos con SMD asociado a mutaciones de carácter germinal no puede ser subestimado.** Este es un campo de investigación en evolución pero que tiene una **clara importancia en el cuidado de los pacientes por varios motivos:** 1. La identificación de la predisposición genética a desarrollar un SMD informa y brinda una oportunidad para el seguimiento y la intervención temprana. 2. En los pacientes con SMD en los que es posible realizar un trasplante, la donación de MO por un familiar (que albergan la misma variante de susceptibilidad) podría explicar los no infrecuentes fallos de injerto, complicaciones pulmonares o incluso el desarrollo de un nuevo SMD o leucemia (5). 3. La especial susceptibilidad de los pacientes portadores de estas mutaciones constitucionales para desarrollar segundos tumores, principalmente debido a un sistema defectuoso de reparación del ADN, los convierte en un grupo en el que se deben evitar los fármacos citotóxicos en dosis altas (6). 4. La detección de una variante de predisposición en un paciente tiene, además, implicaciones importantes para los familiares portadores de dicha mutación.

La presente propuesta se plantea a partir de un repositorio de muestras y resultados previos obtenidos en el seno del Grupo Español de SMD (GESMD). En sus estudios, **se analizaron mediante secuenciación del exoma completo un total de 220 casos** de SMD en adultos jóvenes (16-60 años) reclutados de 32 centros nacionales para una caracterización integral de las variantes germinales potencialmente predisponentes a SMD. Los resultados de este estudio mostraron que **el 27,8% de los casos presentaban variantes patogénicas o probablemente patogénicas que podrían tener algún papel en la predisposición a la enfermedad** (7). Mientras que en algunos casos, se trataba de genes ya incluidos en la última clasificación de la OMS como *GATA2* o *SAMD9*, otros eran genes no descritos hasta el momento. De todos ellos, **las mutaciones localizadas en genes implicados en respuesta al daño en el ADN** (DNA Damage Response – DDR) **constituían la vía más prometedora** y dentro de este conjunto de genes, destacó la presencia de mutaciones en *ERCC6L2*. Más concretamente, se identificaron 11 pacientes con mutaciones no descritas previamente en *ERCC6L2* (8). 9 de los 11 casos tenían configuración monoalélica y la media de edad para este conjunto de



pacientes era de 44 años.

ERCC6L2 es un miembro de la familia *Snf2* de proteínas helicasa-like y está localizado en el brazo largo del cromosoma 9. Presenta una isoforma corta con 14 exones y 701 aminoácidos, y una larga con 19 exones y 1550 aminoácidos (9). *ERCC6L2* es un gen recientemente identificado que está implicado en la vía de reparación del ADN por escisión de nucleótidos y también podría estar implicado en las funciones mitocondriales contribuyendo a mantener la homeostasis celular (10). Además, recientes estudios apuntan a que este gen tiene un papel en el modelado de cromatina, al participar en la resolución de los bucles R, haciendo que la cromatina sea accesible a la maquinaria de transcripción (11).

La enfermedad familiar relacionada con *ERCC6L2* fue descrita en 2018. Los niños afectados presentaban un **fenotipo clínico complejo** con varios órganos afectados (retraso en el desarrollo y microcefalia), además de insuficiencia medular. Ninguno de esos casos desarrolló SMD o LMA. Sin embargo, estudios posteriores han descrito pacientes en los que **las manifestaciones extrahematopoyéticas no estaban siempre presentes** (12). Siete casos de SMD y/o LMA fueron comunicados de entre 24 pacientes con mutaciones bialélicas en *ERCC6L2*. Estos pacientes fueron diagnosticados con SMD o LMA en la infancia o en la edad adulta joven (rango, 2 a 22 años) (13). De manera interesante, la edad media de estos pacientes contrasta con la de aquellos pacientes descrita en la cohorte del GESMD.

La agresividad biológica y clínica de los casos identificados, la participación de *ERCC6L2* en un mecanismo crucial en la respuesta a la quimioterapia y el relativo desconocimiento de su función, llevan a la **necesidad de profundizar en su papel biológico y las potenciales consecuencias de su alteración** en pacientes más allá de la edad pediátrica.

Nuestros objetivos en la presente propuesta enfrentan las dos barreras principales para la atención clínica de los pacientes con SMD con predisposición germinal: un catálogo incompleto de genes y variantes responsables y una incapacidad para determinar con precisión la patogenicidad real de las variantes encontradas. En este trabajo se plantea añadir nuevas capas de precisión diagnóstica y el análisis específico de una de las vías más prometedoras encontradas hasta el momento en estudios previos, la respuesta al daño del ADN.

RESULTADOS PREVIOS

En nuestro grupo se generaron dos modelos celulares en la línea HEL mediante edición génica con CRISPR/Cas9: un modelo knock-in (*ERCC6L2^{KI}*), que reprodujo una variante específica del gen *ERCC6L2* identificada en un paciente con sospecha de predisposición a SMD, y un modelo knock-out (*ERCC6L2^{KO}*), diseñado para inducir mutaciones con pérdida de función.

Desde el punto de vista técnico, la estrategia de edición génica fue altamente eficiente. En el modelo KI, un 5,3% de las células incorporaron el complejo de edición y en el 34,6% de ellas se produjo el cambio de un nucleótido por otro en la posición de interés. En el modelo KO, un 24,6 % de las células incorporaron exitosamente el complejo de edición, y de estas, un 67,9 % presentaron mutaciones en *ERCC6L2* debidas a inserciones y deleciones (indels) de al menos una base. Estos resultados avalan la robustez del sistema CRISPR/Cas9 utilizado para el gen *ERCC6L2*.

A nivel funcional, ambos modelos (KI y KO) mostraron fenotipos celulares consistentes con una disfunción de *ERCC6L2*.

En condiciones basales, tanto las células KI como las KO presentaron un aumento significativo en los focos de daño en el ADN en comparación con las células control ($p < 0,0001$). Esta acumulación de daño en el ADN se asoció con un incremento en la proporción de células apoptóticas ($p < 0,0001$) y con una reducción significativa en la proliferación celular ($p < 0,0001$), en ambos modelos.



Tras la exposición a mitomicina C (MMC), un agente que induce daño en el ADN, se observó un aumento significativo en el número ($p=0,0006$) y el tamaño ($p<0,0001$) de los focos de daño en células KI y KO.

El tratamiento con MMC provocó además un aumento significativo en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales en las células *ERCC6L2^{KI}*, alcanzando valores comparables a los del modelo KO y significativamente superiores a los observados en las células control ($p<0,0001$). Esta alteración en la homeostasis mitocondrial respalda la existencia de una disfunción mitocondrial asociada a la pérdida o alteración funcional de *ERCC6L2*.

Este tratamiento también provocó una reducción de la viabilidad celular ($p=0,002$), probablemente asociada al aumento adicional de ROS mitocondriales observado en ambas condiciones ($p<0,0001$).

Por tanto, el modelo *ERCC6L2^{KI}* generado a partir de la variante identificada en el paciente mostró una reparación ineficaz del daño en el ADN comparable a la observada en el modelo KO. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que dicha variante podría predisponer al desarrollo de SMD.

Basándonos en la solidez de estos hallazgos, planteamos la generación de un modelo murino knock-in que reproduzca fielmente la variante del paciente, con el objetivo de estudiar su impacto fisiopatológico *in vivo* en el contexto de predisposición a neoplasias mieloides.



BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE (Máximo 1 página)

1. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1703–19.
2. Bănescu C, Tripon F, Muntean C. The Genetic Landscape of Myelodysplastic Neoplasm Progression to Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar;24(6).
3. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*. 2020 Feb;578(7793):82–93.
4. Huang KL, Mashl RJ, Wu Y, Ritter DI, Wang J, Oh C, et al. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell*. 2018 Apr;173(2):355-370.e14.
5. Sakata N, Okano M, Masako R, Tanaka A, Yamashita Y, Karasuno T, et al. Donor-derived myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation in a family with germline GATA2 mutation. *Int J Hematol*. 2021 Feb;113(2):290–6.
6. Hofmann I, Avagyan S, Stetson A, Guo D, Al-Sayegh H, London WB, et al. Comparison of Outcomes of Myeloablative Allogeneic Stem Cell Transplantation for Pediatric Patients with Bone Marrow Failure, Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia with and without Germline GATA2 Mutations. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020 Jun;26(6):1124–30.
7. Chen-Liang TH, Carrillo-Tornel S, Santiago M, López Andrade B, Hernandez FM, García-Martín P, et al. Germline and Somatic Variants Co-Occurrence Profile in Early Onset Adult Myelodysplastic Syndromes without a Preexisting Disorder. *Blood [Internet]*. 2021 Nov 5;138(Supplement 1):2595. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2021-152128>
8. Carrillo-Tornel S, Chen-Liang TH, Yeguas Bermejo A, Pomares H, Liquori A, González T, et al. ERCC6L2 in Early-Onset Adult Myelodysplastic Syndrome without Pre-Existing Disorder. *Blood [Internet]*. 2022 Nov 15;140(Supplement 1):4074–5. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2022-168759>
9. Armes H, Bewicke-Copley F, Rio-Machin A, Di Bella D, Philippe C, Wozniak A, et al. Germline ERCC excision repair 6 like 2 (ERCC6L2) mutations lead to impaired erythropoiesis and reshaping of the bone marrow microenvironment. *Br J Haematol*. 2022 Dec;199(5):754–64.
10. Tummala H, Kirwan M, Walne AJ, Hossain U, Jackson N, Pondarre C, et al. ERCC6L2 mutations link a distinct bone-marrow-failure syndrome to DNA repair and mitochondrial function. *Am J Hum Genet*. 2014 Feb;94(2):246–56.
11. Sharma R, Lewis S, Wlodarski MW. DNA Repair Syndromes and Cancer: Insights Into Genetics and Phenotypic Patterns. *Front Pediatr*. 2020;8:570084.
12. Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, Peffault de Latour R, Quentin S, Lainey E, et al. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood*. 2018 Feb;131(7):717–32.
13. Douglas SPM, Siipola P, Kovanen PE, Pyörälä M, Kakko S, Savolainen ER, et al. ERCC6L2 defines a novel entity within inherited acute myeloid leukemia. Vol. 133, *Blood*. United States; 2019. p. 2724–8.



HIPÓTESIS (Ajustarse al espacio disponible)

En el grupo de pacientes con SMD en adulto diagnosticado a edad temprana, sin disfunción orgánica preexistente, la Organización Mundial de la Salud ha reconocido la existencia de sólo tres categorías: aquellos con variantes en línea germinal en los genes *DDX41*, *CEBPA* o *TP53*. Los datos de secuenciación del exoma completo, procedentes del reclutamiento de casos de centros pertenecientes al GESMD, han revelado otros genes candidatos a albergar variantes de la línea germinal que potencialmente predisponen a SMD. En este proyecto proponemos experimentos que nos permitirán poner a prueba nuestra hipótesis de que las nuevas alteraciones previamente detectadas en *ERCC6L2* son verdaderamente patogénicas en el tejido hematopoyético y predisponen al desarrollo de un SMD.

OBJETIVOS (ajustarse al espacio disponible)

OBJETIVO GENERAL:

En la presente propuesta nuestro equipo tiene como objetivo general determinar la patogenicidad y el papel en la predisposición a SMD del gen *ERCC6L2* con el fin último de ampliar el catálogo de mutaciones relacionadas con esta enfermedad y de esta manera contribuir a un mejor diagnóstico del conjunto de pacientes con SMD de origen germinal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Desarrollar un modelo de ratón que porte una mutación de línea germinal en *ERCC6L2* previamente detectada en un paciente con SMD
2. Evaluar en este modelo modelo *in vivo* el desarrollo de la enfermedad a lo largo del tiempo, la supervivencia global y el papel de la mutación en la DDR en un subconjunto de ratones irradiados.



METODOLOGÍA (Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio) (Máximo 4 páginas)

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos específicos de este estudio, el diseño experimental se fundamentará en los resultados obtenidos previamente en la línea celular HEL. Siguiendo un enfoque similar al utilizado en la generación del modelo *in vitro* knock-in (KI), se diseñarán las guías CRISPR-Cas9 y se prepararán los complejos de edición génica correspondientes. Dado el alto grado de conservación de la secuencia en la región genómica a editar entre las especies humana y murina, la mutación identificada en el paciente —e incorporada previamente en el modelo celular— podrá ser reproducida de manera precisa en el genoma murino, permitiendo así el desarrollo de un modelo animal que refleje fielmente la alteración genética de interés.

Los resultados obtenidos en el modelo celular KI, tanto desde el punto de vista técnico (eficiencia de edición y validación genotípica) como funcional (impacto biológico de la mutación), respaldan la viabilidad del enfoque y proporcionan una base sólida que justifica su traslado al modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de ratones genéticamente modificados

Se generarán ratones C57BL/6J genéticamente modificados mediante microinyección de CRISPR-Cas9 en el Servicio de Transgénesis de la Universidad de Salamanca. Para aumentar la probabilidad de éxito en la edición genética, se realizarán tres rondas de microinyección de cigotos con los complejos CRISPR-Cas9 y la guía específica para inducir la mutación germinal en el gen *ERCC6L2*. Los cigotos inyectados se implantarán en hembras pseudogestantes y se llevarán a término.

Los animales nacidos de esta primera generación (F0) serán genotipados (a partir de muestras de cola) mediante PCR y secuenciación para identificar la presencia de la mutación. Los individuos portadores de la mutación germinal confirmada serán cruzados con ratones C57BL/6J de tipo salvaje para obtener la primera generación filial (F1), asegurando la transmisión heredable de la mutación y evitando así posibles mosaicos.

En la F1, se realizará genotipado para identificar con precisión a los portadores de la mutación monoalélica. De entre estos, se seleccionarán tres ejemplares portadores para establecer los cruces fundadores que permitirán expandir la colonia. La cría de estos individuos se mantendrá en la instalación de animales OGM de la Universidad de Salamanca, bajo condiciones controladas de biocontención y bienestar animal.

En las generaciones posteriores, se realizarán cruces entre individuos heterocigotos para obtener ratones *ERCC6L2* de tipo salvaje (WT), heterocigotos (Het) y homocigotos (Hom) hasta formar grupos de estudio de 12 animales por genotipo, garantizando así un tamaño muestral adecuado para el análisis estadístico.

2. Detección de clones patológicos y evaluación del fenotipo

Con el objetivo de evaluar el desarrollo de la enfermedad y caracterizar los posibles fenotipos asociados a la mutación en *ERCC6L2*, se llevarán a cabo los siguientes procedimientos:

- **Seguimiento periódico:** Cada tres meses se realizará extracción de sangre periférica para efectuar un hemograma completo (CBC) y análisis de las poblaciones y la diferenciación celular mediante citometría de flujo, con el fin de detectar alteraciones hematológicas. Para la caracterización hematopoyética se emplearán anticuerpos monoclonales dirigidos contra los principales marcadores de linajes murinos, incluyendo linfocitos B (B220), linfocitos T (CD3,



- CD4, CD8), mieloides (Gr-1, CD11b - Mac-1) y células madre/progenitoras (c-Kit - CD117, Sca-1, CD34), entre otros.
- **Estudio post mortem:** En el momento del sacrificio o muerte natural, se obtendrán muestras de sangre periférica, médula ósea y bazo. Se realizará un hemograma completo, análisis de las poblaciones celulares y su diferenciación por citometría de flujo en médula ósea (empleando el mismo panel de anticuerpos), así como estudios histopatológicos de los tejidos hematopoyéticos y órganos linfoides para evaluar posibles alteraciones morfológicas y proliferativas.
 - **Pruebas de estrés genotóxico:** La mitad de los ratones de cada genotipo serán sometidos a irradiación subletal o tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU) para inducir estrés hematopoyético y daño en el ADN. Este enfoque permitirá determinar si la reparación deficiente del daño en el ADN, asociada a la mutación en *ERCC6L2*, acelera la aparición de la enfermedad o potencia la expansión de clones patológicos.

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos serán analizados utilizando pruebas estadísticas apropiadas (ANOVA, test de log-rank para supervivencia y análisis de Kaplan-Meier) para determinar diferencias significativas entre los distintos genotipos y condiciones experimentales. Se considerará un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los análisis y las representaciones gráficas se realizarán con el software GraphPad Prism.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Aunque el modelo murino generado mediante CRISPR-Cas9 constituye una herramienta sólida para estudiar el papel de la mutación en *ERCC6L2*, el proyecto presenta algunas limitaciones que se abordarán con estrategias específicas.

En primer lugar, aunque ya se han realizado estudios previos en líneas celulares humanas, las diferencias fisiológicas y de regulación génica entre ratón y humano podrían hacer que ciertos fenotipos hematológicos no se reproduzcan completamente; para minimizar esta limitación, se integrarán los resultados de las líneas celulares con los datos obtenidos en los ratones para identificar patrones consistentes y validar hallazgos clave.

En segundo lugar, la edición genética puede generar mutaciones *off-target*; para reducir este riesgo, se emplearán guías de alta especificidad, se confirmará la mutación mediante secuenciación Sanger y NGS, y se realizará un análisis exhaustivo del genoma en los animales fundadores.

Otra limitación es la variabilidad individual en la expresión del fenotipo, que podría dificultar la interpretación de los resultados; para solventarla, se emplearán grupos experimentales homogéneos de 12 animales por genotipo, se realizará un seguimiento longitudinal estandarizado y se aplicarán análisis estadísticos robustos que permitan identificar diferencias significativas entre los genotipos.

Además, el tiempo requerido para la cría y expansión de las generaciones (F0, F1, F2) se mitigará mediante tres rondas de microinyección en paralelo y la planificación optimizada del calendario de cruces. Estas estrategias permitirán maximizar la validez y reproducibilidad de los resultados obtenidos.



PLAN DE TRABAJO (Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador, incluyendo los proyectos en los que participe cada uno de sus integrantes. Indicar también el lugar de realización del proyecto) (Máximo 2 páginas)

El proyecto se desarrollará en cuatro fases principales que se solaparán parcialmente para optimizar los tiempos:

- **ETAPA 1: Edición genética y generación de la colonia fundadora**
Diseño de las guías CRISPR-Cas9, validación *in silico* y preparación de los complejos de edición. Rondas de microinyección de cigotos C57BL/6J. Implantación en hembras pseudogestantes, genotipado de F0 y cruces F0 × WT para obtener la generación F1.
- **ETAPA 2: Establecimiento de la colonia experimental**
Genotipado de F1. Cruces controlados para expandir la colonia y obtener individuos WT, heterocigotos y homocigotos. Registro y control sanitario de la colonia.
- **ETAPA 3: Seguimiento y caracterización fenotípica**
Extracciones de sangre periférica cada tres meses. Registro de parámetros clínicos, crecimiento, aparición de fenotipos hematológicos y supervivencia. Estudio histopatológico de médula ósea, bazo y sangre en animales sacrificados o fallecidos de forma natural.
- **ETAPA 4: Pruebas de estrés genotóxico y análisis final**
Exposición de la mitad de los animales de cada genotipo a irradiación subletal y/o 5-fluorouracilo (5-FU) para inducir estrés hematopoyético. Evaluación comparativa de la aparición de clones patológicos, alteraciones hematológicas y supervivencia global. Integración de resultados, análisis estadístico y preparación de manuscritos y reportes finales.

Distribución de tareas del equipo investigador:

- **María Díez Campelo:** Dirección científica y coordinación general del proyecto. Supervisión clínica de los análisis hematológicos y de los resultados fenotípicos. Interpretación de los datos en relación con las manifestaciones de SMD y redacción de publicaciones.
- **Mónica del Rey González:** Diseño y validación de las guías CRISPR-Cas9. Análisis molecular de los animales (PCR, secuenciación Sanger/NGS). Control de calidad de los genotipados. Interpretación de resultados y redacción de publicaciones.
- **Sandra Muntión Olave:** Coordinación de las microinyecciones, manejo de los animales F0/F1 y establecimiento de la colonia. Diseño de cruces y seguimiento reproductivo. Apoyo en irradiaciones y administración de 5-FU.
- **Raúl Azibeiro Melchor:** Evaluación clínica de los hemogramas y correlación con los hallazgos hematológicos. Participación en la interpretación de los datos experimentales y en la discusión de resultados.
- **Araceli Sama Barroso:** Ejecución de genotipados de rutina y seguimiento periódico de la colonia. Extracción de muestras, procesado para citometría de flujo e histopatología. Recogida y análisis de datos para su tesis doctoral.
- **Sara González Briones e Irene Rodríguez Iglesias:** Apoyo directo en cuidados de la colonia y cruces controlados. Extracciones de sangre, preparación de muestras y manejo de los equipos de citometría. Mantenimiento de registros experimentales y de control sanitario.



El proyecto se llevará a cabo en:

- **Servicio de Transgénesis de la Universidad de Salamanca:** diseño y ejecución de las microinyecciones CRISPR-Cas9.
- **Animalario de organismos genéticamente modificados (OGM) de la Universidad de Salamanca:** cría, mantenimiento y seguimiento de la colonia murina.
- **Laboratorios de Morfología (Hospital Universitario de Salamanca -HUS) y Citogenética (Centro de Investigación del Cáncer -CIC):** genotipado, análisis de citometría de flujo, hemogramas e histopatología.



EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR (Máximo 1 página)

El Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca (HUS) y el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) – Centro de Investigación del Cáncer (CIC) llevan años investigando en hemopatías malignas combinando investigación clínica y traslacional. Además, desde hace más de dos décadas nuestro grupo está implicado en una línea de investigación basada en las técnicas de citogenética molecular aplicadas al estudio de las neoplasias y uno de sus principales objetivos es la correlación de los hallazgos genéticos con sus implicaciones a nivel clínico.

La **Dra. María Díez Campelo** (MD, PhD), IP de la presente propuesta, centra su actividad asistencial e investigadora en los SMD y es la responsable del manejo de estos pacientes en el HUS. Ha sido coordinadora de 3 proyectos competitivos del ISCIII, (PI17/01741, PI20/00970 y PI2023/01103) y 2 proyectos europeos del programa H2020: “MDS Right” y “GenoMed4ALL: Genomics and Personalized Medicine for all though Artificial Intelligence in Haematological Diseases”. A estos hay que añadir el proyecto de Medicina Personalizada de Precisión recientemente concedido “UMBRELLA-SUMMA Legacy” y numerosos ensayos clínicos en SMD. Además, la Dra. Díez es la presidenta del Grupo Español de SMD (GESMD) desde octubre de 2018. El resultado de este trabajo son más 80 publicaciones indexadas (JCR), co-editora de 1 libro y coautora de 7 capítulos en libros científicos, más de 70 ponencias invitadas y 200 comunicaciones a congresos. En los últimos 5 años ha publicado más de 25 artículos en el campo de los SMD en revistas de alto impacto.

La **Dra. Mónica del Rey González** (PhD) cuenta con quince años de experiencia en el campo de la biología molecular de los SMD. Desarrolló su tesis doctoral sobre la identificación de nuevas alteraciones genéticas y funcionales en los SMD. Durante su período postdoctoral, trabajó en dos de las mejores instituciones para la investigación del cáncer: Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Nueva York) y New York University Langone Medical Center. Su investigación se centró en la identificación de genes resistentes a la terapia en LMA y SMD y en el estudio de la hematopoyesis relacionada con el envejecimiento y los SMD. La Dra. del Rey ha liderado cuatro proyectos de investigación relacionados con la presente propuesta y ha participado en otros proyectos nacionales e internacionales, principalmente en el campo de los SMD y la secuenciación masiva.

La **Dra. Sandra Muntión Olave** (PhD), es investigadora postdoctoral en el Área de Terapia Celular del HUS desde 2010. Ha colaborado en 30 proyectos de investigación y está especializada en modelos murinos, perfilado transcripcional, y análisis molecular del estroma en neoplasias hematológicas.

El Dr. **Raúl Azibeiro Melchor** (MD) es especialista en diagnóstico hematológico y en el manejo clínico de hemopatías mieloides. Ha participado en diversos proyectos de investigación a nivel regional y actualmente desarrolla su labor asistencial e investigadora como morfólogo, con especial dedicación al estudio de los SMD.

Araceli Sama Barroso, es graduada en biología, tiene un máster en biotecnología sanitaria y además amplia experiencia en estudios moleculares, funcionales y tecnologías de edición genómica. Su principal línea de investigación es el estudio de los SMD con predisposición germinal y también participa activamente en el resto de proyectos de SMD que se están desarrollando en el laboratorio.

Sara Rodríguez Briones e **Irene Rodríguez Iglesias** son técnicas de laboratorio con más de quince años de experiencia en el manejo de muestras hematológicas y en la realización de una amplia variedad de técnicas genéticas y de biología molecular. Ambas poseen la certificación para el manejo de animales y proporcionarán un soporte técnico fundamental para este proyecto.

En definitiva, el personal que compone el equipo constituye un grupo multidisciplinar y la totalidad del mismo es especialista en el estudio y manejo de los SMD. Estas características dotan al equipo de investigación de una amplia capacitación para el estudio que se propone.



UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN RELACIÓN CON LA SALUD (ajustarse al espacio disponible)

Los SMD son un grupo de neoplasias hematológicas que afectan con mayor frecuencia a personas de edad avanzada y que, tradicionalmente, se han vinculado a alteraciones adquiridas en las células progenitoras hematopoyéticas. Sin embargo, en los últimos años se ha evidenciado que también adultos jóvenes pueden desarrollar SMD de origen germinal, lo que amplía de forma considerable la heterogeneidad de la enfermedad y refuerza la necesidad de avanzar hacia una medicina de precisión en su diagnóstico y tratamiento.

El modelo murino que se generará en este proyecto permitirá reproducir y estudiar de manera controlada las consecuencias biológicas de una mutación germinal en *ERCC6L2*, un gen implicado en la reparación del ADN y recientemente relacionado con predisposición hereditaria a SMD. Los resultados obtenidos proporcionarán información clave sobre los mecanismos de desarrollo de la enfermedad, su evolución y respuesta frente a situaciones de estrés hematopoyético, datos esenciales para estratificar el riesgo, optimizar el pronóstico y diseñar estrategias terapéuticas más eficaces.

Además, este proyecto integra de forma directa el uso de tecnologías genéticas de vanguardia, como la edición genómica mediante CRISPR/Cas9 y la secuenciación masiva, acercando estas herramientas a la práctica clínica.

En conjunto, los hallazgos facilitarán la transferencia de conocimiento hacia la rutina diagnóstica, permitiendo identificar de manera temprana a pacientes con predisposición germinal, orientar el consejo genético familiar y sentar las bases para futuros tratamientos personalizados en los SMD.

MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO (ajustarse al espacio disponible)

En la actualidad, nuestro grupo posee toda la infraestructura y la tecnología necesarias para llevar a cabo este proyecto: Microscopía (campo claro, campo oscuro, fase de contraste, fluorescencia), Separador AutoMACS Pro de Miltenyi Biotec, contador celular HemoCue WBC, aparato de electroporación Neon (Invitrogen), espectrofotómetros Nanodrop y Qubit 2.0 (Life Technologies), TapeStation 4200 (Agilent Technologies), sonicador, microcentrifugas, ultracentrifugas, baños de agitación a temperatura variable, termocicladores, ordenadores con alta capacidad de análisis, herramientas informáticas para el análisis de resultados, congeladores de -20 y -80° y tanques de nitrógeno líquido.

El grupo también tiene acceso unidades y servicios de apoyo a la investigación del CIC y la Universidad de Salamanca, tales como:

- Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG): plataforma NextSeq 500 de Illumina
- Unidad de Citometría: análisis y separación de poblaciones celulares
- Unidad de Genómica: termociclador PCR en tiempo real, secuenciador Sanger ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) y bioanalizador Agilent
- Servicio de Patología Molecular Diagnóstica y Banco de Tumores
- Salas de cultivo celular: campana de flujo laminar e incubadores de CO₂
- Unidad de Microscopía Confocal
- Servicio de Experimentación Animal y Transgénesis, con amplia experiencia en el desarrollo de modelos murinos y toda la infraestructura necesaria para la experimentación animal cumpliendo los requisitos legales
- Animalario

El CIC dispone de almacén para la gestión de pedidos de reactivos, servicio de recogida de residuos y seguridad biológica, servicio de soporte informático y servicio bibliográfico.



JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LA AYUDA SOLICITADA (Máximo 2 páginas)

A continuación, se detalla el coste **total del proyecto**:

CONCEPTO		Subtotal
INVENTARIABLE		0 €
FUNGIBLE (kits laboratorio, reactivos, otros fungibles)		5000 €
PRESTACIÓN DE SERVICIOS	Contratación de servicios centralizados en el CIC/IBFG, la Universidad de Salamanca (Nucleus) y/o externos	25000 €
DIETAS-VIAJES	Difusión de resultados en congresos	1500 €
PUBLICACIONES-DIFUSIÓN	Publicación de resultados de acceso abierto	2000 €
TOTAL		33500 €

Se estima que el coste total del proyecto será de 33.500 euros. No obstante, en el marco de la presente convocatoria se solicitan 6.000 euros, que se destinarán a cubrir parcialmente la partida más costosa del proyecto: la prestación de servicios. En concreto, estos fondos se emplearán en servicios de transgénesis que incluyen microinyecciones en cigotos, transferencia de embriones, manejo reproductivo, verificación de la transmisión germinal, así como la criopreservación y el mantenimiento durante un año del esperma de un macho F1. El presupuesto también contempla el mantenimiento de la colonia en la instalación animal SPF.

El resto de los gastos necesarios para completar el coste total del proyecto será asumido por nuestro laboratorio con fondos propios.