

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Impacto clínico de las aberrancias inmunofenotípicas y perfil mutacional en síndromes mielodisplásicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Teresa Cedena Romero

Directores

Florinda Gilsanz Rodríguez
Joaquín Martínez López
Rosa Ayala Díaz

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento Medicina



**IMPACTO CLÍNICO DE LAS ABERRANCIAS
INMUNOFENOTÍPICAS Y PERFIL MUTACIONAL
EN SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

María Teresa Cedena Romero

Bajo la dirección de los doctores:

Prof. Florinda Gilsanz Rodríguez

Dr. Joaquín Martínez López

Dra. Rosa Ayala Díaz

TESIS DOCTORAL

Madrid 2015

Doña **Florinda Gilsanz Rodríguez**, catedrática del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (emérita).

Don **Joaquín Martínez López**, profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Doña **Rosa Ayala Díaz**, profesora asociada del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

CERTIFICAMOS: Que la Tesis Doctoral realizada bajo nuestra dirección por Dña María Teresa Cedena Romero titulada “**Impacto clínico de las aberrancias inmunofenotípicas y perfil mutacional en síndromes mielodisplásicos**” reúne las condiciones de originalidad y rigor científico requeridos, y corresponde fielmente con los resultados obtenidos.

El presente trabajo ha sido revisado por los que suscriben, encontrándolo apto para su presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral ante el tribunal que en su día se designe.

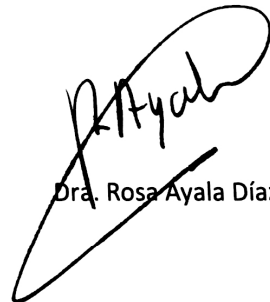
Y para que así conste donde proceda, firman el presente documento en Madrid, a nueve de octubre de dos mil quince.



Dra. Florinda Gilsanz Rodríguez



Dr. Joaquín Martínez López



Dra. Rosa Ayala Díaz

AGRADECIMIENTOS

A mi familia,
por su amor, su calor y su apoyo incondicional,
en especial a la luz de mi vida, Lucía.

A mis directores de tesis, Florinda, Joaquín y Rosa,
por no dejar que me rendiera en este esfuerzo,
y ofrecerme generosamente sus conocimientos y experiencia.

A mis compañeros de Hematología del hospital,
a los que están y a los que han pasado,
por compartir tantos momentos y conocimientos.

A mis amigos,
quienes en diferentes momentos y circunstancias
siempre han estado ahí.

A Belén y Carmen,
por su amistad y su apoyo.

A mis compañeros del grupo de mielodisplasia madrileño y nacional,
por compartir inquietudes y esfuerzos para entender esta enfermedad.

A mis pacientes,
por su paciencia, confianza, y entereza
para afrontar una enfermedad tan desalentadora.

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Diagnóstico	
1.1.1. Citomorfología en el diagnóstico de SMD	
1.1.2. Citogenética en el diagnóstico de SMD	
1.2. Clasificación y pronóstico de SMD	
1.3. Contribución de la citometría de flujo en el diagnóstico y pronóstico de SMD	
1.4. Contribución de la biología molecular en el diagnóstico y pronóstico de SMD	
2. OBJETIVOS	61
2.1. Hipótesis de Trabajo	
2.2. Objetivos	
2.2.1. Objetivos en el análisis por citometría de flujo	
2.2.2. Objetivos en el análisis por secuenciación masiva de nueva generación	
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1. Pacientes y controles	
3.2. Estudio inmunofenotípico por citometría de flujo	
3.3. Estudio mutacional por secuenciación masiva de nueva generación	
3.4. Análisis estadístico	
4. RESULTADOS	85
4.1. Análisis de inmunofenotipo por citometría de flujo	
4.1.1. Alteraciones inmunofenotípicas en pacientes y controles	

4.1.2. Aplicación del “score diagnóstico” a pacientes y controles	
4.1.3. Diseño de una base de datos de maduración mieloide	
4.1.3.1. Análisis de un control con la base de datos de maduración	
4.1.3.2. Análisis de un paciente con la base de datos de maduración	
4.1.3.3. Resultados del análisis con la base de datos de maduración mieloide	
4.1.3.4. Evaluación de la base de datos de maduración mieloide como test diagnóstico	
4.2. Análisis del perfil mutacional por secuenciación masiva	
4.2.1. Mutaciones en pacientes con SMD	
4.2.2. Carga alélica y mutaciones acumuladas en un gen	
4.2.3. Vías celulares afectadas por mutaciones en pacientes con SMD	
4.2.4. Relaciones entre variables clínicas y mutaciones	
4.2.5. Correlación entre mutaciones	
4.2.6. Asociación entre supervivencia global, características clínicas y mutaciones	
4.2.7. Scores pronósticos moleculares	
4.2.8. Impacto de marcadores moleculares en función del riesgo	
4.2.9. Impacto de la acumulación de mutaciones	
4.2.10. Análisis de variaciones en el número de copias	
5. DISCUSIÓN	133
5.1. Resultados del análisis del inmunofenotipo por citometría de flujo	
5.1.1. Resultados del análisis de las alteraciones inmunofenotípicas	
5.1.2. Resultados de la aplicación del “score diagnóstico”	
5.1.3. Resultados del diseño de una base de datos de maduración	
5.2. Resultados del perfil mutacional por secuenciación masiva	
5.2.1. Mutaciones en pacientes con SMD	
5.2.2. Impacto de las mutaciones en las características clínicas	
5.2.3. Relaciones entre mutaciones	
5.2.4. Impacto pronóstico de las mutaciones en SMD	
5.2.5. Resultados del análisis en la variación en el número de copias	
6. CONCLUSIONES	153

7. BIBLIOGRAFÍA	157
8. ANEXOS	171
8.1. Tabla con la descripción de las mutaciones analizadas		
8.2. Listado de tablas		
8.3. Listado de figuras		

ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

A:	adenina
ADN:	ácido desoxirribonucleico
APC:	aloficocianina
AR:	anemia refractaria
AREB:	anemia refractaria con exceso de blastos
ARN:	ácido ribonucleico
ARSA:	anemia refractaria con sideroblastos en anillo
ARSA-T:	anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis
C:	citosina
CMF:	citometría de flujo
DE:	desviación estándar
FCS:	<i>Forward Scatter</i>
FITC:	fluoresceína
G:	guanina
HR:	<i>hazard ratio</i>
IC:	intervalo de confianza
IPSS:	índice pronóstico internacional (<i>International Prognosis Score System</i>)
IPSSr:	índice pronóstico internacional revisado (<i>International Prognosis Score System revised</i>)
LMA:	leucemia mieloblástica aguda
MFI:	intensidad media de fluorescencia (<i>Mean Fluorescence Intensity</i>)
MO:	médula ósea
NGS:	secuenciación masiva de nueva generación (<i>next generation sequencing</i>)
NMP:	neoplasia mieloproliferativa crónica
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PE:	ficoeritrina
perCP:	proteína peridininina-clorofila (<i>peridinin chlorophyll protein</i>)
SMD:	síndrome mielodisplásico
SP:	sangre periférica
SSC:	<i>Side scatter</i>
T:	timina

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) constituyen un grupo heterogéneo de entidades clínicas. La citomorfología y la citogenética constituyen el estándar para el estudio de pacientes con sospecha de SMD. Sin embargo, todavía existen dificultades a la hora de establecer el diagnóstico de SMD, sobre todo en muestras con una sola citopenia, y sin exceso de blastos. Las anomalías citogenéticas representan un factor pronóstico fundamental y apoyo a la hora del diagnóstico, aunque sólo existen alteraciones en un 30-50% de los pacientes.

Las nuevas herramientas diagnósticas de las que disponemos en la actualidad (en citometría de flujo y en biología molecular) pueden contribuir no sólo al diagnóstico, sino también al pronóstico en pacientes con SMD.

OBJETIVO

Desarrollar una metodología por citometría de flujo que nos permita realizar el diagnóstico diferencial entre pacientes con SMD y con citopenias de otro origen.

Evaluar la aplicabilidad de la técnica de secuenciación masiva de nueva generación y de alta sensibilidad (NGS) para el diagnóstico molecular y pronóstico de pacientes con SMD.

PACIENTES Y MÉTODO

Para el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo se seleccionaron 55 pacientes diagnosticados de SMD por estudio citológico independiente, y 51 controles con citopenias de diversos orígenes (sobre todo inmunes, hiperesplenismo, toxicidad farmacológica). Basándonos en nuestro esquema habitual de estudio con pacientes con sospecha de SMD, se aplicaron en el análisis las recomendaciones del grupo de trabajo de *European LeukemiaNet*

para evaluar displasia mediante citometría de flujo en las diferentes poblaciones: blastos mieloides, blastos linfoides, serie granulocítica, serie monocítica y serie eritroide. Además, se diseñó una base de datos de maduración mieloides con la herramienta del programa *Infinicyt*[®].

El estudio molecular se realizó con la tecnología de secuenciación masiva de nueva generación (NGS: next generation sequencing) de *Life Technologies*, con el secuenciador *Ion Torrent Proton*[™]. Se estudió el perfil mutacional y la variación del número de copias (CNV) de 106 pacientes con SMD y de 12 controles, mediante secuenciación masiva paralela de 34 genes frecuentemente mutados en patologías mieloides. Se alcanzó una profundidad media de cobertura cercana a 2000. Para la identificación bioinformática de mutaciones y la cuantificación de CNVs se empleó el software *Ion Reporter 4.0* (*Life Technologies*).

RESULTADOS

La aplicación de la recomendación europea de análisis inmunofenotípico en nuestros pacientes y controles, nos permitió establecer parámetros con diferencias entre ambas cohortes: aumento de blastos mieloides, disminución de la fracción correspondiente a blastos linfoides, y la pérdida de complejidad y alteraciones en el patrón de maduración CD11b/CD13/CD16 constituyen las alteraciones más frecuentes en relación con la disgranulopoyesis. La expresión de CD56 en monocitos es un marcador muy útil, excluyendo situaciones de regeneración o inflamación. Nuestro panel de trabajo presenta una limitación en el estudio de serie eritroide.

Utilizamos el “score diagnóstico” para despistaje de diagnóstico en SMD (Ogata y col.), a nuestra serie de pacientes y controles. La ventaja es que los parámetros que utiliza son sencillos de analizar. Una puntuación de 2 o más del “score diagnóstico” fue alcanzada en 29 de los 55 pacientes, y en 2 de los 51 controles. Esto implica una sensibilidad del 53%, con especificidad del 96%, en rango similar a lo publicado.

Evaluamos la herramienta del *Infinicyt*[®] de base de datos de maduración como test diagnóstico para discriminar entre pacientes con SMD y otros con citopenias de origen no clonal, resultando un test diagnóstico fiable. Con una puntuación de 4,5 conseguimos una alta especificidad en el diagnóstico de SMD (100%), aunque con baja sensibilidad (45%). Con una

alta sospecha de SMD (especificidad 90%) podemos considerar pacientes con puntuaciones por encima de 3,5, consiguiendo así mayor sensibilidad (59%).

El número de alteraciones inmunofenotípicas, considerando nuestra puntuación en la base de datos de maduración, se correlacionan con el riesgo pronóstico. Confirmamos que a mayor riesgo, mayor impacto en las desviaciones del patrón normal (media de 3,7 en bajo riesgo; 4,5 en riesgo intermedio; 6,8 en alto riesgo).

En el análisis del perfil mutacional por secuenciación masiva se identificaron un total de 198 variantes puntuales y/o deleciones/inserciones, que consideramos como mutaciones puntuales en 94 de los 106 pacientes (88.7%). Se presentaba, como media, 1,9 variantes/muestra (rango 0-5).

Las mutaciones más frecuentes correspondieron a: *TET2* (32,1%), *SF3B1* (17,9%), *ASXL1* (17%), *DNMT3A* (14,2%), *TP53* (11,3%), *RUNX1* (10,4%), y el resto con frecuencias $\leq 10\%$. En pacientes con SMD de bajo riesgo, los genes más frecuentemente mutados pertenecen a la vía de metilación del DNA (*TET2*, *DNMT3*) y a la de procesamiento del RNA (*SF3B1*, *ZRSR2*). En pacientes considerados como SMD de alto riesgo presentaban mayor proporción de mutaciones en genes de transcripción (*TP53*) y modificadores de cromatina (*ASXL1*). Los pacientes con NMP/SMD acumulaban mutaciones en *TET2*, sobre todo, y proporcionalmente se encontraron mayor número de mutaciones de la vía *RAS*.

Encontramos 5 genes que presentan impacto negativo en la supervivencia global de forma significativa en el análisis univariante en nuestra cohorte: *TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, y *U2AF1*. En el análisis multivariante, considerando además características clínicas significativas al diagnóstico (niveles plaquetas, porcentaje blastos, riesgo citogenético, pronóstico según IPSSr), las mutaciones en *TP53* y *EZH2* permanecen como factores pronósticos para supervivencia global (HR: 6,3, para *TP53*; y HR: 3,5, para *EZH2*).

Teniendo en cuenta los genes cuyo estado mutacional es significativo para supervivencia en nuestra serie *TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, y *U2AF1*, más 2 adicionales descritos también con valor pronóstico (*ASXL1*, *ETV6*), y diseñamos el "score molecular pronóstico". La presencia de alguno de estos genes conlleva disminución de la supervivencia global ($p=0,001$: HR: 3,0).

Aplicamos este “score molecular pronóstico” a los pacientes estratificados en función del riesgo. Así, los pacientes con riesgo bajo presentan una media de supervivencia entorno a 50 meses, en el caso de ausencia de mutaciones de riesgo, frente a una media de 25-35 meses cuando presentan alguna mutación de riesgo. En los grupos de riesgo intermedio y alto, su supervivencia media está entorno a 30 meses, en ausencia de mutaciones de riesgo, frente a 4-15 meses en el caso de presentar mutaciones asociadas a mal pronóstico.

En 85 de los 106 pacientes (80%) se detectaron alteraciones en el número de copias (*copy number variation*: CNV) en al menos 1 de los genes estudiados. Las variaciones del número de copias se encontraron con mayor frecuencia en los siguientes genes: *HRAS* y *ATRX* (en el 41 y 39% de los pacientes, respectivamente), *GATA1* (34%), *SF1* (34%), y *TET2* (27%). Sólo alteraciones en *HRAS* y *GATA1* parecen tener implicaciones pronósticas.

CONCLUSIONES

Las recomendaciones del grupo de trabajo de *European LeukemiaNet* para análisis mediante citometría de flujo en pacientes con sospecha de SMD nos permiten diferenciar a los pacientes con SMD frente a otras citopenias mediante algunos parámetros consistentes.

La base de datos de maduración (utilizando la herramienta de análisis avanzado Maduración del programa *Infinicyt*®) resulta útil como test diagnóstico para discriminar entre pacientes con SMD y otros con citopenias de origen no clonal, resultando ser un test diagnóstico fiable. Según el punto de corte, nos permite diagnosticar un paciente con alta especificidad, o sospechar del diagnóstico (con menor especificidad pero mayor sensibilidad). También presenta implicaciones pronósticas, comprobamos la asociación entre mayor número de alteraciones inmunofenotípicas, y mayor clasificación de riesgo.

Los resultados obtenidos en nuestra serie de pacientes con SMD reproducen las frecuencias de mutaciones publicadas en otras series. Con una técnica de alta profundidad, se detectan mutaciones hasta en el 89% de los pacientes. Encontramos cinco genes en los que el estado mutacional presenta impacto en la supervivencia global (*TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, y *U2AF1*).

Tanto estos genes como adicionalmente otros reconocidos con valor pronóstico (*ASXL1*, *ETV6*) marcan un impacto negativo en la supervivencia, incluso estratificando según grupos de riesgo.

La implicación de las variaciones del número de copias (CNVs) en la oncogénesis, y en particular en la patología hematológica, constituye un campo muy reciente abierto a la investigación.

ABSTRACT

ABSTRACT

BACKGROUND

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clinical entities. Cytomorphology and cytogenetics are standard for the study of patients with suspected MDS. However, there are still difficulties in establishing the diagnosis of MDS, especially in samples with a single cytopenia, without excess blasts. Cytogenetic abnormalities are a key prognostic factor and support at the time of diagnosis, although there are only changes in 30-50% of patients.

Nowadays, new diagnostic tools (flow cytometry and molecular biology) can contribute not only diagnosis but also prognosis in patients with MDS.

OBJECTIVE

Develop a methodology for flow cytometry immunophenotyping that allows us to make the differential diagnosis between MDS patients with cytopenias of other sources.

Evaluate the applicability of the next generation sequencing and high sensitivity (NGS) for molecular diagnosis and prognosis of patients with MDS.

PATIENTS AND METHODS

For immunophenotyping analysis by flow cytometry, 55 patients diagnosed of MDS, and 51 controls with cytopenias of several origins (immune, hypersplenism, drug toxicity) were selected. The recommendations of the working group from the *European LeukemiaNet* were applied to assess dysplasia by flow cytometry in different populations: myeloid blasts, lymphoid blasts, granulocytic, monocytic and erythroid cells. Furthermore, a database was designed for myeloid maturation using the *Infinicyt*[®] software.

The molecular study was carried out with the technology of NGS from *Life Technologies*, the *Ion Torrent Proton*[™] sequencer. Mutational profile and copy number variation (CNV) of 106

MDS patients and 12 controls were studied using massively parallel sequencing of 34 genes frequently mutated in myeloid disorders. An average depth of coverage near 2000 was reached. The software Ion Reporter 4.0 (*Life Technologies*) was used for identifying mutations and quantifying CNVs.

RESULTS

The implementation of the European recommendation for immunophenotyping analysis in our patients and controls, allowed us to establish parameters with differences between both groups: myeloid blasts increased, lymphoid blast decreased, loss of complexity and changes in the myeloid maturation pattern CD11b / CD13 / CD16 are the most frequent alterations in relation to dysgranulopoiesis. The expression of CD56 on monocytes is a useful marker, excluding situations of regeneration or inflammation. Our panel study presents a limitation in the study of erythroid cells.

We apply the "diagnosis score" for MDS screening SMD (Ogata et al.) in our series of patients and controls. The advantage is that their parameters are simple to analyze. A score of 2 or more of the "diagnostic score" was achieved in 29 of the 55 patients, and in 2 of the 51 controls. This means a sensitivity of 53% and specificity of 96%, similar to the previously published data.

Additionally, we evaluated the advanced tool of the software *Infinicyt*[®], the maturation database, as a diagnostic test to discriminate between patients with MDS and other cytopenias of not clonal origin, resulting a reliable diagnostic test. With a score of 4.5, we get a high specificity in the diagnosis of MDS (100%) but low sensitivity (45%). With a high suspicion of MDS (specificity 90%), we can consider patients with scores above 3.5, thus achieving higher sensitivity (59%).

The number of immunophenotypic changes, considering our score in the maturation database, correlate well with risk prognosis. We confirm that the higher the risk, the greater impact on deviations from the normal pattern (average of 3.7 at low risk, intermediate risk 4.5; 6.8 at high risk).

From the analysis of the mutational profile by NGS, a total of 198 variants and/or deletions/

insertions in 94 of 106 patients (88.7%) were identified. On average, 1.9 variants/sample (range 0-5) were found.

The most frequent mutations were for: *TET2* (32.1%), *SF3B1* (17.9%), *ASXL1* (17%), *DNMT3A* (14.2%), *TP53* (11.3%), *RUNX1* (10.4 %), and the remainder had frequencies of $\leq 10\%$. In patients with low-risk MDS, the most frequently mutated genes belong to the pathway of DNA methylation (*TET2*, *DNMT3*) and RNA splicing (*SF3B1*, *ZRSR2*). The patients considered as high-risk MDS had a higher proportion of mutations in gene transcription (*TP53*) and chromatin modifiers (*ASXL1*). Patients with NMP/MDS accumulated mutations in *TET2*, and proportionally, more mutations of the *RAS* pathway were found.

We found 5 genes that have negative impact on overall survival significantly in the univariate analysis in our cohort: *TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, and *U2AF1*. In multivariate analysis, considering also clinical variables significant at diagnosis (platelet levels, blasts percentage, cytogenetic risk, and prognosis according to IPSSr), mutations in *TP53* and *EZH2* remain as prognostic factors for overall survival (HR: 6.3, for *TP53*; and HR: 3.5, for *EZH2*).

Considering genes whose mutation status is significant for survival in our series (*TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, and *U2AF1*), and 2 additional genes with prognostic value also described (*ASXL1*, *ETV6*), we designed the "molecular prognostic score". The presence of any of these genes leads to decreased overall survival ($p = 0.001$; HR: 3.0).

The patients were stratified according to risk, and we applied our "molecular prognostic score". Thus, patients with low risk have a median survival about 50 months in the absence of risk mutations, compared to an average of 25-35 months when any risk mutation is present. In groups of intermediate and high risk, their median survival is around 30 months, in the absence of mutations of risk, compared to 4-15 months in the case of present mutations associated with poor prognosis.

In 85 of the 106 patients (80%), abnormalities in the number of copies (copy number variation: CNV) were detected in at least one of the genes studied. The copy number variations were found most often in the following genes: *HRAS* and *ATRX* (in 41 and 39% of patients, respectively), *GATA1* (34%), *SF1* (34%), and *TET2* (27%). Only changes in *HRAS* and *GATA1* seem to have prognostic implications.

CONCLUSIONS

The recommendations of the working group from the *European LeukemiaNet* for analysis by flow cytometry in patients with suspected MDS allow us to differentiate patients with MDS against other cytopenias with some consistent parameters.

The maturation database (using the advanced tool of maturation analysis from *Infinicyt*[®] software) is useful as a diagnostic test to discriminate between MDS patients and non-clonal cytopenias, proving to be a reliable diagnostic test. According to the cutoff, the test allows us to diagnose a patient with high specificity, or suspected diagnosis (with less specificity but greater sensitivity). Also it has prognostic implications, showing association between greater number of immunophenotypic abnormalities, and increased risk classification.

The results obtained in our series of patients with MDS reproduce frequencies of mutations reported in other series. With a technique of high-depth, mutations are found in up to 89% of patients. We found five genes whose mutation status has impact on overall survival (*TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, and *U2AF1*). Both these genes as further other with recognized prognostic value (*ASXL1*, *ETV6*) mark a negative impact on survival, even after stratifying by risk groups.

The involvement of copy number variations (CNVs) in oncogenesis, particularly in hematologic pathology is a very recent field open to research.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN A LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) constituyen un grupo de heterogéneo de hemopatías clonales caracterizado por hematopoyesis ineficaz con citopenias en sangre periféricas y riesgo de progresión a leucemia mieloblástica aguda (LMA).

Representan una de las neoplasias hematológicas más frecuentes en personas de edad avanzada, con una incidencia anual de 4-5/100.000 habitantes, más alta en varones que en mujeres, y con tendencia a un gradual incremento con la edad (1).

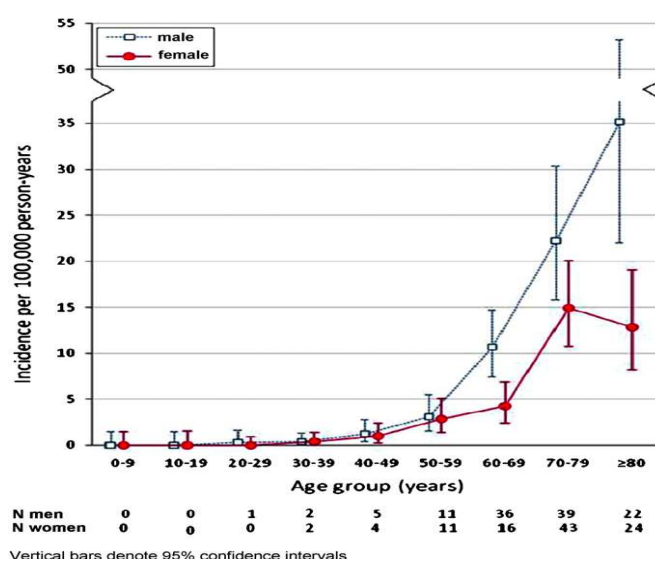


Figura 1.1. Curva de incidencia de SMD según sexo y décadas de edad (1)

Estudios epidemiológicos concluyen que la edad avanzada, género masculino, exposición previa a quimio y/o radioterapia, el tabaquismo, y en casos infrecuentes, la exposición a determinados agentes químicos, son factores de riesgo para SMD (2). También determinados síndromes hereditarios se han relacionado con aumento de presentación de SMD (anemia de Fanconi, ataxia-telangiectasia, etc.) (3).

El compromiso clínico de los pacientes se deriva de las citopenias en sangre periférica que presenten (anemia, trombopenia, leucopenia), junto con las comorbilidades previas que se pueden ver agravadas por esta condición. El manejo terapéutico en SMD es complejo debido, generalmente, a la edad relativamente elevada de los pacientes, junto con comorbilidades no

hematológicas, y la relativa incapacidad de estos pacientes para ser tratados con agentes quimioterápicos, que por otro lado, presentan una eficacia limitada.

Por todo esto, el mayor conocimiento de esta enfermedad, tanto del diagnóstico diferencial frente a otras situaciones no neoplásicas, como de los factores pronósticos, constituye un objetivo importante para poder afrontar el tratamiento de los pacientes de forma correcta, con un balance adecuado entre beneficios aportados y riesgos expuestos.

1.1. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de SMD resulta complejo, debido en gran medida, a que es fundamental descartar otras causas que estén originando citopenias y/o rasgos displásicos en la hematopoyesis, sin constituir una enfermedad clonal. La confirmación es el estudio citológico de sangre periférica y médula ósea, junto con la valoración citogenética, que ayuda no sólo al diagnóstico, sino también, al pronóstico de la enfermedad.

La aproximación diagnóstica se basa en:

HISTORIA CLÍNICA: una correcta anamnesis orientada a buscar síntomas y signos de anemia, sangrados, infecciones de repetición o de gravedad, presencia de organomegalias abdominales. Es importante señalar exposición previa a tóxicos (tanto químicos como farmacológicos), así como antecedentes personales y familiares previos (sobre todo, antecedentes de enfermedades hematológicas congénitas, como anemia de Fanconi, disqueratosis congénita, o ataxia telangiectasia).

ESTUDIOS EN SANGRE PERIFÉRICA: Se considera imprescindible la realización de un hemograma completo, una extensión de sangre periférica con evaluación de 200 células en busca de rasgos displásicos en las tres series, y otras pruebas útiles para el diagnóstico diferencial (vitamina B12, perfil férrico, LDH, eritropoyetina, parámetros de función hepática y renal, serologías víricas, despistaje de autoinmunidad, test de Coombs).

En función de la evaluación, puede requerirse realizar otras pruebas adicionales: estudio de hemoglobinuria paroxística nocturna (en el caso de SMD hipoplásico o datos de hemólisis

intravascular), niveles de testosterona (en sospecha de hipogonadismo), poblaciones linfocitarias (en neutropenias con aumento de linfocitos grandes granulares), PCR para parvovirus B19 (si eritroblastopenia) o para CMV (en pancitopenias).

ESTUDIOS EN MÉDULA ÓSEA: Es imprescindible el estudio de aspirado de médula ósea para análisis citológico y citogenético. La biopsia de médula ósea también es muy útil, sobre todo, en casos de hipoplasia, y/o sospecha de fibrosis.

Estudio citológico de médula ósea. El diagnóstico de SMD se debe realizar sobre unas muestras de calidad (con grumo adecuado) y preparaciones citológicas procesadas de forma correcta, si es posible a partir de muestra sin anticoagulante y en el mismo momento de la extracción. De lo contrario, la morfología celular se puede ver artefactada y no ser valorable.

Generalmente, se realiza una tinción panóptica (habitualmente May-Grünwald-Giemsa, Wright), con la que se evalúan al menos 500 células nucleadas, para recuento de blastos mieloides, y porcentaje de células con rasgos displásicos dentro de s. eritroide, mieloides y megacariocítica. También es imprescindible, una tinción de hierro (Perls) para valorar depósitos medulares de hierro e identificar los sideroblastos en anillo (eritroblastos que contienen al menos cinco gránulos sideróticos ocupando al menos un tercio de la circunferencia del núcleo).

Estudio citogenético. El estudio de citogenética convencional es imprescindible para la evaluación de un paciente con sospecha de SMD, tanto para apoyar el diagnóstico citológico, como para establecer el pronóstico individual. Se analizan al menos 20 metafases en busca de anomalías clonales. El estudio mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) puede ser complementario, sobre todo, en muestras de mala calidad, en las que no se ha logrado un adecuado análisis por la técnica convencional. Sobre todo, las sondas de 5q y 7q son imprescindibles, también se pueden añadir 20q, 17p y cromosoma Y.

Otros estudios adicionales en médula ósea. La citometría de flujo se recomienda, aunque no como prueba imprescindible (4,5), las alteraciones inmunofenotípicas en las poblaciones hematopoyéticas pueden apoyar el diagnóstico de SMD, y la identificación de aberrancias inmunofenotípicas en los blastos ayudan al estudio de EMR en pacientes con tratamientos con intención curativa.

Dentro de los estudios moleculares, existen recomendaciones (4) para la realización de pruebas determinadas en circunstancias concretas: mutación **JAK2** en pacientes con trombocitosis, estudio de los genes **PDGFRA**, **PDGFRB**, y **FGFR1** en casos de eosinofilia, o mutaciones **KIT** en SMD asociado a mastocitosis.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL: La dificultad de establecer el diagnóstico en algunos casos de citopenias persistentes, ha hecho que se establezcan al menos unos criterios mínimos para el mismo, en un documento consenso publicado en 2007 (ver tabla 1.1).

Con unos pre-requisitos, y uno al menos de los criterios decisivos se puede establecer el diagnóstico de SMD. En el caso de sólo existir los pre-requisitos, y no cumplirse ninguno de los criterios decisivos, los co-criterios pueden ayudar a establecer el diagnóstico de “alta sospecha de SMD” (6).

A. CRITERIOS PRE-REQUISITOS

- Citopenia constante en una o más de las siguientes líneas:
 - Eritroide (Hb < 11g/dL)
 - Neutrófila (neutrófilos < 1,5 x 10⁹/L)
 - Megacariocítica (plaquetas < 100 x 10⁹/L)
- Exclusión de otras causas, hematológicas o no, de citopenias y/o displasia

B. CRITERIOS DECISIVOS (RELACIONADOS CON SMD)

- Displasia en al menos 10% de las células de una o más líneas hematopoyéticas de MO
- 5-19% blastos en extensión de MO
- Anomalías cromosómicas típicas, por cariotipo convencional o FISH (del7q, -7, del5q, otras)

C. CO-CRITERIOS (PARA PACIENTES CON A PERO NO B)

- Fenotipo anómalo de MO claramente indicativo de población monoclonal de células eritroides y/o mieloides determinadas por citometría de flujo.
- Datos moleculares de población monoclonal en la técnica HUMARA, perfil génico, o análisis puntual de mutación (mutación RAS).
- Disminución de formación de colonias de médula ósea y/o progenitores circulantes de sangre periférica.

Tabla 1.1. Criterios definidos como pre-requisitos, decisivos o co-criterios en el diagnóstico de SMD.

Además, con todos los datos obtenidos, podremos establecer el diagnóstico diferencial con otras entidades que cursan con rasgos displásicos en una o más series hematológicas, pero que no constituyen SMD (ver tabla 1.2).

<i>Diseritropoyesis no SMD</i>	<i>Disgranulopoyesis no SMD</i>	<i>Dismegacariopoyesis no SMD</i>
Deficiencia de B12/folato Metotrexate y otras quimioterapias Alcohol y otros tóxicos (plomo, oro, zinc, arsénico, benzol) Enfermedades autoinmunes	Deficiencia de B12/folato Regeneración MO tras quimioterapia Tratamiento con factores estimulantes de colonias Infecciones víricas (VIH, parvovirus)	Infecciones (VIH) Quimioterapia Mielofibrosis paraneoplásica Mielofibrosis autoinmune
Anemia aplásica /HPN	Asociada a neoplasia (sd. paraneoplásico) Congénita (anemia Fanconi)	Tras trasplante de MO
Infecciones víricas (VIH, parvovirus) Sd. hemofagocíticos Anemias congénitas diseritropoyéticas	Análogos de las purinas	Proliferación mieoide transitoria (Sd. Down)

Tabla 1.2. Cambios de dishematopoyesis de causa no clonal.
Adaptado de A. Orazi. Pathobiology. 2007 (7).

Para los casos en los que no se pueda establecer el diagnóstico de SMD y tampoco se encuentre causa adicional, se ha definido la entidad **Citopenia Idiopática de Significado Incierto** (ICUS, *Idiopathic cytopenia of undetermined significance*). Se trata de una citopenia persistente de más de 6 meses, sin causa clara atribuible, y que no cumple los criterios de SMD (no alteraciones morfológicas o inferiores al 10%, no anomalías genéticas ni moleculares). En estos casos, se recomienda seguimiento estrecho, y en caso de cambios, repetir MO.

1.1.1 CITOMORFOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE SMD

Es el método diagnóstico estándar. Se basa en el hallazgo de rasgos morfológicos en las tres series hematopoyéticas que nos identifiquen la hemopoyesis ineficaz (8).

Este estudio se realiza en sangre periférica y en médula ósea. Los rasgos morfológicos displásicos más característicos encontrados, tanto en MO como en SP, se resumen en las tablas 1.3 y 1. 4.

Hallazgos morfológicos de displasia en Sangre Periférica		
<i>Hematíes</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Plaquetas</i>
Anisocitosis y poiquilocitosis	Hiposegmentación	Plaquetas agranulares
Macrocitosis	Hipersegmentación	Vacuolización
Eritroblastos circulantes	Degranulación/hipogranulación	Tamaño grande o gigante
Punteado basófilo	Granulación gigante (tipo Chediak-Higashi)	Megacariocitos dismórficos circulantes.
Cuerpos de Howell-Jolly	Núcleos en anillo	Núcleos de megacariocitos
Anillos de Cabot	Otros: cuerpos de Döhle, apéndices nucleares	

Tabla 1. 3. Rasgos displásicos más frecuentes encontrados en sangre periférica

Hallazgos morfológicos de displasia en Médula Ósea		
<i>S. eritroide</i>	<i>S. mieloide</i>	<i>Megacariocitos</i>
Puentes internucleares	Neutrófilos hiposegmentados	Micromegacariocitos
Núcleos de contorno irregular, multinuclearidad	Núcleos pseudo-Pelger	Megacariocitos hipo o monolobulados
Cambios megaloblásticos	Degranulación/hipogranulación	Núcleos en “suelta de globos”
Cariorrexis, mitosis anómalas	Hipergranulación	
Distribución anómala de la cromatina, picnótica	Granulación gigante (tipo Chediak-Higashi)	
Sideroblastos en anillo	Núcleos en anillo, en espejo	
Cuerpos de Howell-Jolly, punteado basófilo	Alteración de la condensación cromatínica (<i>clumping</i>)	
Puentes intercitoplásmicos, vacuolización	Otros: cuerpos de Döhle, apéndices nucleares	

Tabla 1.4. Rasgos displásicos más frecuentes encontrados en médula ósea

Las siguientes figuras (1.2, 1.3, y 1.4) muestran ejemplos de rasgos displásicos que se encuentran en la serie mieloide, eritroide, y megacariocítica, respectivamente.

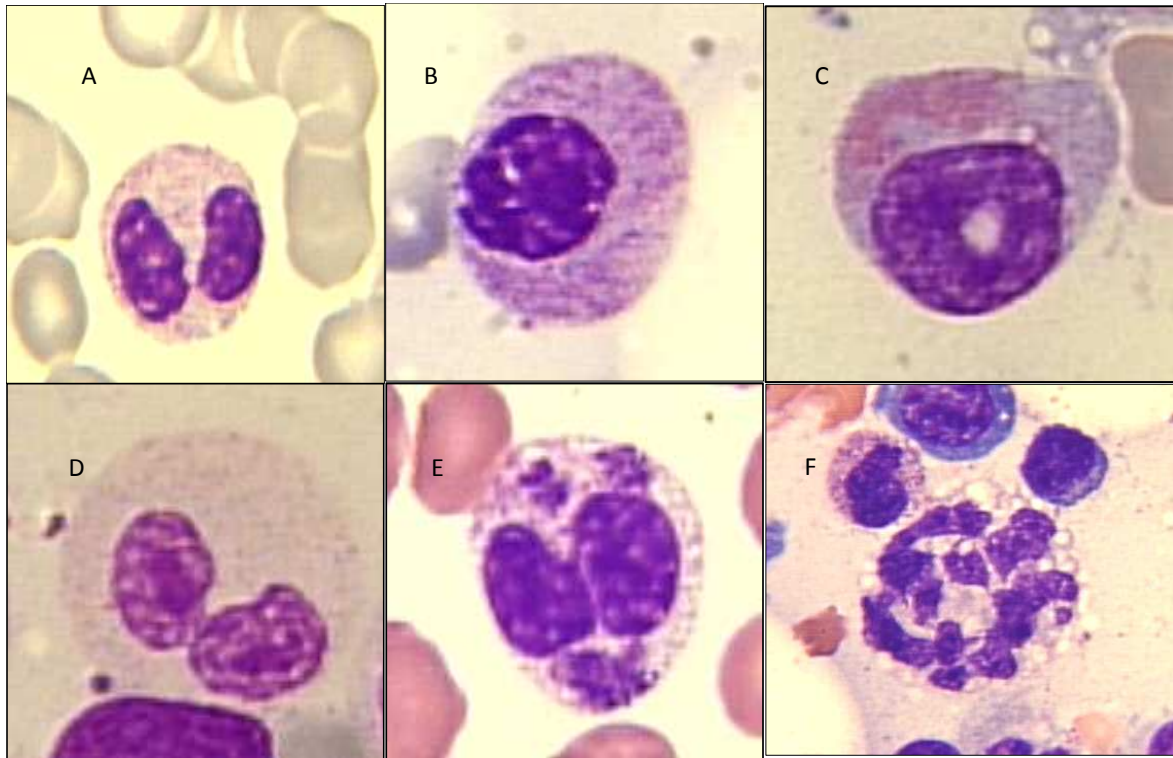


Figura 1.2. Rasgos displásicos en serie mieloide. A y B: hiposegmentación. C: núcleo en anillo. D: hipogranularidad/agranularidad e hiposegmentación (el rasgo más característico de displasia mieloide). E: gránulos gigantes pseudo-Chediak. F: hipersegmentación nuclear.

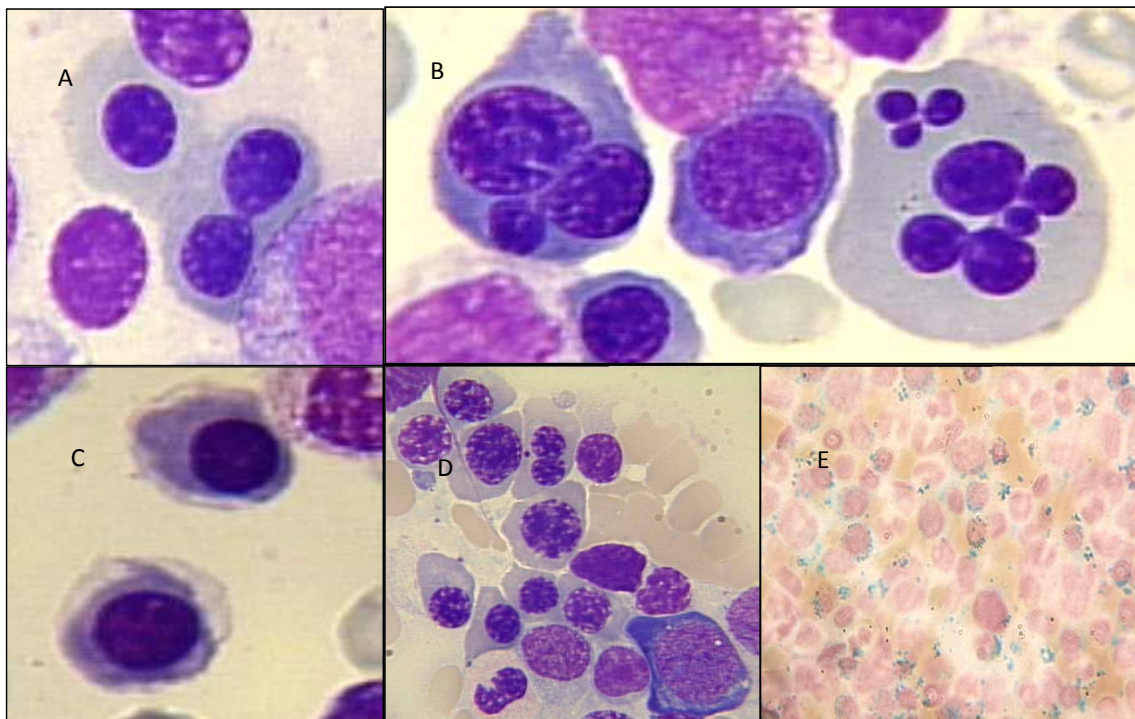


Figura 1.3. Rasgos displásicos en serie eritroide. A: puentes internucleares (el rasgo más característico de displasia eritroide). B: multinuclearidad. C: defecto de hemoglobinización. D: asincronismo madurativo. E: sideroblastos en anillo (tinción de Perls).

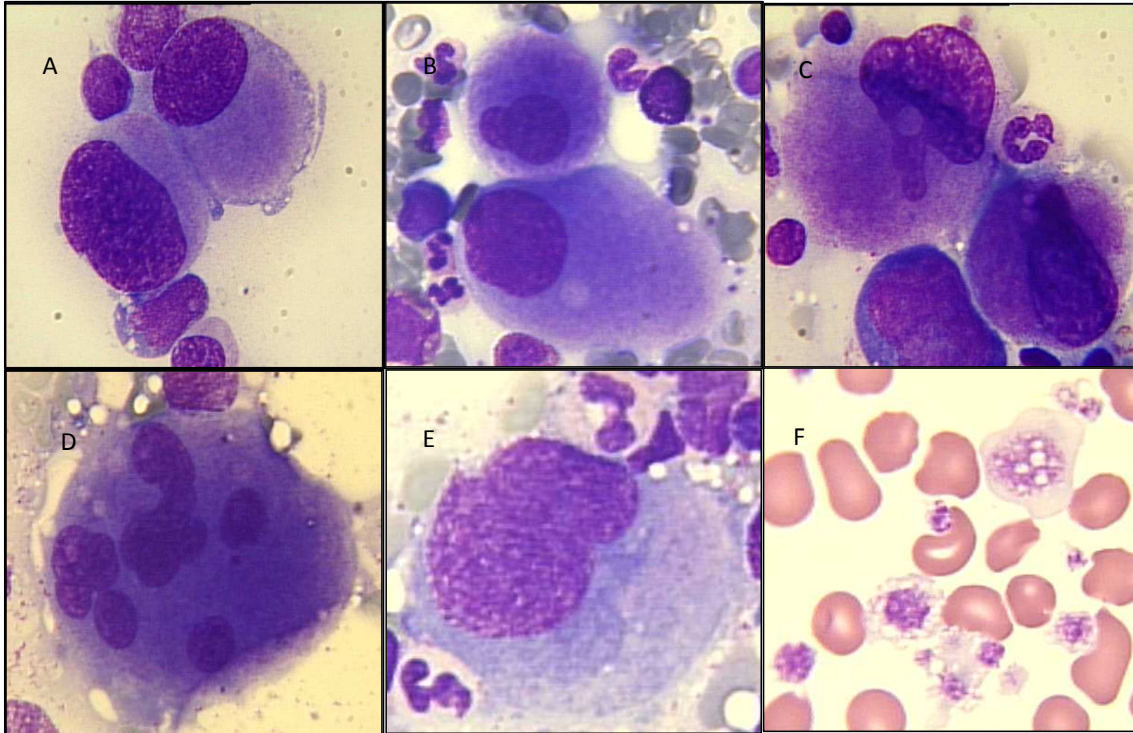


Figura 1.4. Rasgos displásicos en serie megacariocítica. A: micromegacariocitos monolobulados (el signo más característico de displasia megacariocítica). B: megacariocitos mono o bilobulados. C: agrupaciones de megacariocitos. D: núcleos dispersos (“en suelta de globos”). E: citoplasma hialino agranular. F: plaquetas dismórficas: gigantes e hipogranuladas.

1.1.2 CITOGENÉTICA EN EL DIAGNÓSTICO DE SMD

El estudio citogenético es clave en el diagnóstico de pacientes con SMD. Nos permite no sólo establecer un diagnóstico (demostración de clonalidad mediante la detección de alteraciones cromosómicas), sino que también constituye un marcador pronóstico de gran peso en la mayoría de índices pronósticos, y en ocasiones nos sirve para dirigir el tratamiento (como el caso del síndrome 5q menos).

Actualmente, las técnicas estándar en el estudio citogenético son la citogenética convencional y la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Se encuentran alteraciones citogenéticas en el 30-80% pacientes, en función del subtipo de SMD, si es de *novo* o secundario.

Los cromosomas más frecuentemente alterados son el 5, 7 y 8, sumando el 70% de todas las alteraciones. Aunque se puede encontrar gran heterogeneidad en el resto de alteraciones, por lo que ha sido difícil conocer la incidencia exacta de cada una de ellas.

Recientemente, en un estudio cooperativo germano-austriaco, recopilaron el resultado del análisis citogenético de 2027 pacientes. Un 52% de los mismos (1082 pacientes) presentaron alteraciones genéticas clonales, y se lograron identificar hasta un total de 684 alteraciones diferentes (9). Se confirmó la mayor frecuencia de alteraciones en los cromosomas 5, 7, y 8, y a bastante distancia otra larga lista de cromosomas involucrados. Además, determinaron la proporción de estas alteraciones que se presentaba de forma aislada, con una alteración adicional, o en cariotipos complejos (ver figura 1.5).

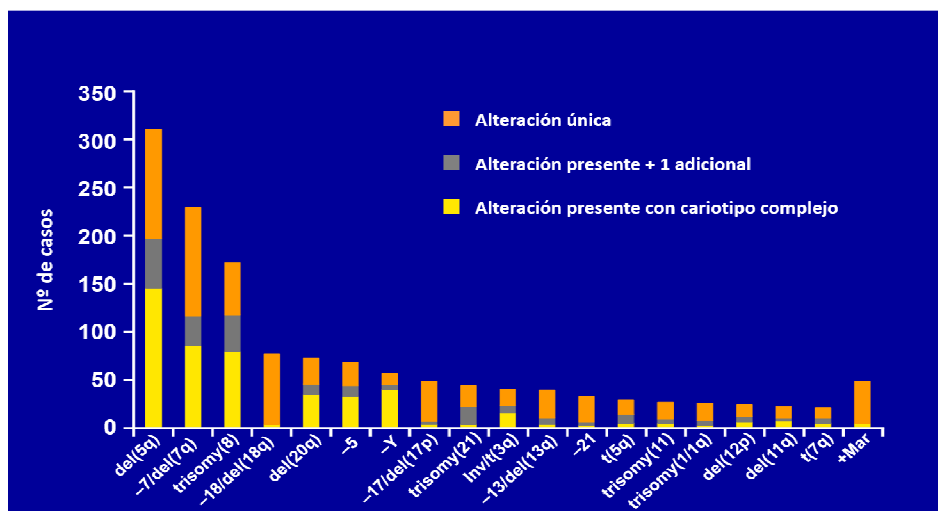


Figura 1.5. Distribución de alteraciones citogenéticas en 2124 pacientes con SMD, destacando si las alteraciones están presentes de forma única o con otras adicionales. Haase D, et al. Blood 2007 (9)

En SMD, las alteraciones genéticas con cambios no balanceados, que implican pérdida de material genético, como deleciones y monosomías del(5q), del(7q), del(12p), del(20q), -7, -Y son más frecuentes que los cambios con ganancia de información, como las trisomías (+8, +11, +21). Además, al contrario de lo que sucede en leucemia mieloide aguda, las alteraciones balanceadas, como translocaciones o inversiones, son muy infrecuentes ($\leq 1\%$ de los casos de SMD) (10). Esto sugiere que la inactivación de genes supresores tumorales es un proceso genético de gran relevancia en la patogénesis de esta enfermedad.

En diferentes trabajos se ha puesto de relevancia el pronóstico adverso que representa la presencia de cariotipos complejos (definidos como la presencia de 3 o más alteraciones citogenéticas) (11, 12). Además, el pronóstico es cada vez más adverso a medida que se suman alteraciones citogenéticas (9). En estos cariotipos complejos, las alteraciones de los cromosomas 5, 7 y la delección de 17p son frecuentes.

Estos cariotipos complejos a veces resultan de evolución clonal, con adquisición de nuevas alteraciones citogenéticas, sobre todo, en pacientes con mayor número de blastos, peor subgrupo morfológico de la OMS y mayor riesgo por IPSS. Estos pacientes tienen menor supervivencia y mayor riesgo de progresión (13).

Aunque también están representados dentro de los cariotipos complejos, casos con una gran inestabilidad genómica, con adquisición rápida de cambios. Recientemente, se ha descrito un mecanismo denominado **chromotripsis**, que también afecta a neoplasias sólidas, que implica reordenamientos genómicos masivos, con incalculables cambios genéticos, tanto a nivel cromosómico visible (traslocaciones no balanceadas, cromosomas en anillo, los llamados “cromosomas Zebra” compuestos de diferentes segmentos de 2 o más cromosomas), como a nivel molecular (amplificaciones de oncogenes) (14).

Dentro de este cuadro complejo de alteraciones citogenéticas, su presencia puede ser de utilidad diagnóstica. Se han considerado algunas de estas alteraciones como sugestivas de SMD, en casos de citopenias sin rasgos claros de displasia por estudio morfológico (tabla 1.5). No se incluyen la del(20q), -Y, y +8. La pérdida de Y se encuentra presente en hasta el 2,5% de la población masculina de más de 60 años, y la del(20q) y +8 pueden hallarse también en otras patologías no SMD (como +8, presente en aplasia y otras citopenias no SMD).

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS RECURRENTES EN SMD	
Alteraciones no balanceadas	Alteraciones balanceadas
-7 o del(7q)	t(11;16)(q23;p13)
-5 o del(5q)	t(1;3)(p36;q21)
i(17q) o del(17p)	t(3;21)(q26;q22)
-13 o del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26)
del(12p) o t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	
Cariotipo complejo (3 o más alteraciones cromosómicas) incluyendo una o más de estas alteraciones.	

Tabla 1.5. Alteraciones cromosómicas recurrentes consideradas como evidencia de SMD en casos de citopenias de significado incierto, sin datos morfológicos concluyentes.

Sin duda, una de las mayores utilidades de la citogenética en SMD, tras esfuerzos de décadas, ha sido la capacidad de establecer grupos de riesgo pronóstico. A medida que se han ido ampliando y unificando bases de datos de pacientes, se ha podido realizar una aproximación cada vez más precisa al significado pronóstico, al menos en de las alteraciones más frecuentes.

La clasificación de estas alteraciones citogenéticas en grupos de riesgo ha sido un trabajo fundamental a la hora de establecer los índices pronósticos. Inicialmente, el IPSS incorporó por primera vez datos citogenéticos a un índice pronóstico (15). Definía tres categorías de riesgo: bajo (cariotipo normal, del(5q) aislada, del(20q), pérdida de Y), intermedio (las alteraciones no incluidas en los otros grupos) y alto (alteraciones en cromosoma 7, cariotipo complejo con 3 o más alteraciones). Esta clasificación genética presentaba algunas limitaciones. El grupo intermedio incluía una gran variedad de alteraciones por exclusión, sin haberse obtenido datos de supervivencia. El número de pacientes analizados (n= 327) no fue suficiente para estimar el impacto pronóstico de otras alteraciones no tan frecuentes. El valor pronóstico de alteraciones dobles no estaba determinado. La puntuación que se otorgaba a las alteraciones genéticas era inferior al peso pronóstico del conteo de blastos dentro del IPSS (10).

Por ello, cuando se planteó la revisión del IPSS, se consideró reevaluar de nuevo el impacto pronóstico de la citogenética. Esta vez, la suma de los registros germano-austriaco, español e internacional, permitió analizar las alteraciones citogenéticas en 2754 pacientes con SMD, describiendo las anomalías más frecuentes, la supervivencia y el impacto pronóstico

asociados a las mismas (ver tabla 1.6). Estos datos sirvieron para establecer nuevos grupos pronósticos en citogenética, que posteriormente se han incorporado al índice pronóstico IPPS revisado (16).

Grupo pronóstico	Nº pacientes (%) (n= 2754)	Alteración única	Alteración doble	Cariotipo complejo	Mediana supervivencia global (meses)
Muy bueno	81 (2.9%)	del(11q) -Y	-	-	60.8
Bueno	1809 (65.7%)	normal del(5q) del(12p) del(20q)	incluyendo del(5q)	-	48.6
Intermedio	529 (19.2%)	del(7q) +8 i(17q) +19 Otros clones independientes	cualquier otra alteración	-	26.0
Malo	148 (5.4%)	inv(3)/t(3q)/ del(3q) -7	Incluyendo -7/del(7q)	3	15.8
Muy malo	187 (6.8%)	-	-	>3	5.9

Tabla 1.6. Nueva revisión citogenética, adaptada de Schanz JCO 2012.

1.2. CLASIFICACIÓN Y PRONÓSTICO

Dada la heterogeneidad de los SMD, se han propuesto clasificaciones en un intento de agrupar aquellos pacientes con características similares, y que al mismo tiempo, permitieran orientar sobre su pronóstico y evolución.

La primera clasificación publicada en 1982 por el grupo cooperativo Francés-Americano-Británico (clasificación FAB), consideró subtipo relacionados con el porcentaje de blastos en sangre periférica y médula ósea (17).

Subtipo	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Sideroblastos en anillo (%)	Monocitos SP ($\times 10^9/L$)
Anemia refractaria (AR)	<1	<5	< 15	< 1
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	<1	<5	> 15	<1
Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)	<5	5-20	Indiferente	<1
Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-T)	≥ 5	21-29 o bastones de Auer	Indiferente	<1
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	<5	Blastos 0-20	Indiferente	>1

Tabla 1.7. Clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) de los SMD

Para esta clasificación, se identificaron 816 pacientes, y se establecieron, según los grupos diagnósticos, la diferente probabilidad de supervivencia global (ver figura 1.6).

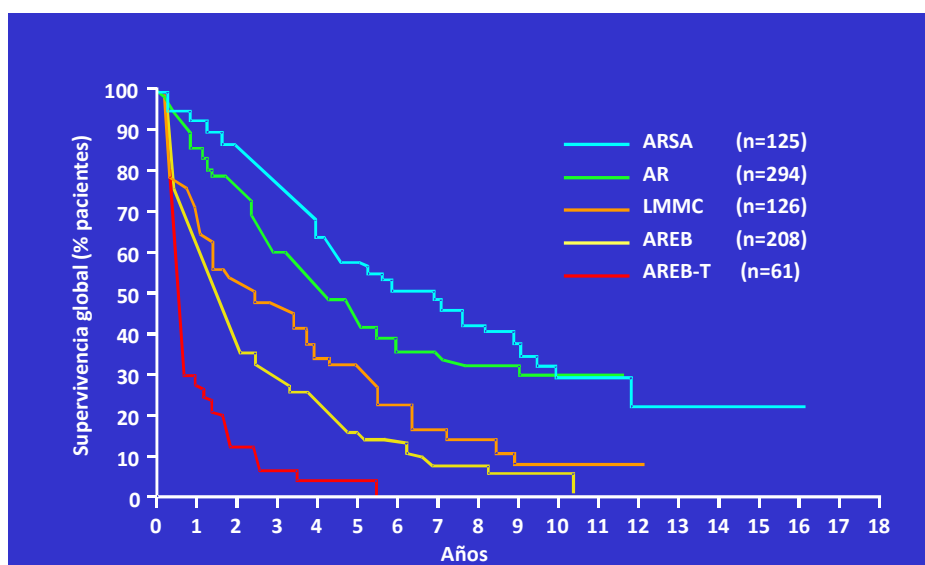


Figura 1.6. Curvas de supervivencia global en función de la clasificación FAB de SMD.

Basándose en parte en estos criterios diagnóstico, en 1997 se publicó un índice de pronóstico internacional (IPSS) que implicaba la asignación de los pacientes en grupos de riesgo, considerando parámetros de supervivencia global y de riesgo de transformación a LMA (15).

Este sistema pronóstico IPSS ha sido aceptado universalmente, es sencillo, predice el curso evolutivo en pacientes sin tratamiento, pero también en los que son sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos o tratados con quimioterapia tipo leucemia aguda. Ha sido ampliamente utilizado tanto en clínica como en investigación hasta ahora.

Parámetro	Puntos					Puntuación	Riesgo	Mediana supervivencia (años)	25% Evolución LAM (años)
	0	0.5	1	1.5	2				
Blastos MO (%)	<5	5-10		11-20	21-30	0	Bajo	5.7	9.4
Citopenias^a	0-1	2-3				0.5-1	Int-1	3.5	3.3
Cariotipo^b	Bueno	Inter-medio	Pobre			1.5-2	Int-2	1.2	1.1
						2.5-3	Alto	0.4	0.2

Tabla 1.8. Sistema pronóstico internacional (IPSS) para SMD

^a Hb < 10 g/dL; Plaquetas < 100 x 10⁹/L; neutrófilos < 1,5 x 10⁹/L

^b *Bueno*: Normal, del(5q), del(20q), -Y

Pobre: anomalías cromosoma 7, cariotipo complejo (≥3 anomalías)

Intermedio: otras anomalías

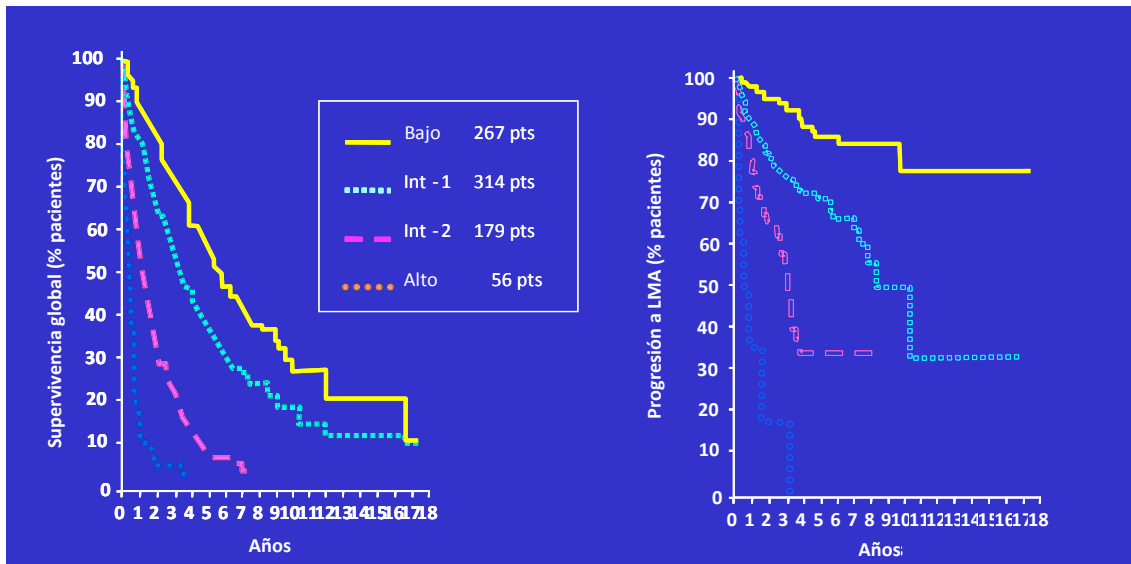


Figura 1.7. Curvas de supervivencia global y riesgo de progresión a leucemia aguda en pacientes con SMD en función de los grupos de riesgo del IPSS.

Sin embargo, el IPSS presenta también diversas limitaciones. Tiene sólo en cuenta el número de citopenias, no la gravedad de las mismas; requiere tener datos de citogenética, no siempre disponibles; y no considera SMD secundarios o LMMC con leucocitosis. Además, no incluye otros factores que han demostrado su valor pronóstico, como dependencia transfusional y sobrecarga férrica, displasia multilineal, o mielofibrosis.

En 2001 se publica **la clasificación de la OMS de los síndromes mielodisplásicos** (18), que presenta las siguientes modificaciones respecto a la FAB.

El diagnóstico de síndrome mielodisplásico puede establecerse con un porcentaje mayor o igual al 10% de células displásicas afectando a una sola línea hematopoyética. Así, se diferencian así las categorías *anemia refractaria* (AR), y *anemia refractaria con sideroblastos en anillo* (ARSA), ambas con afectación única de la serie eritroide, de las *citopenias refractarias con displasia multilineal* (CRDM), con o sin sideroblastos en anillo.

El grupo de *anemia refractaria con exceso de blastos* (AREB) se divide en dos grupos (AREB1 con 5-9% blastos en MO, y AREB2 con 10-19% de blastos).

El umbral para el diagnóstico de leucemia aguda se fija en 20% de blastos, por lo que desaparece la categoría *anemia refractaria con exceso de blastos en transformación* (AREB-T).

La *leucemia mielomonocítica crónica* (LMMC) se reclasifica y pasa a formar parte de los síndromes mieloproliferativos-mielodisplásicos.

Los SMD asociados a la delección 5q constituyen una categoría independiente. También se crea otra nueva entidad, los *SMD inclasificables*, cuando no cumplen criterios para incluirse en otras categorías.

Esta nueva clasificación diagnóstica de la OMS fue utilizada por el grupo italiano de Malcovati et al, quienes diseñaron de un nuevo índice pronóstico dinámico aplicable en cualquier momento de la evolución de la enfermedad (19). Este índice WPSS (WHO *classification-based prognostic scoring system*), incluye dicha clasificación OMS, el cariotipo y los requerimientos transfusionales. Es un modelo con un diseño estadístico y una validación (ver tabla 1.9).

Como inconvenientes, presenta posible variabilidad interobservador en la clasificación morfológica de la OMS, y variabilidad en la definición de dependencia transfusional según los centros.

Parámetro	Puntos				Puntuación	Riesgo	Mediana supervivencia (meses)	Riesgo evolución a LMA
	0	1	2	3				
Categoría OMS	AR, ARSA, 5q-aislado	CRDM	AREB-1	AREB-2	0	Muy bajo	103	<10% a 15 años
Cariotipo^a	Buena	Intermedio	Pobre		1	Bajo	72	10-20% a 5 años
Requerimiento transfusional^b	No	Si			2	Intermedio	40	30-40% a 5 años
					3-4	Alto	21	30% a los 3 años
					5-6	Muy alto	12	50% a 1 año

Tabla 1.9. Sistema pronóstico basado en la clasificación de la OMS (= WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS) para SMD

^a *Buena*: Normal, del(5q), del(20q), -Y

Pobre: anomalías cromosoma 7, cariotipo complejo (≥ 3 anomalías)

Intermedio: otras

^b Al menos una transfusión cada 8 semanas durante un periodo de 4 meses.

Se realiza una revisión de la clasificación OMS en 2008. Esta nueva clasificación presenta algunos cambios con respecto a la primera versión de 2001 (20).

Introduce la categoría *citopenias refractarias con displasia unilineal (CRDU)*, incluyendo también así pacientes con neutropenia y trombopenia refractarias. Hasta 2001, los casos con neutropenia o trombopenia y displasia de una sola línea se consideraban *SMD inclasificable*.

La presencia de sideroblastos en anillo no afecta a la categoría de *citopenias refractarias con displasia multilineal (CRDM)*. Los casos con una sola citopenia y displasia multilineal se clasifican ahora como *CRDM*, previamente se requerían dos o más citopenias.

El conteo de blastos en sangre periférica (<1%, 1%, 2-4%), sin exceso de blastos en médula ósea, modifica la asignación a una u otra categoría.

Subtipo	Hallazgos en sangre	Hallazgos en médula ósea
Citopenias refractarias con displasia unilineal (CRDU) Anemia refractaria (AR); neutropenia refractaria (NR); trombopenia refractaria (TR)	Unicitopenia o bicitopenia ^a No blastos en sangre, o menos del 1% ^b	Displasia unilineal: ≥10% de células con rasgos displásicos en una sola estirpe medular Blastos <5% sideroblastos en anillo <15%
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	Anemia No blastos	Sideroblastos en anillo ≥15% Displasia eritroide exclusivamente Blastos <5%
Citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM)	Una o más citopenias No blastos, o <1% ^b No bastones de Auer monocitos <1 x10 ⁹ /L	Displasia en >10% de las células en dos o más estirpes medulares Blastos <5% No bastones de Auer Sideroblastos en anillo: indiferente
Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1 AREB-1)	Una o más citopenias <5% de blastos ^b No bastones de Auer monocitos <1 x10 ⁹ /L	Displasia uni o multilineal 5-9% blastos ² No bastones de Auer
Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2 (AREB-2)	Una o más citopenias 5-19% de blastos Con o sin bastones de Auer ^c monocitos <1 x10 ⁹ /L	Displasia uni o multilineal 10-19% de blastos Con o sin bastones de Auer ^c
SMD inclasificable (SMD-I)	Citopenias Blastos <1% ^b	Displasia en una o más líneas medulares, <10%, con alteraciones citogenéticas asociadas a SMD (tabla) Blastos < 5%
SMD con delección 5q	Anemia Habitualmente plaquetas normales o elevadas No blastos o <1%	Megacariocitos en número normal o aumentado con núcleo hipobulbado <5% blastos

Tabla 1.10. Clasificación de la OMS 2008

^aOcasionalmente con bicitopenia. Los casos con pancitopenia deben ser clasificados como SMD inclasificable.

^bSi el porcentaje de blastos en médula ósea es <5%, pero hay 2-4% de blastos en sangre periférica, la categoría diagnóstica será AREB 1. Los casos con CRDU o CRDM con 1% de blastos en sangre periférica deben incluirse en los SMD inclasificables.

^cLos casos con bastones de Auer, menos de 5% de blastos en sangre y menos de 10% de blastos en médula ósea deben ser clasificados como AREB 2.

Sin embargo, siguen persistiendo problemas a la hora de realizar el diagnóstico de SMD, sobre todo, cuando la displasia afecta a una sola línea, y no existe exceso de blastos mieloides.

Diferentes trabajos se han orientado hacia la evaluación de la reproductibilidad en el diagnóstico y clasificación de SMD.

Howe y col., revisaron 103 casos por 3 observadores, con una concordancia del 92%, las discrepancias fueron en casos de AR y ARSA (21). Naqvi y col. también analizaron 915 pacientes referidos al MD Anderson desde otros centros con el diagnóstico de SMD. Hubo discrepancias en el 12% de los casos en el diagnóstico referido (22).

Por el contrario, en dos estudios realizados por grupos españoles, coinciden en la alta concordancia encontrada en el diagnóstico de algunas entidades, pero baja en el caso de otras. Así, en una revisión de 100 casos en el que participaron 10 observadores, se encontró alta concordancia en el diagnóstico de AREB1, AREB2 Y CRDM (84%, 90%, y 75%), pero baja en CRDU (40%). Además, el conteo de blastos y del porcentaje de displasia en s. mieloide y megacariocítica era más reproducible que la valoración de la displasia en s. roja (23). En el otro estudio, el grado de concordancia más bajo se encontró en la clasificación de ARSA y AREB1 (24). También se han encontrado problemas de reproductibilidad en el porcentaje de blastos $<0>2\%$, dentro del grupo de pacientes sin exceso de blastos (es decir $<5\%$), con discordancia en el 33% de casos (25).

Se encuentra en marcha un estudio europeo, con participación de 11 expertos de 9 países, que revisaron 100 casos, y están pendientes los datos de la evaluación de la variabilidad entre observadores y el análisis de la precisión del diagnóstico.

Recientemente se ha realizado una revisión del IPSS, el denominado IPSS revisado, con la nueva definición de los subgrupos de riesgo citogenético, así como considerando la profundidad de las citopenias, como aportaciones más novedosas al anterior índice pronóstico (26).

Características	0 puntos	0,5 puntos	1 punto	1,5 puntos	2 puntos	3 puntos	4 puntos
Grupo de riesgo citogenético	Muy bueno		Bueno		Intermed	Pobre	Muy pobre
Blastos de MO (%)	0-2		3-4,9		5-10	>10	
Hemoglobina (g/dl)	≥ 10		8-8,9	<8			
Plaquetas (x10⁹/L)	≥ 100	50-99	<50				
PMN (x10⁹/L)	≥ 0,8	<0,8					

Tabla 1.11. Parámetros establecidos para cálculo del IPSSr.

Grupos de riesgo:

Muy bajo: 0-1,5 puntos; **Bajo:** >1,5-3 puntos; **Intermedio:** >3-4,5 puntos; **Alto:** >4,5-6 puntos; **Muy alto:** <6 puntos.

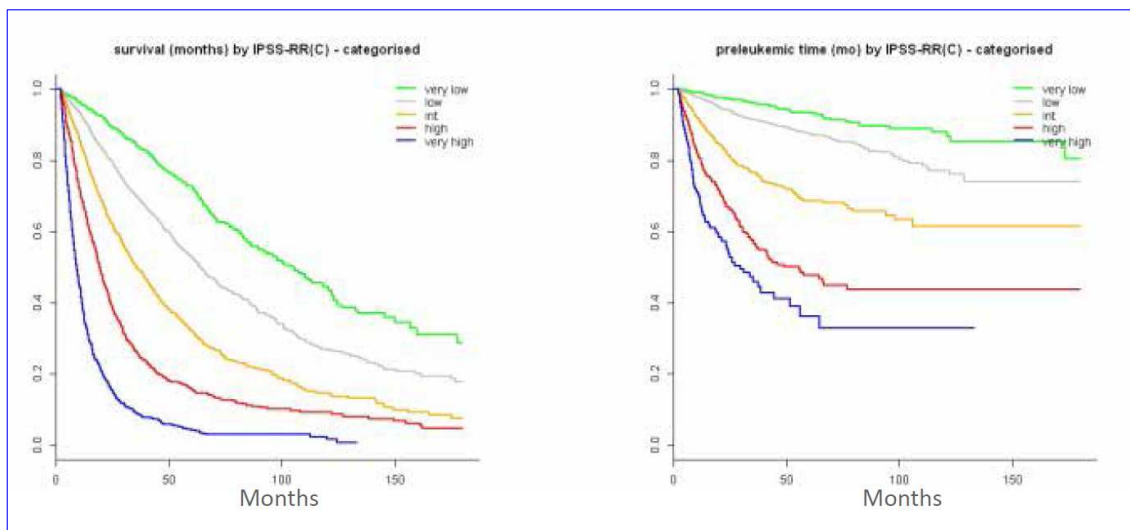


Figura 1.8. Supervivencia global (meses) y tiempo (meses) a transformación leucémica en pacientes con SMD en función del grupo de riesgo del IPSSr.

La importancia de estos sistemas de clasificación es fundamental para determinar la orientación terapéutica en los pacientes. La mayoría de las guías clínicas, y estudios clínicos de investigación, consideran dos grupos de pacientes (bajo y alto riesgo) con diferentes perspectivas pronósticas, y por tanto, con distinto enfoque terapéutico.

A pesar de clasificaciones morfológicas e índices pronósticos, el diagnóstico de SMD sigue constituyendo un reto en una proporción no desdeñable de pacientes, más si consideramos

que alteraciones citogenéticas sólo están presentes en un 30-50% de los SMD de *novo*, y la morfología se queda muchas veces como única arma para establecer un diagnóstico de tanta relevancia clínica y pronóstica, como son los SMD. Se presenta además la dificultad añadida de enfrentarnos a pacientes de edad avanzada en su mayoría, con pluripatología y múltiples fármacos que pueden actuar con factores de confusión en la correcta evaluación de la médula ósea.

La incorporación de nuevas técnicas diagnósticas (citometría de flujo, técnicas de biología molecular) seguramente van a contribuir no sólo a la mejor caracterización de la enfermedad, sino también al mayor conocimiento de su biología, y por tanto, quizá a un futuro tratamiento dirigido.

1.3. CONTRIBUCIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE SMD

Estudios iniciales demostraron la importante contribución de la citometría de flujo (CMF) al diagnóstico de SMD. Stetler-Stevenson y col. (27) estudiaron la sensibilidad de la CMF en la detección de alteraciones inmunofenotípicas en las tres series hematopoyéticas y compararon con la citomorfología. Concluyen que el estudio inmunofenotípico puede contribuir al diagnóstico de SMD, en casos en los que la citología y la genética no son concluyentes. Por su parte, Wells y col. (28) relacionaron el número de alteraciones inmunofenotípicas en la serie mielomonocítica con el riesgo asignado por el IPSS y con la evolución tras trasplante alogénico. Malcovati y col. (29) describieron que las alteraciones encontradas en la serie mieloide y eritroide podían ayudar al diagnóstico de SMD, sin encontrar falsos positivos entre los controles.

La caracterización y descripción de los blastos mieloides en SMD también ha sido objeto de estudio. En un intento de armonizar resultados, se analizó el método más apropiado para el recuento de blastos mieloides por inmunofenotipo (30), y aproximarse más así al recuento citológico. Ogata y col. (31, 32) relacionan la expresión de CD7 en blastos mieloides con peor pronóstico, mientras que en SMD de bajo riesgo, los blastos se caracterizan por expresión aberrante de marcadores con asincronía madurativa (CD10, CD15). No sólo la expresión de CD7, sino también la Tdt (**terminal deoxynucleotidil transferasa**) puede expresarse en blastos mieloides en SMD de alto riesgo (33). La disminución de la fracción de blastos linfoides respecto al total de progenitores en médula es otro de los parámetros que repetidamente se describen en los análisis de SMD por citometría de flujo (34).

Otros grupos enfocaron de forma más global el diagnóstico de SMD. Así, en la extensa revisión de 1055 pacientes con sospecha de SMD realizada por el grupo de MLL Munich Leukemia Laboratory (35, 36), investigaron la concordancia entre las técnicas de citología, citometría, citogenética y molecular en el diagnóstico de SMD. Enfatizaban el valor de un algoritmo diagnóstico integrado, y de la importancia de considerar el estudio inmunofenotípico en este algoritmo.

Se han publicado múltiples estudios describiendo diferentes estrategias y sistemas de puntuación para definir las alteraciones inmunofenotípicas relacionadas con SMD. (37, 38, 39,

40, 41, 42, 43). Sin embargo, la mayoría presentan una serie de características comunes: análisis de la serie granulocítica y monocítica, y de los progenitores mieloides. Alteraciones en la expresión antigénica por aberrancias de intensidad, de asincronía madurativa, de infidelidad de línea, constituyen los parámetros más frecuentes para analizar. Todos estos sistemas de puntuación presentan un rango de sensibilidad entre 65-98% y de especificidad entre 78-93%.

De los primeros sistemas de puntuación fue el descrito por Wells y col. (28), enumeraron las alteraciones mielomonocíticas, y consideraron una puntuación basada en el número de las mismas y en el porcentaje de blastos (*FCSS: flow cytometry score system*), con una sensibilidad 55% y especificidad de 100% cuando se consideraba una puntuación de 3 o más, y de 70% y 93%, respectivamente, cuando el punto de corte era 2 o más.

Otro de los más utilizados, por su fácil aplicabilidad, es el “score diagnóstico” propuesto por Ogata y col. (40), que analiza una serie de parámetros (porcentaje de blastos mieloides CD34 respecto a la celularidad global, porcentaje de blastos linfoides dentro de la población CD34 positiva, la expresión de CD45 de los blastos mieloides en relación con los linfocitos, el valor máximo de la complejidad en los granulocitos en relación con los linfocitos). Una puntuación de 2 o más alteraciones se relaciona con el diagnóstico de SMD con una sensibilidad de 69% y especificidad de 89%.

Menos información todavía hay disponible de la serie eritroide (44), aunque más recientemente se están publicando datos sobre los marcadores expresados por la serie roja (45) y la aplicabilidad del estudio inmunofenotípico en la diseritropoyesis (46). Mathis y col. aplican el “RED score” considerando parámetros de la serie roja (expresión CD71, CD36, y niveles de hemoglobina), y sumándolo al “score diagnóstico” de Ogata, con lo que se aumenta la sensibilidad diagnóstica al 88%.

Se están publicando los primeros resultados de la relación entre alteraciones inmunofenotípicas y respuesta al tratamiento. Westers y col. (47) incorporan al modelo predictivo de respuesta a eritropoyetina (48), la presencia de aberrancias en blastos mieloides por citometría, lo que diferencia un subgrupo de menor probabilidad de respuesta. Alhan y col. relacionan la ausencia de aberrancias en progenitores mieloides con mayor probabilidad de respuesta a azacitidina (49).

Aunque todos los estudios realizados encuentran valor en el análisis inmunofenotípico de poblaciones hematopoyéticas en pacientes con citopenias, el problema relevante ha sido la falta de estandarización de los métodos, y de interpretación de los resultados, salvo alguna aislada experiencia descrita entre centros holandeses (50).

Por ello, se estableció un grupo de trabajo dentro de *European LeukemiaNet* (ELN) con los objetivos de evaluar el papel de la citometría de flujo en el diagnóstico y pronóstico de SMD, discutir el procesamiento correcto de la muestra, proponer un panel consensuado de estudio, y considerar la especificidad del estudio por citometría frente a otras citopenias. Elaboraron un documento extenso y detallado de los procedimientos a seguir y del análisis posterior (51, 52).

Se han publicado unos criterios mínimos para estandarizar el estudio mediante CMF en sospecha de SMD.

<i>Bone marrow subset</i>	<i>Recommended analyses</i>	<i>Aberrancy</i>
Immature myeloid and monocytic progenitors	Percentage of cells in nucleated cell fraction ^a Expression of CD45 Expression of CD34 Expression of CD117 Expression of HLA-DR Expression of CD13 and CD33 Asynchronous expression of CD11b, CD15 Expression of CD5, CD7, CD19, CD56 ^b	Increased percentage Lack of/decreased/increased Lack of/decreased/increased Homogenous under/overexpression Lack of/increased expression Lack of/decreased/increased Presence of mature markers Presence of lineage infidelity markers
Maturing neutrophils	Percentage of cells as ratio to lymphocytes SSC as ratio vs SSC of lymphocytes Relationship of CD13 and CD11b Relationship of CD13 and CD16 Relationship of CD15 and CD10	Decreased Decreased Altered pattern ^c Altered pattern ^c Altered pattern ^c ; for example, lack of CD10 on mature neutrophils
Monocytes	Percentage of cells Distribution of maturation stages Relationship of HLA-DR and CD11b Relationship of CD36 and CD14 Expression of CD13 and CD33 Expression of CD56 ^b	Decreased/increased Shift towards immature Altered pattern ^c Altered pattern ^c (Homogenous) under/overexpression Presence of lineage infidelity marker
Progenitor B cells	Enumeration as fraction of total CD34+ based on CD45/CD34/SSC in combination with CD10 or CD19	Decreased or absent
Erythroid compartment ^d	Percentage of nucleated erythroid cells Relationship CD71 and CD235a Expression of CD71 Expression of CD36 Percentage of CD117-positive precursors	Increased Altered pattern ^c Decreased Decreased Increased

Tabla 1.12. Recomendaciones del grupo trabajo de ELN para análisis de displasia por citometría de flujo

Son necesarios estudios prospectivos para su validación y evaluar el peso específico de cada uno de estos criterios (52).

Su aplicabilidad clínica en el diagnóstico debe ser evaluada, no sólo en sujetos sanos como se ha hecho hasta ahora, sino también en sujetos de características clínicas similares (edad, comorbilidades, pluritratados, etc), con citopenias no clonales o en situaciones clínicas particulares (infección, regeneración medular, etc.).

1.4. CONTRIBUCIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LOS SMD

Como hemos comentado anteriormente, las alteraciones citogenéticas sólo están presentes en un 30-50% de los pacientes con SMD de novo, alcanzando hasta el 80% en los SMD secundarios. Sin embargo, con las nuevas técnicas de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS) se tiene la capacidad de secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela con menor coste. Se han determinado la presencia de mutaciones somáticas (mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones) en más del 70-80% de los pacientes, e igual que sucedía con las alteraciones citogenéticas, caracterizándose por una gran heterogenicidad.

Los genes más frecuentemente mutados, pueden agruparse en vías funcionales: metilación ADN, factores de transcripción, procesamiento del ARN, modificadores de cromatina, citoquinas de señalización (figura 1.9.)

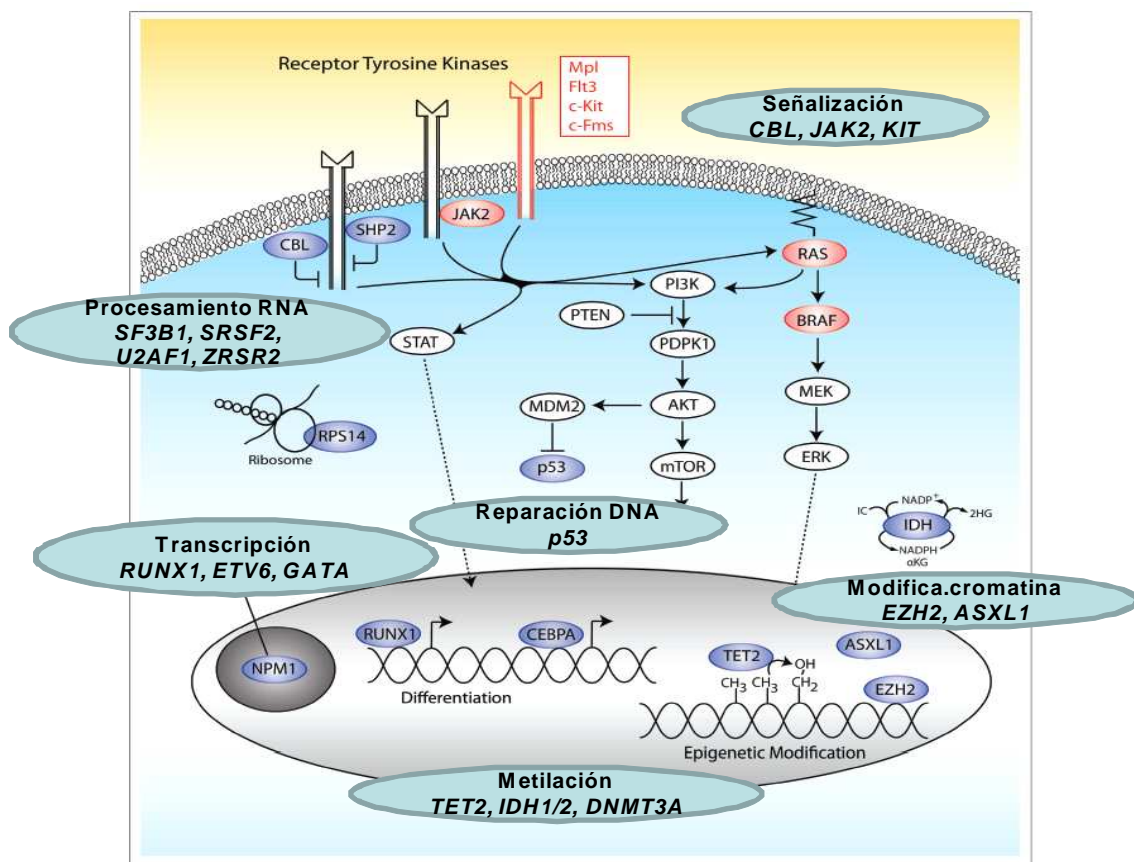


Figura 1.9. Vías celulares funcionales y genes implicados (adaptado de *Bejar. N Eng J Med.2011*)

Mutaciones en genes de la vía de metilación de DNA

Las alteraciones en la vía de la metilación del DNA se han relacionado con la patogénesis de los SMD, debido a las observaciones de que el patrón de metilación de los residuos de citosina en las secuencias CpG son diferentes entre médulas de pacientes y médulas normales (53). Genes implicados en esta vía (*TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*) se encuentran frecuentemente mutados en SMD.

TET2 pertenece a la familia de oncogenes *TET* que son clave para la hidroxilación de los residuos de citosina metilada. Mutaciones somáticas en *TET2* se encuentran en más del 20% de los pacientes con SMD, y en 30-60% de LMMC. Implican pérdida de función e incremento del patrón de metilación (54). A pesar de la alta frecuencia de mutaciones, su significado clínico y patogénesis no se ha definido claramente. Dos estudios confirmaron la ausencia de impacto en la supervivencia de las mutaciones de *TET2* (55, 56), sin embargo Kosmider y col. encontraron que los pacientes con SMD y *TET2* no mutado presentaban 4 veces más riesgo de muerte que los que tenían la mutación, independientemente de la clasificación OMS (57).

El gen *DNMT3A* codifica una ADN-metiltransferasa, interviniendo así en el control epigenético y la expresión génica. Las mutaciones en este gen fueron inicialmente descritas en LMA, donde afectan al 20-50% de los pacientes, asociándose con un perfil de riesgo citogenético intermedio (58). En cambio, en SMD se han descrito en menos del 10% de los pacientes. Las mutaciones en *DNMT3A* implican pérdida de función, y probablemente se traten de un evento secundario asociado a progresión (59). De hecho, se han asociado con un curso clínico más agresivo, disminución de supervivencia y aumento de la frecuencia de transformación leucémica (60).

Los genes *IDH1* e *IDH2* codifican isoformas (la primera del citoplasma y la segunda mitocondrial) de una enzima que participa en el ciclo de Krebs. Inicialmente, mutaciones de estos genes fueron descritas en gliomas, y posteriormente en patología mieloide (SMD, NMP, LMA). En SMD, se han descrito mutaciones heterocigotas y mutuamente excluyentes de *IDH1/IDH2* en menos del 10% de los pacientes. Estas mutaciones implican pérdida de función, afectan a la actividad de *TET2* y conducen a un aumento de metilación, con pérdida de la capacidad de diferenciación hematopoyética (61). Se han relacionado las mutaciones de *IDH1* con peor supervivencia y mayor riesgo de transformación a leucemia (62), así como con edad

más elevada, mayores recuentos plaquetarios, y mutaciones en *DNMT3A*, *SRSF2*, y *ASXL1* (63). Estudios secuenciales en 151 pacientes demostraron que las mutaciones de *IDH* permanecen estables durante la evolución de la enfermedad, y ninguna fue adquirida durante el seguimiento, por lo que parece tener un papel en el desarrollo de la enfermedad, pero no en la progresión (63).

Mutaciones en genes modificadores de la cromatina

El gen ***ASXL1*** pertenece a una familia comprometida con la regulación epigenética de la expresión génica a través del mantenimiento de la estructura de la cromatina. Las mutaciones suelen implicar pérdida de función, lo que permite mantener la activación de la transcripción. Inicialmente, se describieron mutaciones en *ASXL1* en un 10-15% de los SMD, y en alrededor del 40% de las LMMC (64). Posteriormente, se han ido confirmando estas frecuencias, y además la presencia de estas mutaciones se ha asociado con una supervivencia inferior en pacientes con SMD de bajo y alto riesgo (55, 65) y aumento de riesgo de transformación leucémica en LMMC (66).

EZH2 es responsable de la metilación de histonas. Aunque se ha descrito una ganancia de función en linfoma folicular y linfoma B difuso de célula grande subtipo centro-germinal, en las mutaciones en SMD predomina la pérdida de función. La prevalencia en SMD varía 5-10%, aproximadamente (67). Las mutaciones de *EZH2* tienen pronóstico desfavorable en SMD de alto y bajo riesgo, y se han asociado con progresión a leucemia (68).

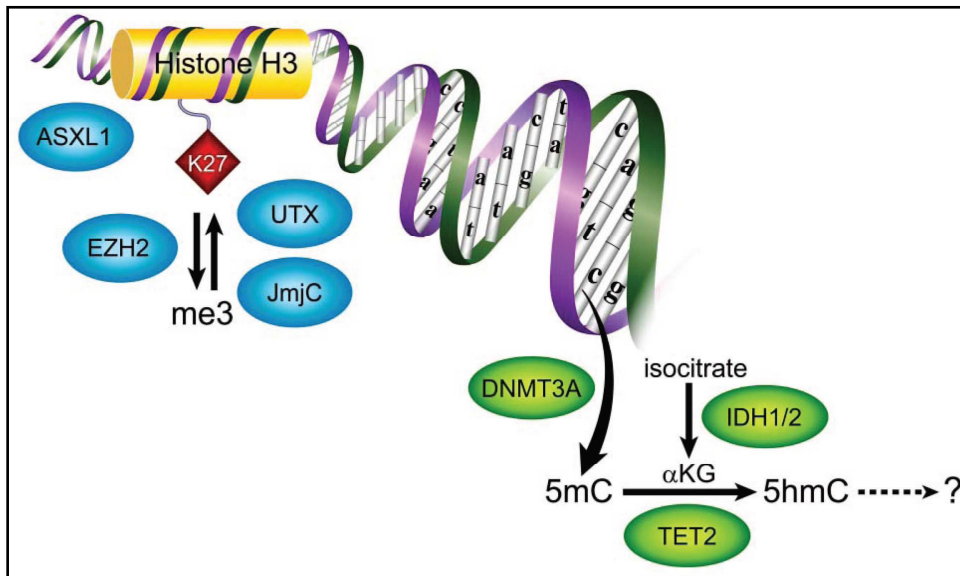


Figura 1.10. Esquema de la participación de los genes de metilación y modificadores de la cromatina en la regulación epigenética (extraído de Graubert 2011).

Mutaciones en genes del procesamiento RNA

En SMD se han descrito mutaciones en genes implicados en el procesamiento del RNA mensajero (*splicing*), por el que se eliminan los intrones del pre-RNA_m y se genera el RNA mensajero maduro que forma complejo con el RNA ribosomal. Estas mutaciones conducen a alteraciones no bien conocidas que contribuyen a ganancias o pérdidas de función de estos genes, según los casos, con diferente impacto en las funciones celulares. Con una alta frecuencia, más del 20-50% de los casos, genes implicados en el procesamiento del RNA se han visto mutados en pacientes con SMD, además de una forma mutuamente excluyente (69). Las mutaciones en estos genes pueden alterar la capacidad de las células para diferenciarse en formas maduras, produciendo el fenotipo de displasia celular (59).

Las mutaciones en el gen **SF3B1** constituyen las más frecuentes de las observadas en este grupo de genes, entorno al 20-25% de los SMD. Se ha descrito una estrecha relación con la presencia de sideroblastos en anillo, encontrándose mutaciones con una frecuencia entre 65-81% en los SMD con sideroblastos en anillo (70, 71, 72). Se han relacionado con mejor supervivencia y menor incidencia de transformación a leucemia (70, 71, 72, 73), aunque no es consistente en todos los estudios (74, 75), e incluso parecen demostrar que el buen pronóstico se debe al subgrupo morfológico más que a la mutación *SF3B1* (76).

El gen **SRSF2** también está involucrado en el procesamiento del pre-RNA mensajero, y las mutaciones se han descrito entorno al 10-15% de los pacientes con SMD. Se han relacionado con edad avanzada, en el 85% de los casos se asocia a otra mutación, sobre todo *RUNX1*, *IDH2*, y *ASXL1*, y se mantiene estable a lo largo de la evolución, sin que se vea implicación en casos de progresión (77). Varios estudios han demostrado inferior supervivencia en los pacientes mutados (77, 74, 78), aunque también hay datos que no lo confirman (56).

U2AF1 es la subunidad más pequeña del gen *U2AF*, y forma un dímero con *U2AF2* que prácticamente no se ha descrito mutado en SMD. Las mutaciones de *U2AF1* se han detectado en 5-10% de los SMD, con mayor prevalencia en pacientes con alteraciones del cromosoma 20q y con mutaciones *ASXL1* (75). En cuanto a su impacto pronóstico, hay estudios contradictorios. En unos casos no se ha demostrado impacto en la supervivencia (74, 75), en otros en cambio parece asociarse con peor supervivencia y mayor riesgo de progresión a leucemia (53, 79).

ZRSR2 codifica una proteína asociado al U2 heterodímero. La incidencia de mutaciones en SMD es baja (menos del 5%). Se han descrito asociadas a SMD de riesgo intermedio-1 y -2, con mayor porcentaje de blastos y neutropenia (75), demostrándose impacto en la supervivencia global y mayor riesgo de transformación a leucemia cuando se asocia a *TET2* no mutado (75), mientras que Thol y col. en el análisis multivariante no han conseguido ver ese impacto (74).

Otros genes como *PRPF40B*, *SF1*, *SF3A1*, *U2AF2* y *PRPF8* también pertenecen a la vía del procesamiento de RNA, y se han descrito mutaciones en menos del 2% de los pacientes con SMD.

Mutaciones en genes relacionados con factores de transcripción

El gen **RUNX1**, también denominado AML1, codifica un factor de transcripción que está implicado en la regulación de la diferenciación mieloide. Se han descrito mutaciones en un 10-20% de los SMD (55). Con mayor frecuencia se encuentra en SMD relacionados con el tratamiento y asociados a pérdida del 7q (80) y en SMD de alto riesgo (81, 82).

TP53 es un gen supresor de tumores, su producto *p53* contribuye a la reparación del ADN tras una situación de estrés celular. Mutaciones en **TP53** se encuentran en un 5-10% de los SMD, y están estrechamente relacionadas con la presencia de cariotipo complejo, incluyendo pérdida 17p, enfermedad avanzada y pronóstico adverso después de considerar el riesgo por IPSS (83, 55). Incluso en pacientes tratados con azacitidina, aunque las mutaciones de **TP53** no afectan al índice de respuestas, en el análisis multivariante el estado mutacional en **TP53** constituyó el único factor significativo para la supervivencia (HR: 2.89) (84). También se ha descrito la presencia de mutaciones de **TP53** en el 18% de pacientes con síndrome 5q y menos de 5% de blastos, en estadios ya iniciales de la enfermedad, contribuyendo a un peor pronóstico por incremento del riesgo de transformación a leucemia (85, 69).

El gen **ETV6** codifica un factor de transcripción con un papel fundamental en la hematopoyesis. Las mutaciones somáticas en SMD y LMMC parecen asociadas con mal pronóstico (HR: 2.04) (55, 86) y con alteraciones en el cromosoma 7 (87).

Mutaciones en genes relacionados con señales de transducción y receptores quinasa

Las mutaciones en genes que codifican tirosinas quinasa son frecuentes en patología mieloide, pero en SMD sólo en un 5-10% de los pacientes.

El gen **JAK2** pertenece a la familia de quinasa *Janus*, y participa en diferentes vías de señalización en la hematopoyesis. Sobre todo, se ha descrito una mutación con efecto de activación (cambio de valina por fenilalanina en posición 617) en NMP *bcr-abl* negativo (88), en síndromes mixtos NMP/SMD, como ARSA-T (89) y en un grupo de MDS con 5q menos con

médula hiperclonal (90). En el resto de SMD, la mutación está presente en menos del 5% de pacientes, y podría asociarse con menor incidencia de transformación a leucemia (91).

El producto del gen **CBL** es una proteína con actividad ligasa que actúa como regulador negativo de las señales de los receptores tirosín quinasa favoreciendo la oncogénesis (92). El gen se ha descrito mutado en el 15% de las LMMC, en la leucemia mielomonocítica juvenil, pero en baja frecuencia en el resto de SMD (93, 94).

Las duplicaciones internas en tándem en el gen **FLT3** son infrecuentes en SMD, menos del 5%, excepto en enfermedad avanzada y en LMA relacionada con cambios mielodisplásicos (95). Su significado pronóstico en SMD no está claramente definido. Según los estudios de Shih y col. encontraron mayor riesgo de transformación a leucemia y menor supervivencia (96), pero Daver y col. en SMD y LMMC no encontraron significado pronóstico en supervivencia (97).

Los genes **NRAS**, **KRAS** y **HRAS** pertenecen a la familia *RAS*, y codifican proteínas que participan en la regulación de la proliferación y supervivencia celular, así como en la diferenciación (98). Las mutaciones descritas en estos genes confieren activación de estas vías. Con mayor frecuencia se han encontrado en SMD mutaciones de NRAS, entorno a un 10%, y menos de KRAS, menos del 5% (55). En general, parece que NRAS confiere mal pronóstico, con mayor probabilidad de transformación a leucemia (99), aunque no se ha confirmado en todos los estudios (55).

Mutaciones y relación con tratamientos

La relación entre la presencia de mutaciones somáticas en pacientes con SMD y respuesta a tratamientos ha sido investigada por algunos grupos. Itzykson y col. observaron que pacientes con SMD y LMA 20-30% blastos presentaban mayor tasa de respuestas a azacitidina cuando *TET2* estaba mutado versus no mutado (100). Sin embargo, esto no se traducía posteriormente en mayor supervivencia en el grupo con *TET2* mutado. Bejar y col. confirmaron también que *TET2* mutado se asociaba con mayor índice de respuestas a hipometilantes (azacitidina y decitabina) cuando *ASXL1* a su vez no estaba mutado (101). En el mismo estudio, observaron que mutaciones en *TP53* se relacionaban con menor supervivencia, aunque no predecía la respuesta al tratamiento. Traina y col. concluyeron en un estudio con 96 pacientes tratados

también con hipometilantes que *TET2* mutado y/o *DNMT3A* mutado eran predictores independientes de mejor respuesta (102).

En pacientes con síndrome 5q, la mutación de *TP53* no se ha relacionado con peor respuesta en cuanto a la independencia transfusional, pero sí con menor índice de respuestas citogenéticas, mayor riesgo de progresión a leucemia y menor supervivencia (103).

En cuanto al efecto en el seno de otros tratamientos, también la presencia de *TP53*, *TET2* y *DNMT3A* se asociaron con menor supervivencia tras trasplante alogénico, supervivencia a los 3 años del 19% frente a 59% en aquellos que no tenían ninguna de estas mutaciones (104). Similares resultados han sido confirmados por otro grupo, encontrando una supervivencia global a los 3 años del trasplante del 18% en pacientes que presentaban mutación en *TP53* o en *TET2* frente al 61% en aquellos sin mutaciones (105).

Mutaciones en SMD secundarios

Las mutaciones descritas en SMD de novo y secundario son similares, aunque las frecuencias varían. Así, mutaciones en *TP53* se encuentran presentes en un mayor porcentaje en SMD relacionados con el tratamiento (25-30%) (106). También *RUNX1* y *NRAS/KRAS* son frecuentes en MDS relacionados con el tratamiento (15-30% y 10-12%, respectivamente) (95).

Recientemente, el estudio molecular de 70 pacientes con SMD/LMA relacionados con el tratamiento fue comparado con el de 428 pacientes con SMD/LMA de novo. *TP53* fue el gen más frecuentemente mutado en SMD secundario (36%), sensiblemente superior a la frecuencia encontrada en SMD de novo (18%) (107).

La tabla 1.13. resume las características de los genes más relevantes por vías funcionales, (adaptado de *Pellagati 2015* (108), y *Zhang 2015* (109)).

Gen	Locus	Función proteína	Mutación y efecto	Pronóstico	Frecuencia
Metilación DNA					
TET2	4q24	Dioxigenasa en la vía metilación	Pérdida de función	Desconocido ¿Favorable?	20-25%
DNMT3A	2p23.3	Metiltransferasa en la vía metilación	Función alterada	Adverso	~10%
IDH1/2	2q33.3/1 5q26.1	Dehidrogenasa que regula TET2	Pérdida de función	Adverso	5-10%
Procesamiento RNA					
SF3B1	2q33.1	Factor regulación en procesamiento RNA	Desconocido	Favorable	20-28% ARSA >70%
SRSF2	17q25.1	Factor del complejo procesamiento RNA	Desconocido	Adverso	10-15%
U2AF1	21q22.3	Factor del complejo procesamiento RNA	Desconocido	Desconocido	<10%
ZRSR2	Xp22.1	Factor del complejo procesamiento RNA	Desconocido	Desconocido	<10%
Modificación de proteínas de cromatina					
ASXL1	20q11.2	Regula la metilación histona H3	Pérdida de función	Adverso	10-20%
EZH2	7q36.1	Relacionada con la supresión metilación	Pérdida de función	Adverso	5-10%
ATRX	Xq21.1	Regula estructura de la cromatina			<1%
Factores de transcripción					
TP53	17p13	Gen supresor, reparación DNA	Pérdida de función	Adverso	5-10%
RUNX1	21q22	Regulación de la diferenciación mieloide	Ganancia de función	Adverso	10-15%
ETV6	12p13.2	Factor transcripción hematopoyesis	Pérdida de función	Adverso	<5%
GATA1	Xp11.23	Regulación de la diferenciación eritroide			<5%
Señal transducción, receptores quinastas					
JAK2	9p24.1	Activación tirosín quinasa	Ganancia de función	Desconocido	<10% ARSA-T 50%
FLT3	13q12	Receptor tirosín-quinasa, regula hematopoyesis	Desconocido	Desconocido	<5%
CBL	11q23.3	Regulador negativo de la transducción	Ganancia de función	Adverso (NMP/SMD)	<5% LMMC>15% %
KIT	4q11q12	Receptor tirosín-quinasa	Ganancia de función	Desconocido	<5%
MPL	1p34.2	Receptor trombopoyetina	Ganancia de función		<5%
NRAS	1p13.2	Transductor señal GTPasa, ciclo celular	Ganancia de función	Adverso	<10%
KRAS	12p12.1	Transductor señal GTPasa, ciclo celular	Ganancia de función	Adverso	<5%

Tabla 1.13. Vías celulares y genes frecuentemente mutados en SMD

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La citomorfología y la citogenética constituyen el estándar para el diagnóstico de pacientes con sospecha de SMD. Sin embargo, todavía existen dificultades a la hora de establecer el diagnóstico de SMD, sobre todo en muestras con una sola citopenia, y sin exceso de blastos.

Las nuevas herramientas diagnósticas de las que disponemos en la actualidad (en citometría de flujo y en biología molecular) pueden establecer el correcto diagnóstico de SMD y estratificar el riesgo de los pacientes.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Desarrollar una metodología por citometría de flujo que nos permita realizar el diagnóstico diferencial entre pacientes con SMD y paciente con citopenias de otro origen.

Para ello, utilizaremos las siguientes herramientas diagnósticas en un grupo de muestras de pacientes y controles:

- El análisis por citometría de flujo de rasgos displásicos en las series hematopoyéticas siguiendo las recomendaciones del grupo de trabajo de la *European Leukemia Net* y comprobar qué parámetros pueden ser de mayor utilidad.
- La aplicabilidad del "score diagnóstico" de Ogata y colaboradores, publicado para despistaje de SMD por citometría, en nuestra población de muestras.
- La evaluación como test diagnóstico de una base de datos de maduración con la herramienta avanzada de Maduración del programa *Infinicyt*[®], y su capacidad de discriminar pacientes y controles.

2.2.2. Evaluar la utilidad de la técnica de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) y de alta sensibilidad para el diagnóstico molecular y pronóstico de pacientes con SMD.

Para ello, analizaremos:

- La aplicabilidad del método de secuenciación masiva de nueva generación para el diagnóstico molecular en pacientes con SMD.
- La asociación entre perfil mutacional y características clínicas de los pacientes.
- El significado pronóstico del perfil mutacional.
- El impacto del perfil mutacional asociado a índices pronósticos habituales en SMD (IPSSr).
- La descripción de las variaciones del número de copias (CNVs) por NGS en pacientes con SMD y sus posibles implicaciones clínicas y pronósticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES Y CONTROLES

Se han estudiado pacientes con citopenias y sospecha de SMD, a los que se les solicitó un aspirado de médula ósea para el diagnóstico. Se fueron incluyendo los pacientes de forma consecutiva entre febrero 2012 y mayo 2015.

El ámbito de estudio es el servicio de Hematología del hospital 12 de Octubre.

Las muestras remitidas a la sección de Citometría de Flujo y de Biología Molecular se encuentran dentro del protocolo habitual de estudio diagnóstico para pacientes con citopenias y/o sospecha de SMD que son remitidos al servicio de Hematología. Todos los pacientes firman el consentimiento informado durante el procedimiento para que la muestra restante del aspirado sea almacenada en el Biobanco del 12 de Octubre y utilizada de forma anónima para fines de investigación.

El diagnóstico de SMD se realizó en base al informe citológico, que fue realizado por un observador independiente al estudio, que desconocía los datos del estudio de CMF, aunque sí disponía de los datos clínicos y analíticos del paciente. El estudio por CMF se realizó de forma paralela, sin conocer a su vez los resultados del estudio morfológico ni citogenético.

Para el análisis por citometría de flujo se seleccionaron, de forma consecutiva, 55 casos con diagnóstico de SMD (**pacientes**) y 51 casos con citopenias de otros orígenes (**controles**).

Se clasificaron como **pacientes** cuando se diagnosticaron en base al estudio citológico de SMD según criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2008). Los pacientes presentaban una edad media de 75 años (rango 56-90 años), predominio de varones (37/28), una media de 1,4 citopenias por paciente, y de 5,6% de blastos en médula ósea. La representación de los diferentes subgrupos de la OMS se encontraba equilibrada, según proporciones habituales, dado que los pacientes fueron entrando de forma consecutiva sin selección.

Se definieron como **controles** cuando presentaban al menos una citopenia de origen no clonal. No cumplían los criterios suficientes para diagnóstico de SMD, y además presentaban características clínicas, analíticas o morfológicas que justificaban dicha citopenia (anemias carenciales, proceso de inflamación crónica, citopenias autoinmunes, hiperesplenismo). Los controles presentaban una edad media de 62 años (rango 11-88 años), predominio de mujeres (24/27), una media de 1,3 citopenias por paciente, y de 1,7% de blastos en médula ósea. Se excluyeron de los controles aquellos pacientes con otros procesos hematológicos clonales (neoplasias mieloproliferativas, mieloma múltiple, leucemia, linfomas).

En la mayoría de los pacientes y controles, se realizó también como protocolo habitual, un estudio citogenético. Además, se disponía de los datos correspondientes a recuentos de sangre periférica, descripción del estudio citológico, y resultado citogenético, que permitía en el caso de los pacientes no sólo clasificarlos según OMS, sino también calcular su riesgo pronóstico en función de los índices internacionales IPSS e IPSS revisado (IPSSr).

En el caso del estudio de mutaciones por secuenciación, se analizaron 106 pacientes diagnosticados de SMD, cuyas muestras de médula ósea se encontraban almacenadas en el Biobanco, y de los que además se disponía de la historia clínica con los datos del diagnóstico y del seguimiento. La media de edad era de 76 años (rango 44-90), predominio de varones (68/38), con anemia (48%), trombopenia (47%) y/o neutropenia (18%). La distribución por subgrupos de la OMS, por categorías de riesgo citogenético y por clasificación pronóstica (IPSSr) se describen en la tabla 4.5 de Resultados.

Estudio morfológico y citogenético

Las extensiones del aspirado de médula ósea se tiñeron con May-Grünwald-Giemsa y tinción de Perls (para hierro), según procedimiento habitual. Un hematólogo independiente realizó el estudio morfológico y concluyó el informe en base a estos datos y a la información clínica disponible.

Se realizó además estudio citogenético convencional (por técnicas de bandas-G) para el análisis del cariotipo. En casos sin metafases disponibles o escasas, se procedió a un análisis de

hibridación *in situ* FISH con sondas para detección de delección de 5q, delección de 7q o monosomía 7, trisomía 8, delección de 20q. También este estudio y el informe fueron realizados por un citogenetista independiente.

3.2. ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las muestras de médula ósea heparinizadas se procesaban de forma inmediata a su recepción (menos de 2 horas desde su extracción), para evitar alteraciones de la muestra.

Se realizó el marcaje celular de antígenos de superficie con anticuerpos monoclonales (ver tabla 3.1). El procedimiento se describe a continuación:

- Se dispensan 1×10^6 células de la muestra en cada tubo del panel.
- Se pipetea los anticuerpos monoclonales de superficie (tabla 1), de 5-10 μ l, según especificaciones de cada monoclonal.
- Incubación durante 15 min. a temperatura ambiente y oscuridad.
- Lisis de hematíes con 2 ml del reactivo lisante de hematíes, *FACS Lysing Solution* (*Beckton Dickinson*).
- Incubación durante 10 min. a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavado con 5 ml de un tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline, PBS*) y se realiza una centrifugación a 1800 r.p.m. durante 5 min.
- Se descarta el sobrenadante, y se agita el botón celular.
- Se añade unas 200 μ l de PBS para resuspender las células.

Tubo	FITC	PE	perCP	APC	
1	HLA-DR	CD117	CD45	CD34	Blastos mieloides
2	CD11b	CD13	CD45	CD34	Maduración mieloide
3	CD64	CD36	CD45	CD34-CD14	Maduración monocítica
4	CD10	CD34	CD20	CD19	Maduración linfoide
5	CD7	CD56	CD45	CD34	Aberrancias antigénicas
6	CD16	CD13	CD45	CD11b	Maduración mieloide
7	CD15	CD33	HLA-DR	CD34	Población mielomonocítica

Tabla 3.1. Panel de anticuerpos utilizado en el estudio por citometría de flujo

Los anticuerpos monoclonales mayoritariamente eran de *Becton Dickinson*, salvo el CD11b que era de *Beckman Coulter*.

La adquisición de las células se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur, provisto del programa *CellQuest* (*Becton Dickinson, San José, California*). Se adquirieron 100.000 eventos.

En el análisis de poblaciones se empleó el programa *Infinicyt versión 1.7*. (*Cytognos, Salamanca, España*). Se utilizó la herramienta del análisis avanzado de Maduración.

Se determinó la expresión antigénica y la intensidad de la misma, en las siguientes poblaciones hematopoyéticas: blastos mieloides, serie mieloide, serie monocítica y serie eritroide. Para el análisis de las muestras con sospecha de SMD se aplicaron las recomendaciones del grupo de trabajo de *European LeukemiaNet* (52).

Los criterios se resumen a continuación, y se describe la estrategia de análisis en las gráficas.

1. Progenitores mieloides:
 - a. Porcentaje sobre celularidad global
 - b. Patrón de expresión CD34/CD117 heterogéneo o no
 - c. Expresión aberrante de otros marcadores CD10, CD19, CD7, CD56
 - d. Asincronía madurativa con expresión CD11b o CD15
 - e. Alteraciones en la expresión de CD13, CD33
 - f. Alteraciones en la expresión de CD45

2. S. mieloide:
 - a. Disminución s. mieloide: relación neutrófilos/linfocitos
 - b. Disminución de la complejidad: máxima fluorescencia “*peak channel*” de la complejidad (*side-scattered light, SSC*) entre neutrófilos/linfocitos.
 - c. Alteraciones en la maduración en gráficos CD13/CD11b, y CD13/CD16.
 - d. Patrones de expresión alterados CD15, CD10 en granulocitos maduros.
3. Monocitos:
 - a. Porcentaje sobre celularidad global.
 - b. Alteraciones en la maduración (CD36/CD14).
 - c. Alteraciones en la expresión de CD13, CD33.
 - d. Expresión aberrante de CD56.
4. Progenitores B
 - a. Fracción blastos linfoides/blastos totales CD34+.
5. S. eritroide
 - a. Porcentaje de s. eritroide sobre celularidad global.
 - b. Alteraciones en la expresión de CD36.

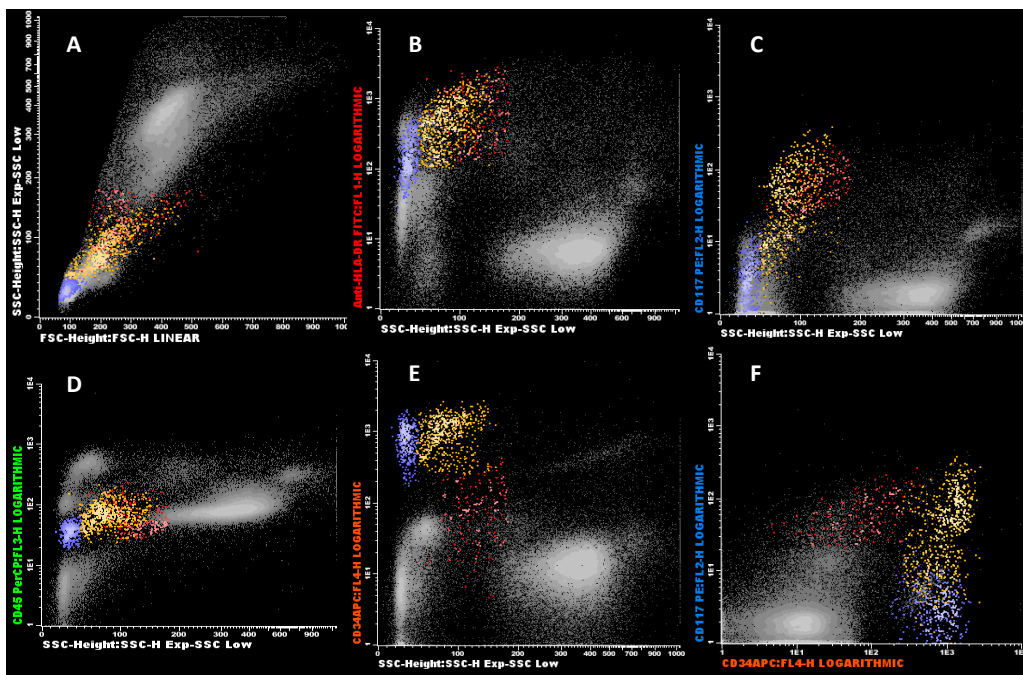


Figura 3.1. Estrategia de análisis para progenitores. Blastos mieloides: población CD34+/CD117+/HLA-DR+/CD45+d (color amarillo) más población CD34-/CD117+/HLA-DR+/CD45+d (color rojo) (30). La población blástica linfoides CD34+/CD117-/HLA-DR+/CD45+d, menor tamaño y complejidad (color morado). Estas tres poblaciones se representan en los gráficos SSC/FCS (A), HLA-DR/SSC (B), CD117/SSC (C), CD45/SSC (D), y CD34/SSC (E). El gráfico CD117/CD34 (F) valora la heterogeneidad de los blastos mieloides en la expresión CD34/CD117 (que se pierde en pacientes con SMD).

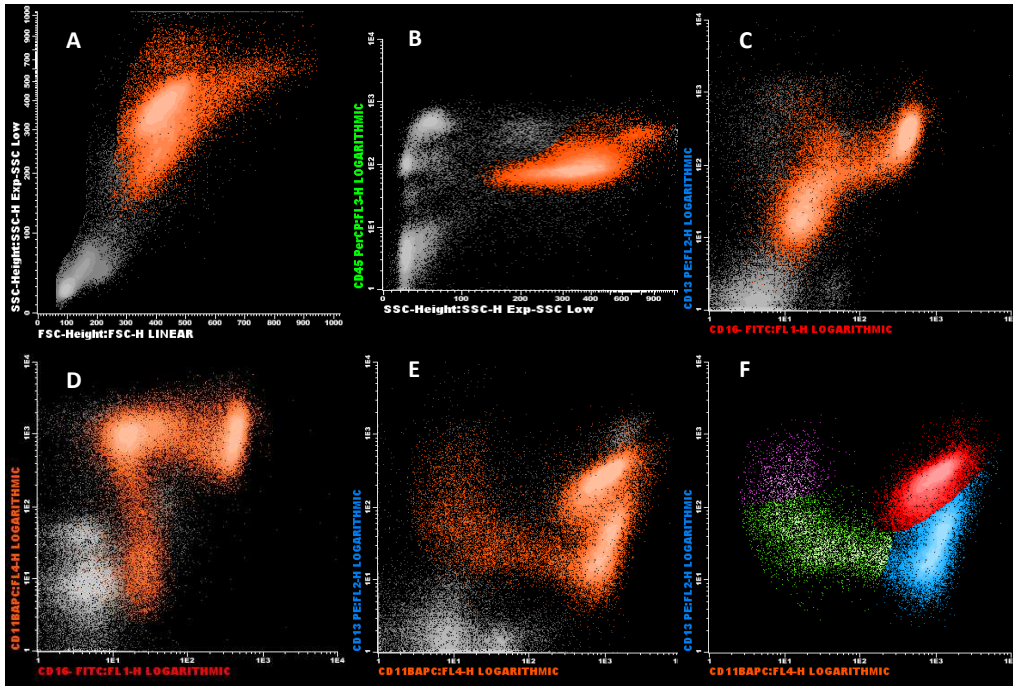


Figura 3.2. Estrategia de análisis de la serie mieloide (color naranja). El gráfico SSC/FCS (A) valora el grado de complejidad. Expresión de CD45 (B). Patrón de maduración mieloide CD13/CD16 (C), CD11b/CD16 (D), CD13/CD11b (E). Estadios madurativos sobre el gráfico CD13/CD11b (F): segmentados (rojo), metamielocitos-cayados (azul), mielocitos (verde), promielocitos (morado).

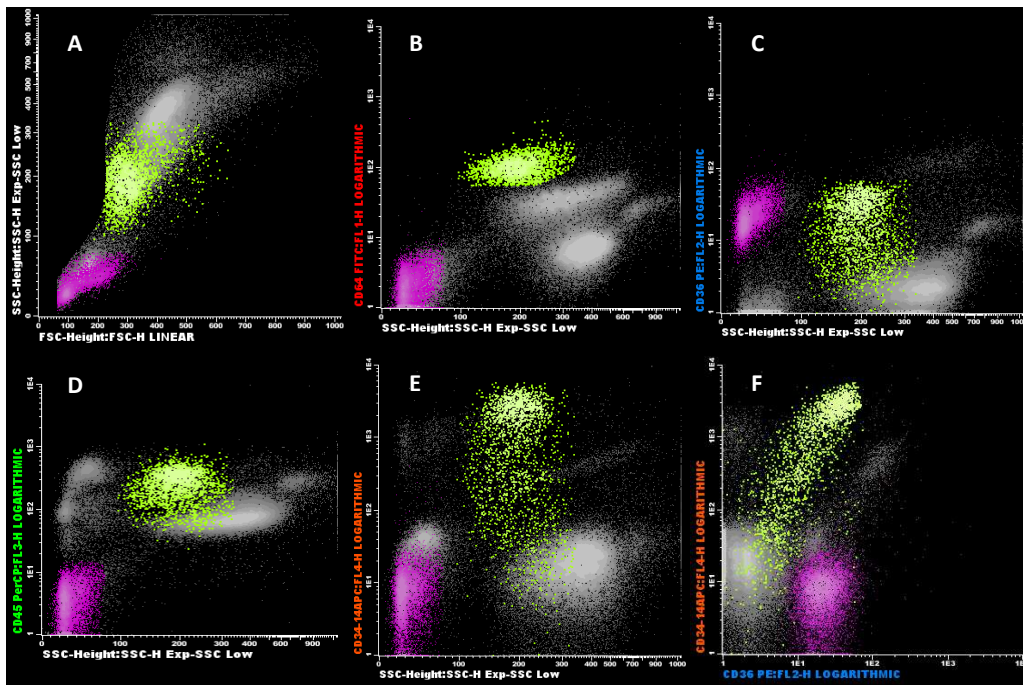


Figura 3.3. Estrategia de análisis de la población monocítica (color verde) y de la serie eritroide (violeta). La población monocítica se identifica por CD64 fuerte (B), con adquisición progresiva de CD36 (C) y de CD14 (E), con predominio de las formas maduras CD36+/CD14+ (F). La serie eritroide se identifica por CD45 negativo (D) y expresión de CD36 (C).

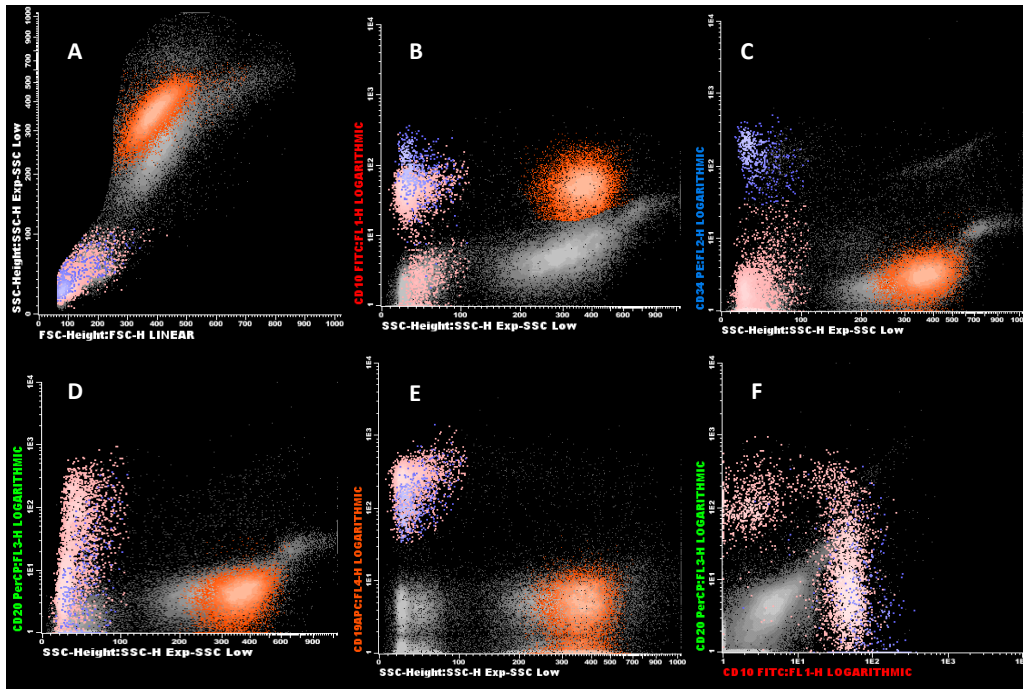


Figura 3.4. Estrategia de análisis de la población linfoide B (color rosa). La población linfoide B se identifica por expresión de CD19 (E). Los blastos linfoides B (color morado) expresan CD19 y CD34. En la maduración linfoide B se va perdiendo CD10 y ganando CD20 (F). Los granulocitos maduros (color naranja) expresan CD10 (B), su pérdida es rasgo de displasia.

3.3. ESTUDIO MUTACIONAL POR SECUENCIACIÓN MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN

El estudio se realizó con la tecnología de secuenciación masiva de nueva generación (NGS: next generation sequencing) de *Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)*, con el secuenciador ***Ion Torrent Proton™***. Esta tecnología se basa en un método de semiconducción iónica. Detecta la carga de iones de hidrógeno que se liberan durante la polimerización de ADN. Traduce la señal química de añadir una base (A, C, G, T) en información digital en un chip semiconductor. Es decir, cuando un nucleótido es incorporado a la cadena de ADN por una polimerasa, un ion de hidrógeno es liberado. La carga de este ion cambia el pH de la solución, lo que es detectado por un sensor situado en cada micropocillo, traduciendo esta información química en información digital enviando una señal.

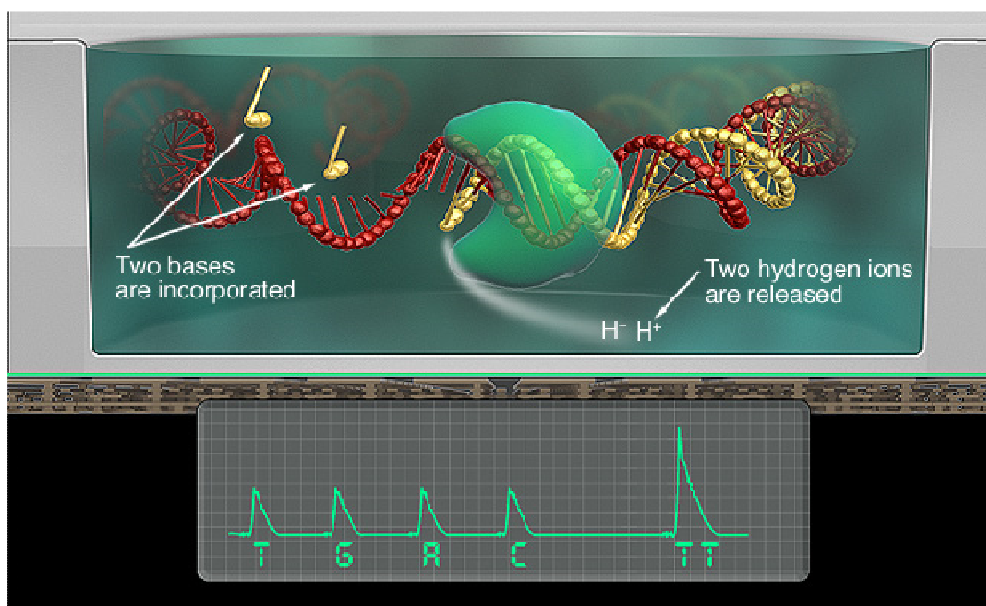


Figura 3.5. Tecnología de secuenciación masiva por método de semiconducción iónica. La incorporación de dos nucleótidos iguales, genera una señal de doble intensidad, y el secuenciador lo interpreta como dos bases (figura extraída de *Life Technology*)

El flujo de trabajo para la secuenciación se sintetiza en la tabla siguiente, y se desarrolla a continuación.





Preparación librerías	Amplificación clonal	Secuenciación y alineación	Análisis final
			
Ampliseq™ Designer Ampliseq™ Library	Ion One Touch 2™	Ion Torrent Proton™ Torrent Suite 4.2.1™	Ion reporter software 4.0™
Selección de genes Diseño de amplicones PCR convencional	PCR en emulsión Microesferas que rodean amplicones, creando millones de microrreacciones Amplificación clonal	Microchip con micropocillos Secuenciación Detección de secuencias y alineación	Análisis variantes (mutaciones) Análisis del número de copias

Tabla 3.2. Flujo de trabajo para secuenciación masiva con la tecnología de *Life Technologies*

1. Preparación de librerías y diseño de amplicones: **AmpliSeq™**
2. Amplificación clonal (PCR en emulsión): **OneTouch OT2™**
3. Secuenciación: **Ion Torrent Proton™**
4. Análisis de secuencias y alineación **Torrent Suite 4.2.1.™**
5. Análisis final (análisis variantes/mutaciones y copy number variation CNV): **Ion reporter software 4.0.™**

Preparación de librerías y diseño de amplicones

Realizamos una selección de los genes o fragmentos de genes que nos interesaba secuenciar (diseño de amplicones). En nuestro caso, seleccionamos 34 genes relacionados con patología mieloides (SMD, LMA, NMPC/SMD), y un total de 1257 fragmentos (amplicones), mediante un programa **Ampliseq™ Designer**.

Nos proporcionaron el kit de **Ion AmpliSeq™ Library**, diseñado por nosotros, que contiene las parejas de *primers* para amplificar nuestras regiones diana.

Gen	Cromosoma	Región secuenciada	
MPL	chr1	43803438	43818424
NRAS	chr1	115251095	115258874
DNMT3A	chr2	25457019	25523119
SF3B1	chr2	198256947	198299851
IDH1	chr2	209101751	209116313
VHL	chr3	10183314	10195319
KIT	chr4	55524151	55604786
TET2	chr4	106155047	106197701
EZH2	chr7	148504653	148544423
JAK2	chr9	5021946	5126885
PTEN	chr10	89624161	89725315
HRAS	chr11	532519	534348
SF1	chr11	64532722	64545911
MLL	chr11	118339409	118392930
CBL	chr11	119077153	119170540
ETV6	chr12	11802955	12044078
KRAS	chr12	25362621	25398385
PRPF40B	chr12	50024310	50037977
SH2B3	chr12	111855922	111886159
FLT3	chr13	28578144	28644774
IDH2	chr15	90627407	90634952
TP53	chr17	7572847	7579960
SRSF2	chr17	74732208	74733231
EPOR	chr19	11488599	11495009
CALR	chr19	13049314	13055076
ASXL1	chr20	30954090	31025087
RUNX1	chr21	36164534	36421235
U2AF1	chr21	44513107	44524598
SF3A1	chr22	30730553	30752852
ZRSR2	chrX	15808511	15841407
KDM6A	chrX	44732713	44970702
PHF6	chrX	133511597	133559416
GATA1	chrX	48649505	48652604
ATRX	chrX	76763771	77041579

Tabla 3.3. Genes seleccionados y regiones secuenciadas.

Utilizamos 10 ng de ADN previamente extraído de muestras de médula ósea y congelado. Se realiza la amplificación (PCR convencional) con los *primers* seleccionados.

Las condiciones del procedimiento se resumen en la tabla 3.4, y el número de ciclos, en función del número de *primers*, es de 14.

Fase	Procedimiento	Temperatura	Tiempo
Inicio	Activación de la enzima	99°C	2 min
Ciclos	Desnaturalización	99°C	15 seg
	Alineamiento y extensión	60°C	4 min
Conservación		10°C	

Tabla 3.4. Condiciones para la amplificación inicial de los fragmentos (amplicones).

- Una vez finalizada la amplificación, se digieren los *primers* parcialmente añadiendo un enzima (*FuPa*). La reacción tiene lugar en el termociclador en unas condiciones de tiempo y temperatura.
- A continuación, se añaden unos adaptadores que permiten además la identificación de la muestra como si fuera un código de barras (*barcodes*), y de nuevo se procede a una incubación en el termociclador.
- Se procede a eliminar la parte no amplificada, y se somete los amplicones amplificados a un procedimiento de normalización para alcanzar una concentración de 100 pM.

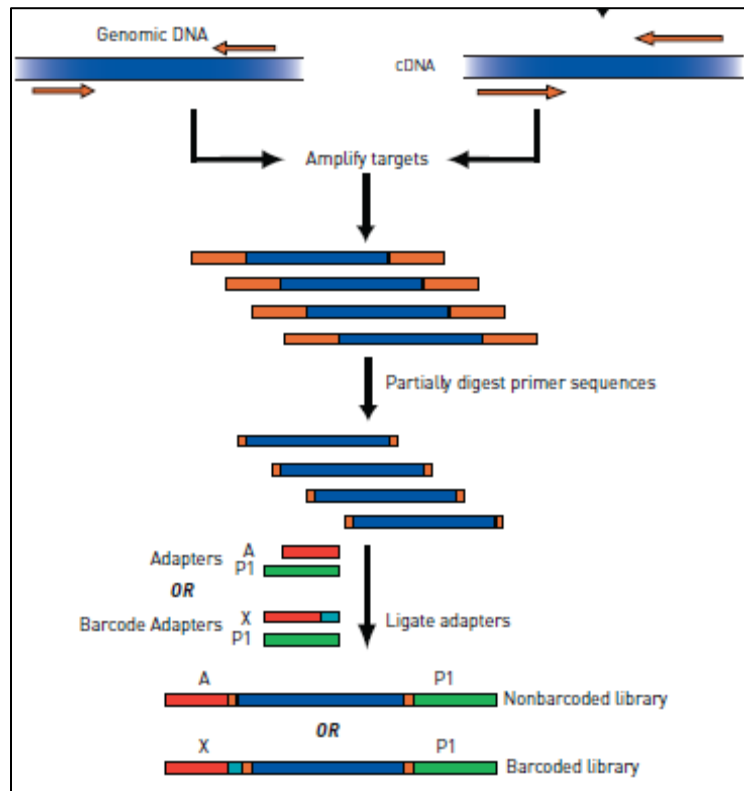


Figura 3.6. Resume los pasos del procedimiento de amplificación y preparación de librerías

Amplificación clonal

Los fragmentos de ADN a continuación se amplifican clonalmente y se agrupan (*clustering*) para ser utilizados como entidades a secuenciar.

Se realizan amplificaciones clonales en el *Ion One Touch 2™*, con unas microesferas (*Ion Sphere™ Particles*) donde se crean millones de microrreacciones idénticas.

- Se cargan las placas, los reactivos y los tubos.
- Se transfiere el producto de la librería obtenido previamente.
- Mediante un filtro, se crean millones de microrreacciones aisladas (en las microesferas) para realizar la amplificación clonal gracias al termociclador integrado.
- A continuación, tras una centrifugación, se recuperan las microesferas, donde ha tenido lugar la amplificación clonal masiva en paralelo.
- Se recoge el producto de la amplificación destinado a ser secuenciado.

Secuenciación y alienación

Se realiza en el secuenciador *Ion Torrent Proton™*. Se transfiere el producto previo a una tarjeta microchip con micropocillos, donde va a tener lugar la secuenciación, utilizando la tecnología anteriormente descrita.

- Con el programa *Torrent Suite™*, se crea una nueva carrera, antes de empezar el proceso, con toda la información correspondiente al procedimiento (kits utilizados, identificación de muestras), para poder monitorizar y tener toda la información disponible sobre la calidad y precisión del proceso de secuenciación.

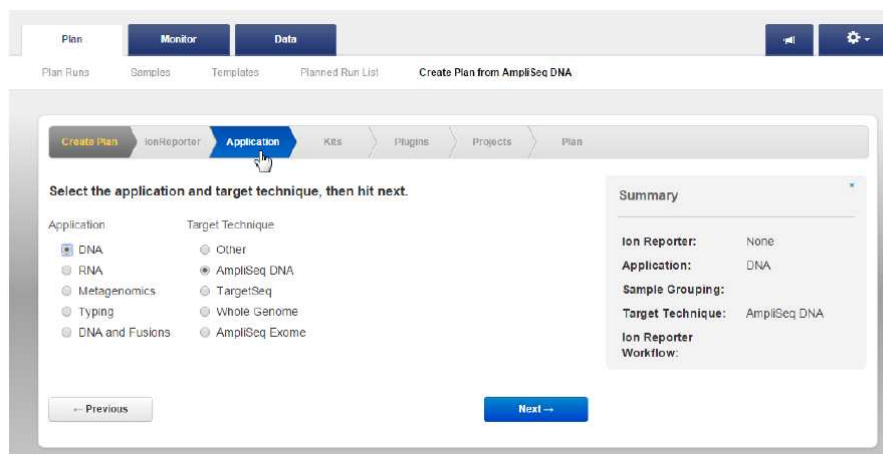


Figura 3.7. Se seleccionar tipo de muestra (ADN) y tipo de amplificación (amplicones).

- A continuación, se inicializa el secuenciador tras realizar un lavado, lo que tarda unos 90 minutos. Se instalan todos los reactivos, incluyendo las soluciones de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) utilizadas para la formación de la cadena de ADN complementaria.

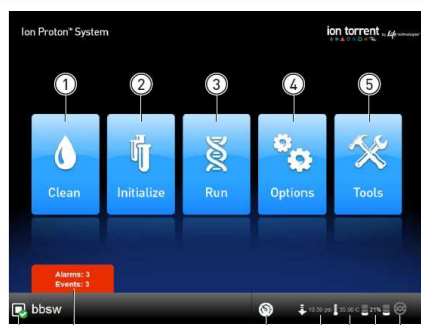


Figura 3.8. Pantalla de inicio del secuenciador

- Se carga el microchip con el resultado de la amplificación clonal. Se cargan también los reactivos necesarios por el puerto de carga (*loading port*).

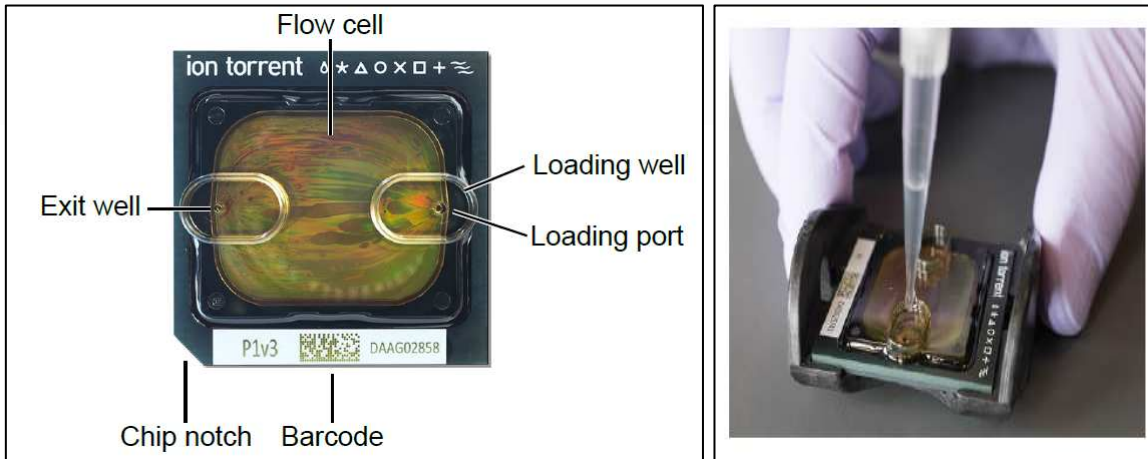


Figura 3.9. Microchip Ion PI™ y procedimiento de carga de muestra y reactivos.

- Se introduce el microchip en el secuenciador ya inicializado, y se comienza con el procedimiento.
- Cuando la carrera se ha completado, en el programa **Torrent™** se pueden revisar los resultados.

En cada procedimiento realizado, se produce una lectura de fragmentos que tienen una media de 115 pb, y el número de fragmentos leídos en cada proceso es de 1257 amplicones.

El número total de lecturas realizadas en cada procedimiento es superior a 2.5 millones, en promedio, y con una profundidad de cobertura (el número de veces que se lee un fragmento) de más de 2000 veces, además con gran uniformidad para todos los fragmentos (91,6%).

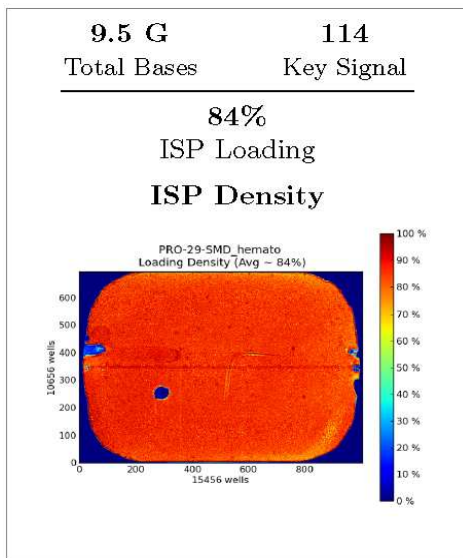


Figura 3.10. Densidad uniforme de carga del microchip

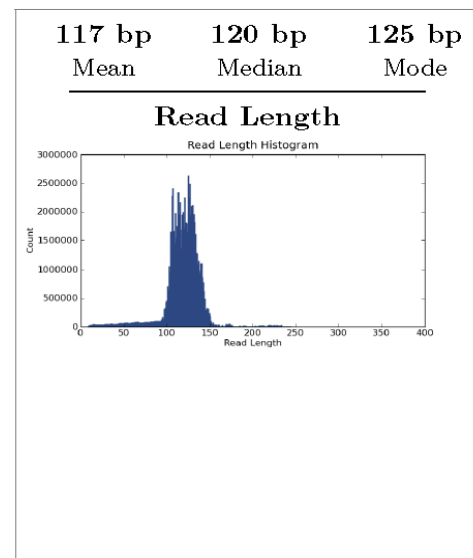


Figura 3.11. Tamaño medio de fragmentos leídos

Análisis final

Automáticamente se transfieren los datos de secuenciación del programa *Torrent™* al programa *Ion Reporter™*.

La detección de variantes a partir de los datos obtenidos tras la secuenciación consiste en identificar las diferencias en la secuencia de ADN de la muestra y compararlo con una secuencia de ADN de referencia (proceso de alineamiento). En este proceso influye la calidad de la secuenciación, secuencias alineadas incorrectamente pueden dar falsos positivos, y las secuencias no alineadas pueden ser fuente de falsos positivos.

En nuestro caso, debido al mayor número de lecturas se obtiene una mayor cobertura de los fragmentos analizados, lo que redundará en mayor precisión y certeza en la lectura, con un proceso de alineación de un 98%.

Se realiza el análisis de variaciones comparando con las bases de datos genómicas (clinvar, cosmic, dbsnp, drugbank, go, omim, pfam, phylop, sift, polyphen) para detectar diferentes tipos de variantes y su posible implicación patogénica.

Las alteraciones que se pueden detectar son: variantes de un nucleótido único (*single nucleotide variants; SNV*), pequeñas inserciones y deleciones (*indels*), y variaciones en el número de copias (*copy number variations; CNVs*).

Variaciones en nuestro genoma

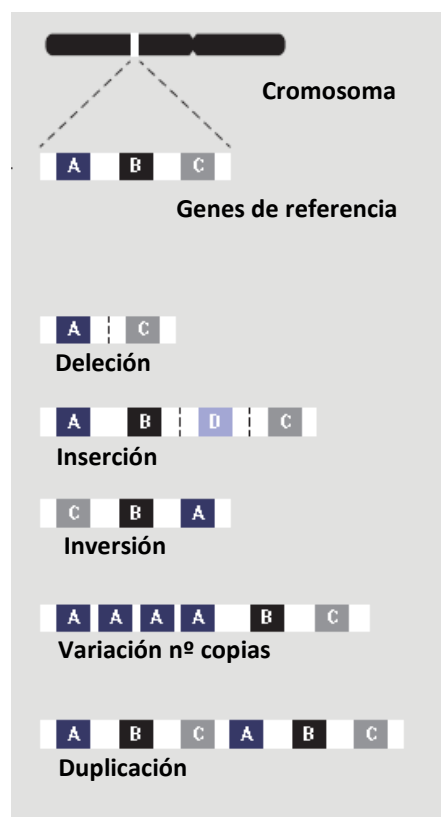


Figura 3.12. Gráfico de las alteraciones genómicas analizadas

El procedimiento del análisis de variantes es el siguiente:

- Se analiza la lectura de la secuencia de la muestra y se compara con una muestra normal (o una muestra de referencia).

- Se realiza una evaluación estadística de la probabilidad de que la variante no esté presente en la muestra normal, y se calcula una probabilidad con su intervalo de confianza, siguiendo un modelo binomial (distribución de *Poisson*).
- Si la variante se encuentra en lecturas de la muestra normal por encima del error admitido, se rechaza como variante específica somática. Puede ser una variante germinal o un error en la lectura de la secuencia.

En el análisis de variantes, descartamos aquellas con una frecuencia superior a 1/100 en la población general, como posibles polimorfismos. También se descartaron aquellas variantes que no alcanzaban el 2% de la celularidad.

Las variaciones en el número de copias (CNVs) representan un tipo de variación en el que los segmentos del genoma (<1 Kb) se han duplicado (ganancias) o delecionados (pérdidas). Estos CNVs conducen a una variedad de efectos en la oncogénesis: deleciones que pueden enmascarar mutaciones recesivas, duplicaciones y deleciones que pueden alterar el número de copias de genes con efecto dosis, deleciones que pueden alterar la expresión de genes reguladores, y la selección de regiones duplicadas conteniendo mutaciones que conducen a ganancia de función.

Se detectan regiones del genoma con diferente ploidia en la muestra frente a los controles (en nuestro caso utilizamos 12 muestras de médula ósea sin patología hematológica). La asignación de la ploidia se realiza a través de un algoritmo dinámico que asigna la ploidia que alcanza la mayor probabilidad (entre la esperada y la obtenida). Es importante considerar el sexo de las muestras y del control, para establecer la ploidia adecuada en los genes del cromosoma X, que en un varón será 1 y en una mujer será 2.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático SPSS (versión 22 SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

En la comparación de las características clínicas, y los resultados del análisis inmunofenotípico entre pacientes y controles se utilizó la t-Student para muestras independientes.

La relación entre variables clínicas (edad, sexo, diagnóstico OMS, porcentaje de blastos, niveles de hemoglobina, plaquetas y leucocitos, riesgo citogenético e índice pronóstico internacional revisado IPSSr) y la presencia de mutaciones se realizó con tablas de contingencia y el estadístico Chi-cuadrado. La relación entre las diferentes mutaciones también se realizó con este estadístico.

El cálculo de las curvas de supervivencia en los análisis univariantes se realizó con Kaplan-Meier.

El análisis multivariante con los riesgos (Hazard Ratios: HR) se realizó mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

La comparación entre las características clínicas de los pacientes con variaciones en el número de copias (CNV) en *HRAS* y *GATA1* se llevó a cabo con el test no paramétrico de comparación de medias U-Mann Whitney y con Chi-cuadrado en el caso de comparación de proporciones.

La fiabilidad diagnóstica y el punto de corte óptimo de un test diagnóstico se evaluó mediante curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*, o Característica Operativa del Receptor).

En todos los casos se consideró la existencia de significación estadística cuando “*p*” fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo, se seleccionaron 55 casos con diagnóstico de SMD y 51 controles con citopenias de otros orígenes. Las características clínicas de los pacientes y controles se recogen en la tabla 4.1.

		Nº pacientes: 55	Nº controles: 51	p
Sexo	<i>Varón/mujer</i>	37/28	24/27	0,057
Edad (años)	<i>Media (rango)</i>	75 (56-90)	62 (11-88)	>0,001
Sangre periférica (media)				
	<i>Hemoglobina (g/dl)</i>	10,2	11,4	0,014
	<i>Plaquetas (x10⁹/L)</i>	122,7	118,2	0,820
	<i>Neutrófilos (x10⁹/L)</i>	3,1	3,7	0,340
	<i>Monocitos (x10⁹/L)</i>	0,6	0,5	0,348
	<i>Nº citopenias</i>	1,4	1,3	0,282
	<i>% Blastos en S.P.</i>	0,4	0,0	0,012
Médula ósea (media)				
	<i>% Blastos en M.O.</i>	5,6	1,7	<0,001
	<i>Nº líneas con displasia</i>	2,2	0,2	<0,001
		Clasificación OMS (n; %)	Causas de citopenias	
	<i>CRDU</i>	4 (7%)	Otras enfermedades	17 (33%)
	<i>ARSA</i>	4 (7%)	Toxicidad fármacos	6 (12%)
	<i>CRDM (SA)</i>	21 (38%)	Inmunes	18 (35%)
	<i>AREB1</i>	5 (9%)	Hipoplasia	5 (10%)
	<i>AREB2</i>	7 (13%)	Hiperesplenismo	3 (6%)
	<i>LMA/SMD 20-30%</i>	4 (7%)	Tumor sólido	2 (4%)
	<i>SD 5q</i>	2 (4%)		
	<i>NMPC/SMD</i>	8 (15%)		
Clasificación pronóstica IPSSr				
	<i>Muy bajo</i>	1 (2%)		
	<i>Bajo</i>	32 (58%)		
	<i>Intermedio</i>	4 (7%)		
	<i>Alto</i>	7 (12%)		
	<i>Muy alto</i>	10 (18%)		
	<i>No clasificable</i>	1 (2%)		

Tabla 4.1. Características de los pacientes y controles incluidos en el análisis

Las dos cohortes presentaban características similares en distribución por sexos, aunque la mediana de edad era inferior en el caso de controles (se incluyó algún paciente pediátrico). En cuanto a las características en sangre periférica, los casos tenían una cifra de hemoglobina ligeramente inferior (10,2 g/dl vs 11,4 g/dl los controles, $p=0,0149$), y un número de superior de blastos, no habiéndose detectado blastos en sangre periférica en los controles (0,4% vs 0%, $p=0,012$). Sin embargo, no diferían en los recuentos de neutrófilos, monocitos, y plaquetas, ni en el número de citopenias. Mayores diferencias se encontraron en las características de médula ósea, un mayor porcentaje de blastos en los pacientes (5,6% vs 1,7%, $p<0,001$), y mayor número de líneas con displasia (2,2 vs 0,2, $p<0,001$).

En el caso de los controles, aunque de forma más infrecuente, también encontramos rasgos displásicos en el estudio citológico, sin que esto conllevara el diagnóstico de SMD. Estos rasgos displásicos se asociaron a toxicidad por fármacos (tratamiento con inmunosupresores: hiposegmentación de neutrófilos; tratamiento con agentes antineoplásicos: macrocitosis e inmadurez, factores de crecimiento en el seno de agranulocitosis o infección), deficiencia vitamínica en casos de altos requerimientos, e infecciones (VIH, CMV).

4.1.1. Alteraciones inmunofenotípicas en pacientes y controles

En Material y Métodos, se describe de forma pormenorizada los parámetros analizados mediante estudio inmunofenotípico, siguiendo las recomendaciones de European Leukemia Net (52). El estudio por inmunofenotipo no incluye la serie megacariocítica, y en nuestro caso, el análisis de la s. eritroide se basa en escasos parámetros.

En el compartimento de progenitores hematopoyéticos, consideramos el porcentaje de blastos mieloides sobre celularidad global, el número de alteraciones inmunofenotípicas detectadas en esta población blástica (patrón de expresión CD34/CD117 heterogéneo o no; expresión aberrante de otros marcadores CD10, CD7, CD19, y CD56; asincronía madurativa con expresión CD11b o CD15; alteraciones en la expresión de CD13, CD33; y alteraciones en la expresión de CD45), y el porcentaje de blastos linfoides del total de blastos.

En la s. mieloide, se analizó la relación neutrófilos/linfocitos, la disminución de complejidad de la s. mieloide (representada en la relación entre la medida de máxima fluorescencia *peak channel* de la complejidad SSC de neutrófilos y linfocitos), y el número de aberrancias inmunofenotípicas acumuladas en esta serie (alteraciones en la maduración en gráficos CD13/CD11b, y CD13/CD16; y patrones de expresión alterados en CD15 y CD10 en granulocitos maduros).

En los monocitos, se consideró el porcentaje global sobre celularidad total, el número de aberrancias acumuladas (alteraciones en la maduración CD36/CD14; alteraciones en la expresión de CD13 y/o CD33; y expresión aberrante de CD56).

En la s. eritroide, se analizó el porcentaje sobre celularidad global, y la alteración de expresión de CD36.

Los resultados obtenidos en pacientes y controles se reflejan en la tabla 4.2.

	<i>Nº pacientes: 55</i>	<i>Nº controles: 51</i>	<i>p</i>
Progenitores hematopoyéticos			
<i>% blastos mieloides</i>	2,4	0,8	0,001
<i>Nº alteraciones</i>	0,5	0	<0,001
<i>% Blastos linfoides/total</i>	2,6	15,5	<0,001
S. mieloide			
<i>Relación N/L</i>	3,0	2,8	0,705
<i>Complejidad N/L</i>	9,8	11,8	0,054
<i>Nº alteraciones</i>	0,9	0,002	<0,001
S. monocítica			
<i>% monocitos</i>	6,6	4,2	0,007
<i>Nº alteraciones</i>	0,4	0	<0,001
S. eritroide			
<i>% eritroblastos</i>	16,9	16,1	0,642
<i>Nº alteraciones</i>	0,1	0	0,005

Tabla 4.2. Resumen de los resultados del análisis inmunofenotípico en pacientes y controles

En el compartimento de progenitores hematopoyéticos, encontramos diferencias en el % blastos mieloides ($p= 0,001$), en el número medio de alteraciones inmunofenotípicas detectadas ($p<0,001$) y también en la fracción de blastos linfoides sobre el total de blastos ($p<0,001$).

En cuanto a las alteraciones inmunofenotípicas encontradas, la más frecuente fue la pérdida de heterogenicidad en la expresión CD34/CD117 (en 24/55 pacientes, 44%), junto con asincronía madurativa con expresión de CD11b/CD15 o alteración en la expresión de CD13/CD33 (en 6/55 pacientes, 11%). En nuestros casos no encontramos expresión aberrante de CD56, CD7, CD10, CD19 en los blastos mieloides de pacientes con SMD.

En la s. mieloide, no encontramos diferencias en la relación neutrófilos/linfocitos, que se puede esperar disminuida en pacientes con SMD, aunque probablemente se deba a que parte de nuestros controles tenían también neutropenia. Sí que se detectó una tendencia a menor complejidad en la s. granulocítica de los pacientes frente a los controles, aunque no se alcanzó significación estadística ($p= 0,054$). Se encontraron amplias diferencias en el número medio de alteraciones acumuladas en s. granulocítica ($p< 0,001$). En 33/55 casos (60%), se detectaron alteraciones en el patrón madurativo (CD11b/CD13/CD16), y en 18/55 casos (33%), los neutrófilos presentaron alteraciones en la expresión de CD15 y/o CD10. En total, en 38 pacientes (69%) se identificaron alteraciones inmunofenotípicas en la s. granulocítica (ver figura 4.1). En el caso de los controles, sólo en uno encontramos una aberrancia, ausencia de expresión de CD10 en granulocitos maduros.

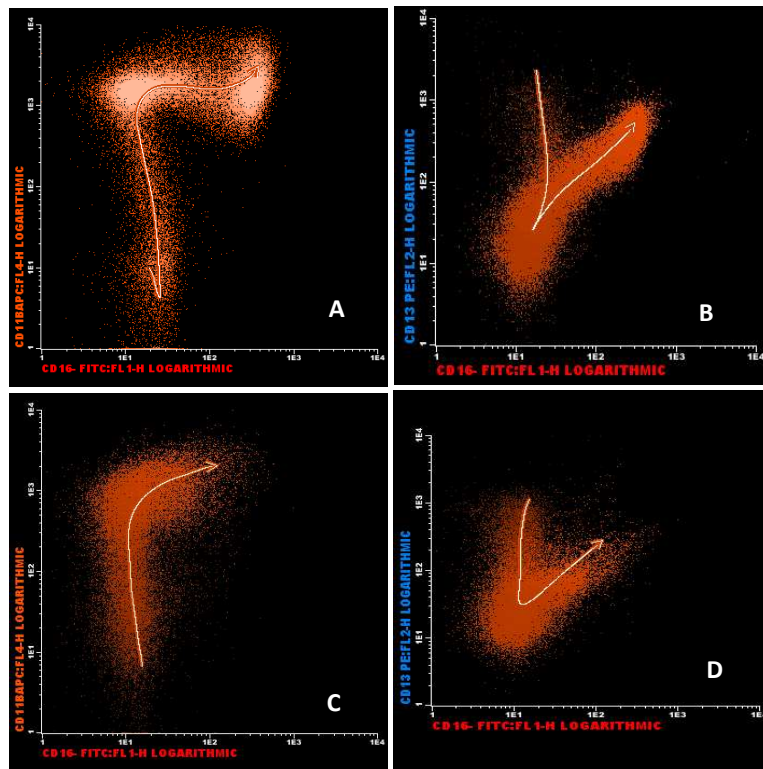


Figura 4.1. Esquemas de maduración en s. granulocítica, relación CD11b/CD13 (A y C) y relación CD13/CD16 (B y D). A y B en control, C y D en paciente con SMD (disminución de maduración hasta segmentado, con disminución de expresión de CD16 y CD11b).

En la s. monocítica, hubo diferencias en el porcentaje global ($p= 0,007$), que se encuentra aumentado en pacientes, y también en el número medio de aberrancias detectadas en esta serie ($p< 0,001$). La alteración más frecuente fue la expresión de CD56 en monocitos de pacientes con SMD (en 15/55 pacientes, 27%), y alteraciones en el esquema de maduración CD36/14 y/o aberrante expresión de CD33/CD13 en 9 pacientes (16%). En total, 20 pacientes (36%) presentaron alteraciones inmunofenotípicas en s. monocítica.

Aunque no se encontraron diferencias en el porcentaje de s. eritroide entre pacientes y casos ($p= 0,642$), sí se identificaron alteraciones en la expresión de CD36 en la s. eritroide en 8 pacientes (15%) frente a ninguna alteración en los casos ($p= 0,005$).

4.1.2. Aplicación del "score diagnóstico" de Ogata a nuestros pacientes y controles

Una de las aproximaciones publicadas para discriminar muestras de pacientes es el "score diagnóstico", validado para cohortes a nivel internacional (Italia y Japón) (40).

Las variables que propone son las siguientes:

1. Porcentaje de blastos mieloides sobre celularidad global (normal menor a 2).
2. Porcentaje de blastos linfoides sobre total blastos (normal superior a 5%)
3. Expresión de CD45 en mieloblastos, en relación con la expresión en linfocitos, considerando la intensidad media de fluorescencia de CD45 (*Mean Fluorescence Intensity, MFI*), $MFI\ CD45\ linfocitos / MFI\ CD45\ mieloblastos$, (normal entre 4-7,5).
4. Complejidad en granulocitos, (relación entre la medida de máxima fluorescencia *peak channel* en la complejidad *SSC* de neutrófilos y linfocitos, normal superior a 6).

Muestras con 2 o más alteraciones, fueron más frecuentes en pacientes con SMD vs controles, con una sensibilidad diagnóstica de un 65% y 89% en las cohortes de Japón e Italia, respectivamente, y una especificidad muy alta, 98% y 90% respectivamente.

Aplicamos este score en nuestra población de pacientes y controles.

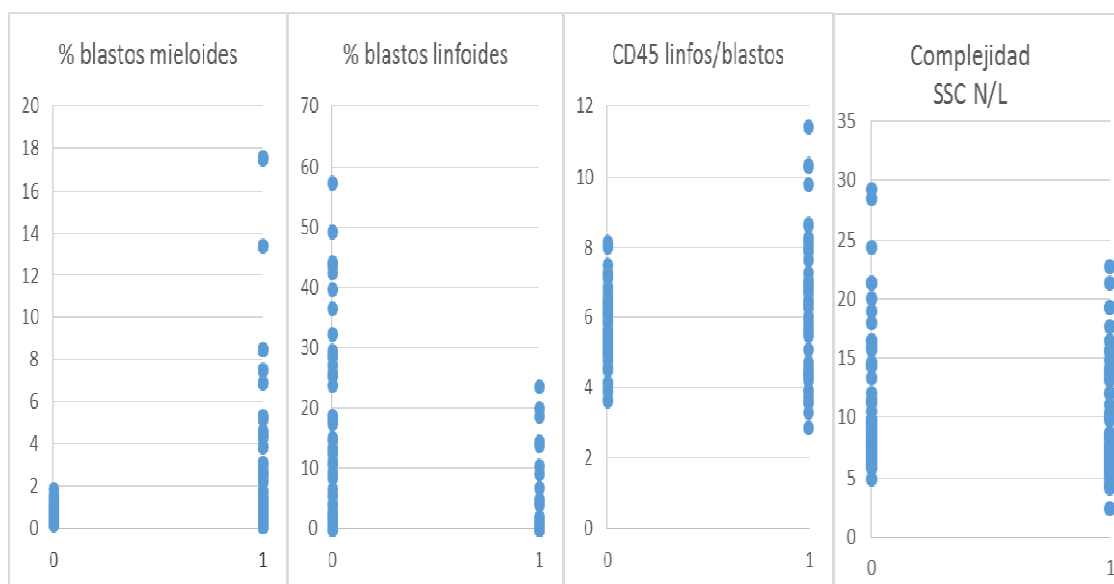


Figura 4.2. Representación de la distribución de las variables del score Ogata en controles (0) y pacientes (1).

Una puntuación de 2 o más del “score diagnóstico” fue alcanzada en 29 de los 55 pacientes, y en 2 de los 51 controles. Esto implica una sensibilidad del 53%, con especificidad del 96%, y valor predictivo positivo del 94%, con valor predictivo negativo del 65%.

Este score identifica con alta especificidad y alto valor predictivo positivo a los pacientes, pero conserva una sensibilidad baja. De los 26 pacientes con score inferior a 2, todos estaban en categorías sin exceso de blastos (CRDU, ARSA, CRDM, sd. 5q, LMMC), y salvo 2 pacientes, presentaban IPSSr de riesgo bajo/intermedio.

4.1.3. Diseño de una base de datos de maduración mieloide

El programa informático para análisis de archivos de citometría de flujo, *Infinicyt*[®] de *Cytognos*, nos permite realizar una base de datos de maduración para poder posteriormente comparar un caso a estudio en dicha base, y establecer las diferencias.

La población a la que aplicamos este procedimiento es a la serie granulocítica, que presenta una expresión variable de determinados antígenos variable en función del grado de maduración.

Así, CD13 es un antígeno expresado de forma intensa en promielocitos, pierde intensidad en mielocitos, y después vuelve a ganar intensidad en metamielocitos-cayados, para ser intenso de nuevo en segmentados.

CD11b no se expresa en formas más inmaduras (promielocitos) y comienza a expresarse en mielocitos, para llegar a alcanzar gran intensidad en segmentados.

CD16 comienza a expresarse en los últimos estadios de maduración, siendo la expresión intensa en segmentados maduros.

En pacientes con SMD, alteraciones en los patrones habituales de expresión de estos antígenos en la s. granulocítica son reflejo de la dismielopoiesis, aunque en ocasiones, estas diferencias son tan sutiles que no son fáciles de interpretar.

Utilizamos la aplicación de *Infinicyt*[®] para base de datos de maduración para evaluar la aplicabilidad de esta herramienta en el estudio de pacientes con SMD.

En nuestros controles, seleccionamos el archivo que contenía estos marcadores (CD16-FITC / CD13-PE / CD45-perCP / CD11b-APC). Realizamos la selección de la población granulocítica en los gráficos por CD45/SSC y SSC/FSC. Añadimos todos estos archivos de los controles, con selección de la población granulocítica, a una base de datos, y se crea un archivo fusión de todos los anteriores, en los que diseñamos la línea de maduración.

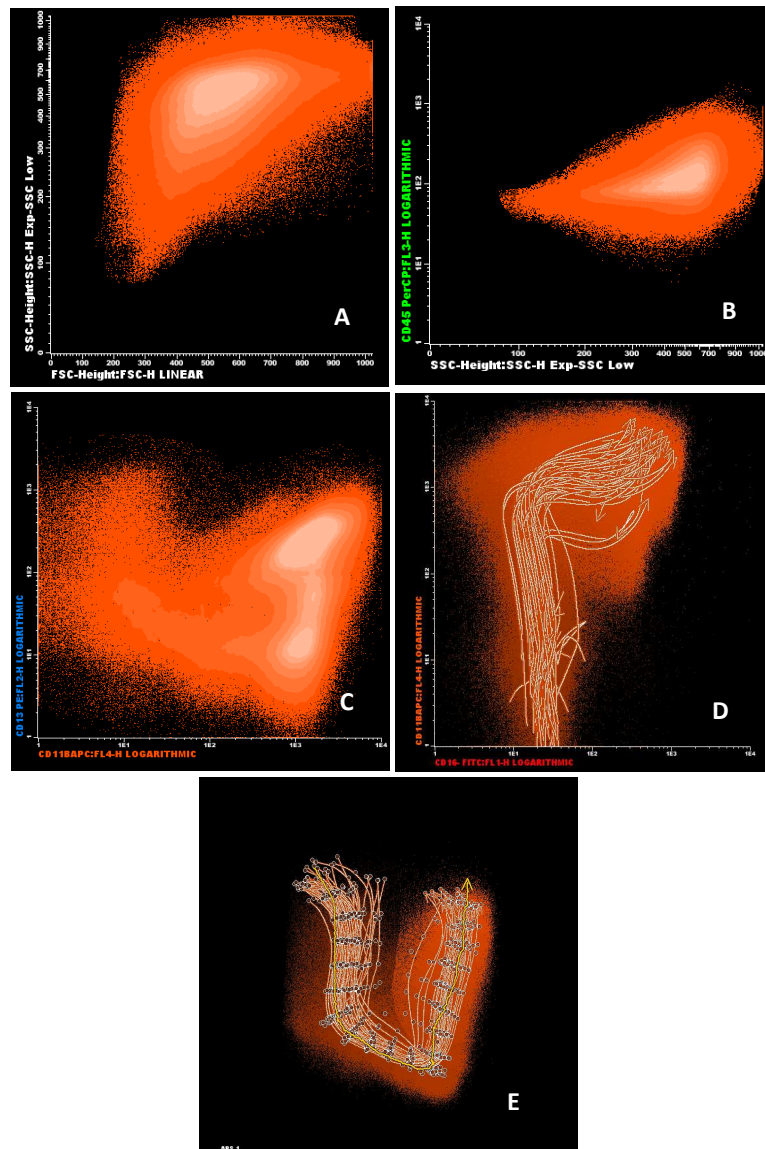


Figura 4.3. Archivo fusionado de la población granulocítica de los controles, según tamaño y complejidad (A), por expresión de CD45 (B), esquema CD13/CD11b (C) y esquema CD11b/CD16 (D). En el gráfico APS se han representado las líneas de maduración de cada muestra (E).

Sobre este archivo fusionado, se representa la maduración de la s. granulocítica, considerando hasta 20 estadios madurativos. De forma global, se representan las líneas múltiples de maduración de cada control en el gráfico de APS (figura 4.3.E), que agrupa todas las variables, y en el gráfico que distingue cada estadio madurativo, se representa la evolución de la expresión de CD13, CD11b, y CD16 (figura 4.4)

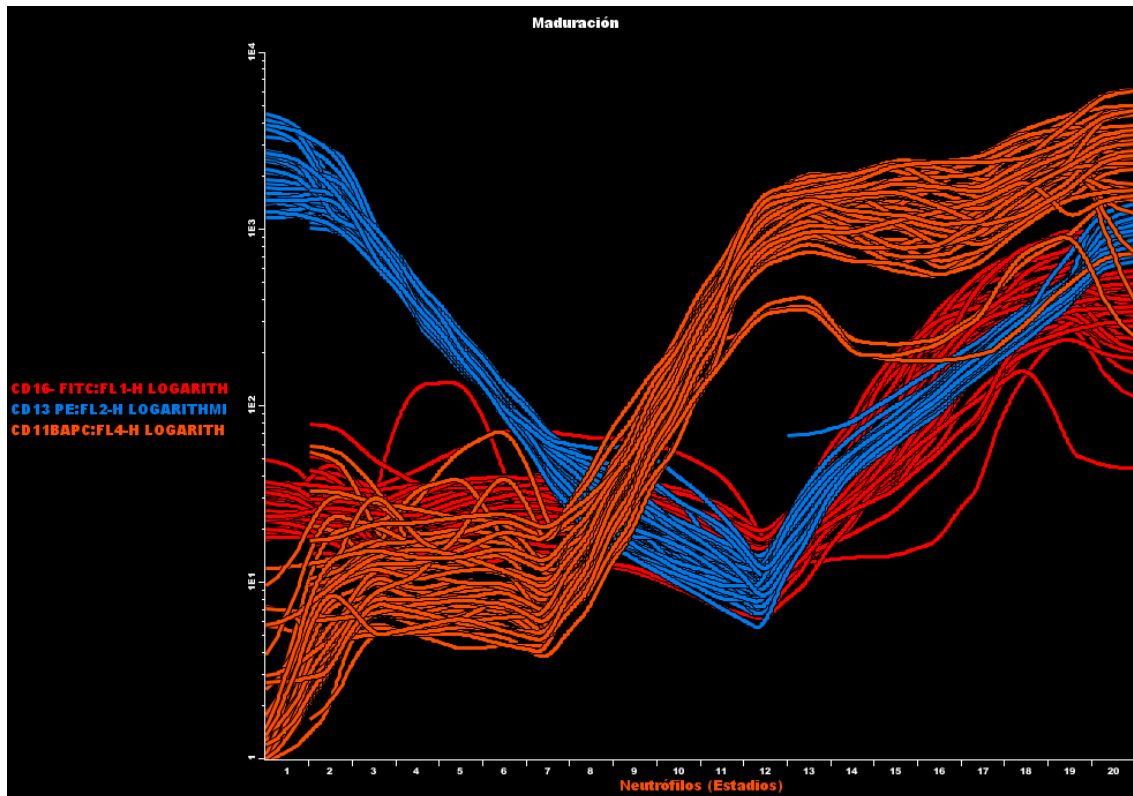


Figura 4.4. Representación de la expresión de los marcadores CD16 (rojo), CD13 (azul) y CD11b (naranja) durante los diferentes estadios madurativos de la s. granulocítica en las muestras de los controles.

A continuación, comparamos la expresión de CD13, CD11b, CD16 y CD45 en los pacientes, en relación con la base de datos de los controles, y también verificamos de forma individual cada control respecto a la base generada.

Se identificó la expresión que se desviaba en 2DE (DE: desviaciones estándar) respecto a la media de los controles para cada uno de los estadios madurativos y para cada uno de los marcadores seleccionados (CD13, CD11b, CD16 y CD45). Esta información era proporcionada por el programa en forma gráfica y en tabla de datos.

4.1.3.1. Ejemplo de análisis de un control con la base de datos de maduración

Se seleccionó el mismo tubo que habíamos considerado para realizar la base de datos (CD16-FITC / CD13-PE / CD45-perCP / CD11b-APC) e identificamos la población granulocítica en los gráficos por SSC/FSC y CD45/SSC. De forma similar, se representa la maduración de la s. granulocítica en el gráfico de APS (figura 4.5.C), y en el gráfico que distingue cada estadio madurativo, se representa la evolución de la expresión de CD13, CD11b, CD45 y CD16 (figura 4.5.D)

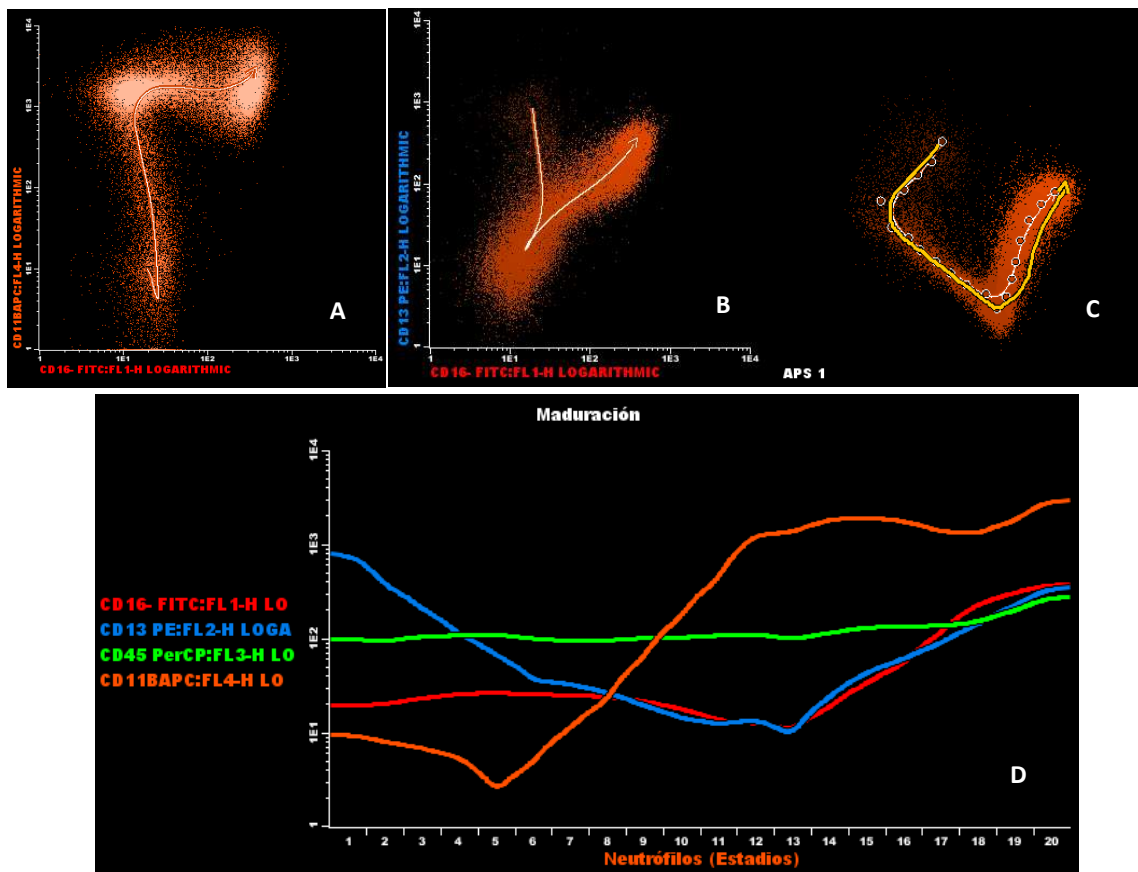


Figura 4.5. S. granulocítica de un control, esquema CD11b/CD16 (A) y esquema CD13/CD16 (B). En el gráfico APS se ha representado la línea de maduración (C). Por último, expresión de los marcadores CD13 (azul), CD11b (naranja), CD16 (rojo) y CD45 (verde) durante los diferentes estadios madurativos de la s. granulocítica (D).

A continuación, se representa gráficamente las diferencias de expresión entre la muestra de este control y la media de los controles de la base de datos (línea 0). Las diferencias que superan las $\pm 2\text{DE}$ respecto a esta media, se encuentran fuera del área gris, limitada por los valores $\pm 2\text{DE}$ (ver figura 4.6).

Se visualiza en el gráfico que el control expresa los marcadores seleccionados (CD16, CD13, CD11b y CD45) dentro del rango de media $\pm 2\text{DE}$, y que además esta expresión se encuentra muy próxima a la media.

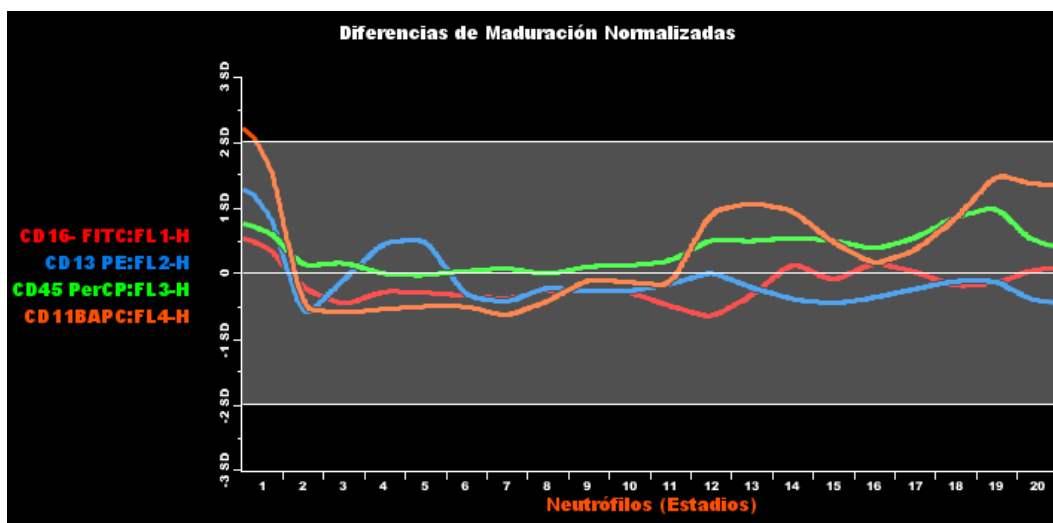


Figura 4.6. Diferencias de maduración normalizadas para un control. La expresión de CD16, CD13, CD11b y CD45 se encuentran dentro del área gris, y además bastante próxima y sin grandes desviaciones respecto a la línea media.

4.3.1.2. Ejemplo de análisis de un paciente con la base de datos de maduración

El mismo análisis descrito anteriormente se realizó en los 55 pacientes seleccionados.

En este ejemplo del análisis de un paciente, se procedió de forma similar a lo descrito en el control.

Se seleccionó el mismo tubo (CD16-FITC / CD13-PE / CD45-perCP / CD11b-APC) e identificamos la población granulocítica en los gráficos por SSC/FSC y CD45/SSC. De forma similar, se representa la maduración de la s. granulocítica en el gráfico de APS (figura 4.7.C), y en el gráfico que distingue cada estadio madurativo, se representa la evolución de la expresión de CD13, CD11b, y CD16 (figura 4.7.D)

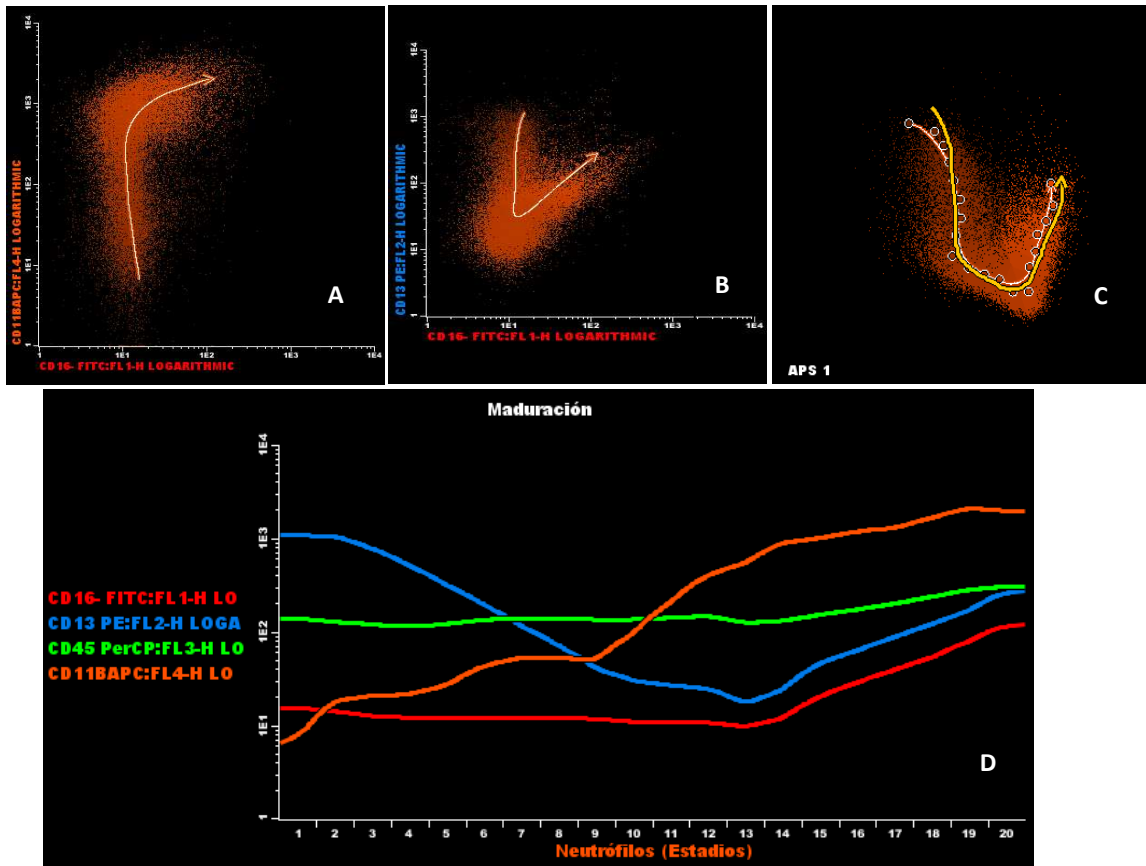


Figura 4.7. S. granulocítica de un paciente, esquema CD11b/CD16 (A) y esquema CD13/CD16 (B). En el gráfico APS se ha representado la línea de maduración (C). Por último, expresión de los marcadores CD13 (azul), CD11b (naranja), CD16 (rojo) y CD45 (verde) durante los diferentes estadios madurativos de la s. granulocítica (D).

Se representa gráficamente las diferencias de expresión entre la muestra del paciente y la media de los controles (ver figura 4.8).

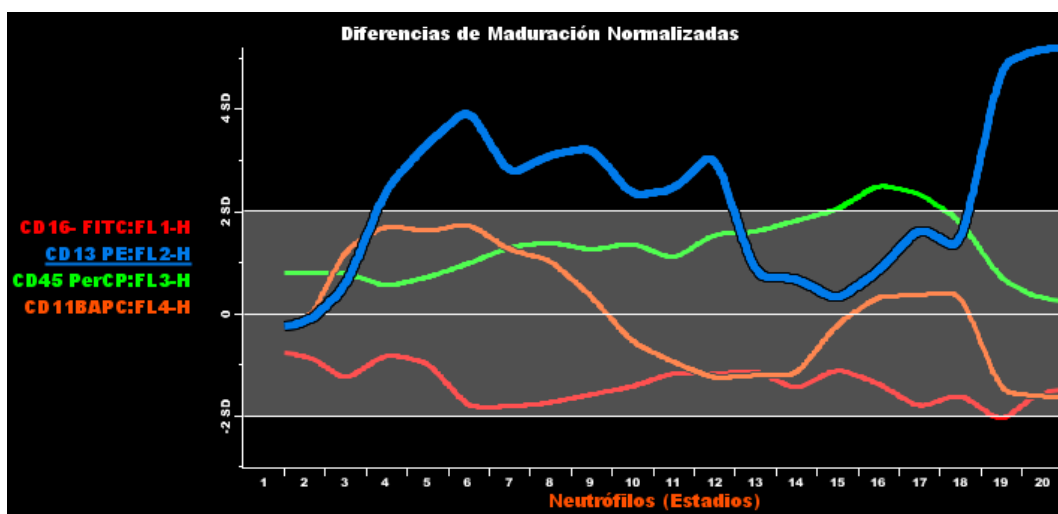


Figura 4.8. Diferencias de maduración normalizadas para un paciente.

A diferencia de los resultados obtenidos en el control, existen marcadas desviaciones respecto a la línea media en la expresión de los marcadores a lo largo de la maduración granulocítica. La expresión de CD13 se encuentra por encima de 2DE de la media en estadios intermedios, y después en estadios finales. La expresión de CD11b se encuentra dentro del área gris para todos los estadios madurativos. La expresión de CD16 se encuentra por debajo de la media en todos los estadios, quedándose en la línea de -2DE al final de la maduración.

La información representada por el gráfico, se proporciona en forma de tabla de datos, con las diferencias respecto a las líneas de $\pm 2DE$ de la media (ver tabla 4.3) para cada parámetro analizado y para cada estadio madurativo.

SD																					
Parámetros\Estadios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
CD16- FITC:FL1-H	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-0,11	--
CD13 PE:FL2-H	--	--	--	0,463	1,334	2,028	0,719	1,111	1,257	0,314	0,43	1,181	--	--	--	--	--	--	--	2,882	3,208
CD45 PerCP:FL3-H	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,042	0,533	0,362	--	--	--	--
CD11BAPC:FL4-H	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabla 4.3. Diferencias de maduración normalizadas para un paciente. Los datos representan la desviación respecto a las líneas de $\pm 2DE$

4.3.1.3. Resultados del análisis con la base de datos de maduración mieloide

El análisis de comparación entre el esquema madurativo de un paciente y la base de datos de maduración con los datos de los 51 controles, se realizó en los 55 pacientes, y también en los controles de forma individual.

Para simplificar el análisis, los 20 estadios madurativos se consideraron agrupados en 4 estadios para aproximarse a la habitual clasificación de: promielocitos, mielocitos, metamielocitos-cayados, y segmentados. Se identificó una alteración en uno de los 4 estadios, cuando presentaba algún valor fuera del rango de media \pm 2DE. Se consideraron el número total de alteraciones durante la maduración (sumando las de cada estadio).

En los controles, se detectó una media de 1,9 desviaciones (rango 0-4) en el esquema de maduración, considerando los 4 estadios madurativos y los cuatro marcadores analizados (CD16, CD13, CD11b, CD45).

En los pacientes, sólo hubo 2 de los 42 estudiados, que no presentaron ninguna alteración en el esquema de maduración, y en los que los valores de intensidad de CD16, CD13, CD11b y CD45 se encuadraban en el rango de la media \pm 2DE. Se trataba de un paciente con sd. 5q menos, y el otro paciente con ARSA, probablemente en estos pacientes no se logre detectar alteraciones en s. mieloide, y sean la s. eritroide y la megacariocítica (en el caso del sd. 5q menos) las que presenten más rasgos displásicos.

El resto de pacientes, presentaron un número variable de alteraciones. Sumando las desviaciones en los 4 estadios de los 4 marcadores, se detectaron una media de 4,5 alteraciones (rango 0-14).

Si consideramos el pronóstico de los pacientes en función del IPSSr, los pacientes con riesgo bajo (IPSSr muy bajo o bajo) presentaba una media de 3,7 alteraciones (rango 0-9), los pacientes con riesgo intermedio (IPSSr intermedio) tenían una media de 4,5 desviaciones (rango 1-7), y los de alto riesgo (IPSSr alto y muy alto) acumulaban una media de 6,8 alteraciones en la maduración (rango 1-14). Observamos una tendencia a que a peor

pronóstico, mayores desviaciones del patrón de maduración normal se pueden encontrar (ver figura 4.9).

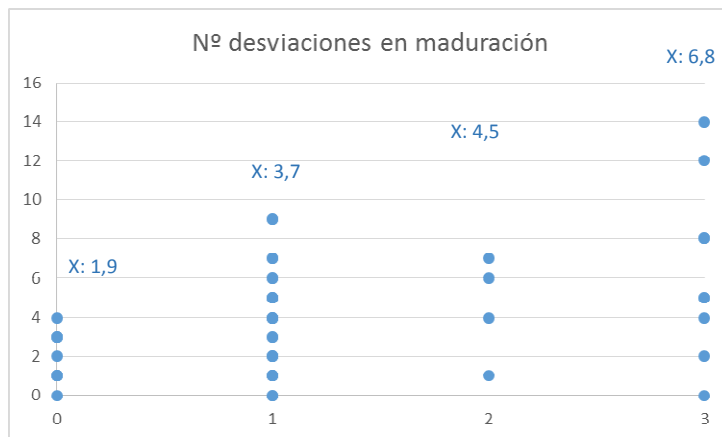


Figura 4.9. Representación de la distribución del número de desviaciones acumuladas en los 4 estadios madurativos y en los marcadores CD16, CD13, CD11b, CD45, en controles (0), pacientes con bajo riesgo (1), riesgo intermedio (2) y alto riesgo (3).

4.1.3.4. Evaluación de la base de datos de maduración mieloide como test diagnóstico

La aplicación de esta base de datos como herramienta diagnóstica presenta la ventaja de que el resultado es independiente del observador.

La fiabilidad del test diagnóstico la analizamos con el área bajo la curva (AUC: *area under curve*), y comparamos esta área con la hipótesis nula (el área bajo la curva es igual a 0,5 en el caso de que el test no discrimine entre paciente y control).

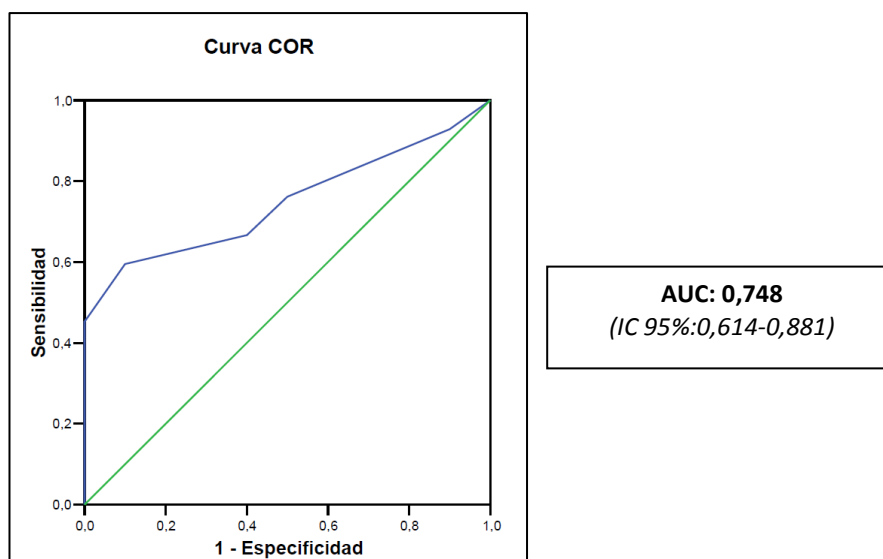


Figura 4.10. Curva ROC de nuestro test diagnóstico

El AUC de nuestro test diagnóstico (0,748) es significativamente diferente a la hipótesis nula ($p= 0,016$), por lo que es fiable como test diagnóstico.

A continuación, calculamos el **punto óptimo de corte**, es decir, el valor del test que nos permita diferenciar pacientes y controles con la mayor especificidad posible, y sin perder sensibilidad. Para ello, utilizamos los puntos con los que se ha construido la curva ROC, basándose en los valores de sensibilidad y de 1-especificidad con diferentes puntos de corte.

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1,00	1,000	1,000
,50	,929	,900
1,50	,762	,500
2,50	,667	,400
3,50	,595	,100
4,50	,452	,000
5,50	,310	,000
6,50	,238	,000
7,50	,167	,000
8,50	,119	,000
10,50	,071	,000
13,00	,048	,000
15,00	,000	,000

Tabla 4.4. Posibles valores del test diagnóstico, con los correspondientes valores de sensibilidad y (1-especificidad) en función de los mismos

Los dos valores que presentan alta especificidad conservando sensibilidad son: 3,5 alteraciones (sensibilidad 59,5% y especificidad 90%) y 4,5 alteraciones (sensibilidad 45% y especificidad 100%).

Podemos, por tanto, adoptar ambos valores considerando:

- valores a partir de **4,5** nos indican con alta especificidad que la muestra se trata de un paciente con SMD;
- valores a partir de **3,5** nos alerta de la posibilidad de que se trate de una paciente con SMD, lo que habrá que verificar también con otros métodos y/o técnicas.

4.2. ANÁLISIS DEL PERFIL MUTACIONAL POR SECUENCIACIÓN MASIVA

Analizamos las muestras de 106 pacientes diagnosticados de SMD, y clasificados en diferentes subgrupos según la clasificación de la OMS (figura 4.11). Adicionalmente, se incluyeron 12 controles sanos, constituidos por muestras de pacientes sin patología en médula ósea, que se procesaron en paralelo con las muestras de los pacientes.

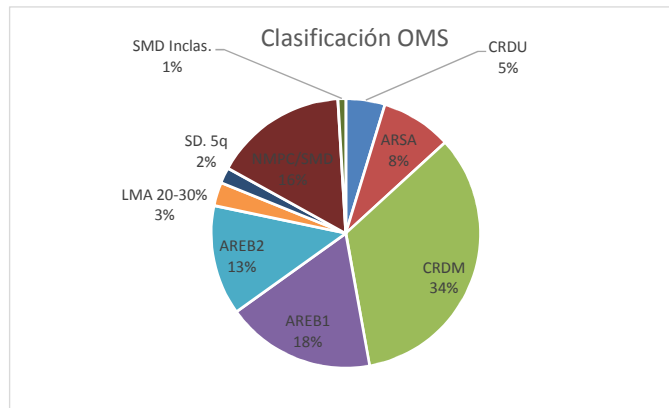


Figura 4.11. Distribución de los pacientes según clasificación OMS.

Las características clínicas de los pacientes se recogen en la tabla 4.5.

La media de seguimiento de los pacientes fue de 19,5 meses (rango 1-70 meses). Durante el seguimiento, un 12% de los pacientes evolucionaron a leucemia aguda, y un 39% fallecieron. Las causas de mortalidad fueron: hemorragia (3 pacientes), infecciones (11 casos), progresión (12 casos), y otras causas en los 15 restantes (figura 2).

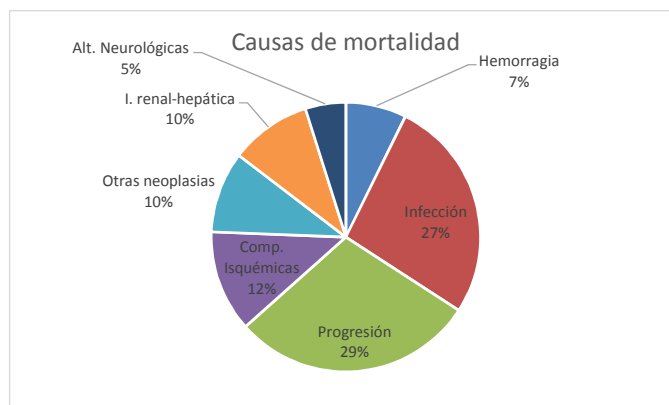


Figura 4.12. Distribución de las causas de mortalidad.

Nº pacientes: 106		
Sexo	Varón/mujer	68/38
Edad (años)	Mediana (rango)	76 (44-90)
Hemoglobina (g/dl)	≥10	55 (52%)
	8-9,9	36 (34%)
	<8	15 (14%)
Plaquetas (x10⁹/L)	≥100	54 (51%)
	50-99	34 (32%)
	<50	18 (17%)
Neutrófilos (x10⁹/L)	≥0,8	87 (82%)
	<0,8	19 (18%)
Clasificación OMS (n; %)	CRDU	5 (5%)
	ARSA	9 (8%)
	CRDM (SA)	36 (34%)
	AREB1	19 (18%)
	AREB2	14 (13%)
	LMA/SMD 20-30%	3 (3%)
	SD 5q	2 (2%)
	NMPC/SMD	17 (16%)
	SMD inclasificable	1 (1%)
Categorías de riesgo citogenético	Muy bueno	6 (6%)
	Bueno	68 (64%)
	Intermedio	12 (11%)
	Pobre	6 (6%)
	Muy pobre	12 (11%)
	Sin datos	2 (2%)
Clasificación pronóstica IPSSr	Muy bajo	28 (27%)
	Bajo	31 (29%)
	Intermedio	16 (15%)
	Alto	13 (12%)
	Muy alto	16 (15%)
	No clasificable	2 (2%)
Evolución	Transformación leucémica	13 (12%)
	Exitus	41 (39%)

Tabla 4.5. Características de los pacientes con SMD incluidos en el análisis

Realizamos el análisis de variantes, y encontramos un total de 198 variantes puntuales y/o deleciones/inserciones, que consideramos como mutaciones puntuales en 94 de los 106 pacientes (88.7%). Se presentaba, como media, 1,9 variantes/muestra (rango 0-5). En la tabla del ANEXO 8.1 se describen cada una de estas mutaciones encontradas.

4.2.1. Mutaciones en pacientes con SMD

Las mutaciones más frecuentes correspondieron a: **TET2** (32,1%), **SF3B1** (17,9%), **ASXL1** (17%), **DNMT3A** (14,2%), **TP53** (11,3%), **RUNX1** (10,4%), **JAK2** (9,4%), **ZRSR2** (7,5%), **EZH2** (6,6%), **IDH1** (5,7%), **CBL** (5,7%), **IDH2** (5,7%), **U2AF1** (5,7%), **KRAS** (4,7%), **MPL** (4,7%), y el resto en proporciones menores al 5%.

La frecuencia de mutaciones encontradas en cada gen analizado está detallada en tabla 4.6, que además compara nuestros resultados con los obtenidos en otras grandes series.

GEN	H 12 Octubre %casos mutados (N= 106)	Bejar (N= 439)	Papaemmanuil (N= 738)	Haferlach (N= 994)
TET2	32,1	20,5	22	30-35
SF3B1	17,9		24	30-35
ASXL1	17,0	14,4	12	20-25
DNMT3A	14,2		5-10	10-15
TP53	11,3	7,5	<5	5-10
RUNX1	10,4	8,7		10
JAK-2	9,4	3,0	<5	<5
ZRSR2	7,5			5-10
EZH2	6,6	6,4		5-10
IDH1	5,7	1,4	<5	<5
CBL	5,7	2,3	<5	<5
IDH2	5,7	2,1	<5	<5
U2AF1	5,7		5-10	5-10
KRAS	4,7	0,9	<5	<5
MPL	4,7		<5	<5
ETV6	3,8	2,6	<5	<5
MLL	3,8		<5	
GATA1	3,8			
FLT3	2,8			<5
PHF6	2,8		<5	<5
NRAS	0,9	3,6	<5	<5

Tabla 4.6. Frecuencia de mutaciones encontradas. Comparación con otras series (55, 126, 127)

La distribución de estas mutaciones según diferentes subgrupos de SMD (alto riesgo, bajo riesgo o NMPC/SMD) se refleja en la figura 4.13.

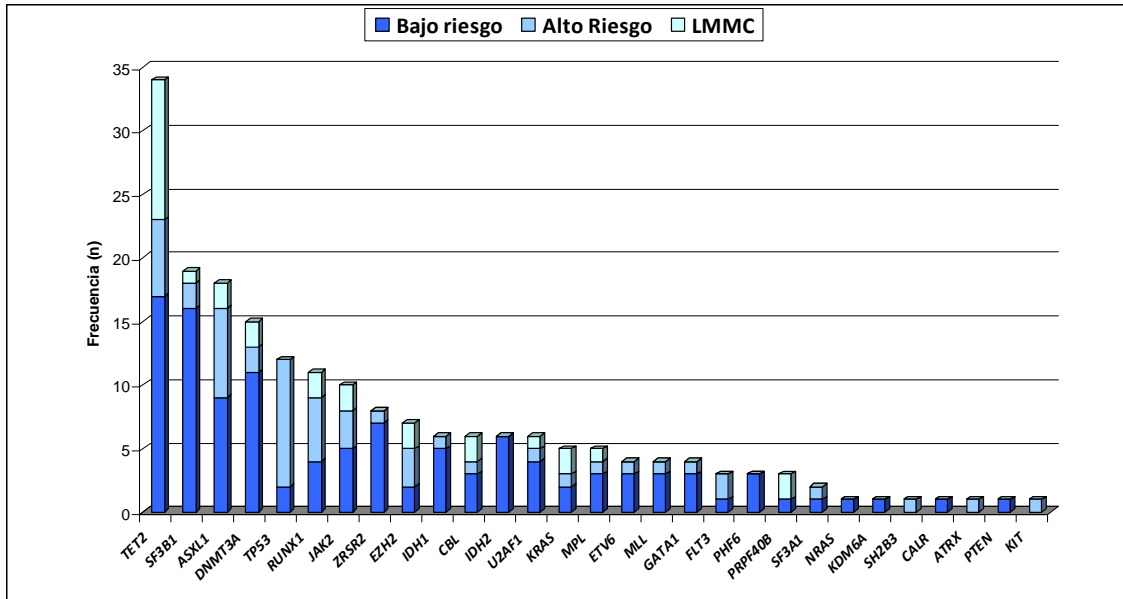


Figura 4.13. Frecuencia de mutaciones, proporción en función de subtipo de SMD

A diferencia de las alteraciones citogenéticas, encontradas con mayor frecuencia en pacientes con alto riesgo, las mutaciones somáticas se encuentran en proporciones similares en pacientes de bajo y alto riesgo (1,8 mutaciones/paciente en muestras de SMD bajo riesgo, 2 mutaciones/paciente en SMD alto riesgo, y 1,8 mutaciones/paciente en NMPC/SMD).

A continuación, se representa esquemáticamente la presencia de mutaciones en los genes estudiados en cada uno de los pacientes analizados. Los pacientes se han agrupado en bajo riesgo, alto riesgo y NMPC/SMD. En este esquema, se pone de manifiesto gráficamente, la distribución de mutaciones bastante similar en número entre pacientes de diferentes subgrupos, y también cómo algunos genes acumulan una gran proporción de estas mutaciones, siendo muy minoritarias en el resto de genes analizados.

4.2.2. Carga alélica y mutaciones acumuladas en un gen

La carga tumoral de los clones mutados fue variable, aunque, en general, se encontraban en un porcentaje alto de la celularidad. En todos los casos se consideraron mutaciones afectando al menos al 3% de la celularidad.

GEN	Nº casos mutados	Carga alélica	
		% promedio	rango
TET2	34	43	4-97
SF3B1	19	33	3-55
ASXL1	18	28	3-54
DNMT3A	15	32	5-57
TP53	12	45	11-80
RUNX1	11	40	12-79
JAK-2	10	40	7-54
ZRSR2	8	74	21-94
EZH2	7	60	15-87
IDH1	6	28	4-45
CBL	6	26	3-55
IDH2	6	41	10-78
U2AF1	6	43	37-48
KRAS	5	35	8-45
MPL	5	29	10-50
ETV6	4	29	12-42
MLL	4	45	5-68
GATA1	4	27	9-44
FLT3	3	48	43-55
PHF6	3	61	42-72
PRPF40B	3	29	18-46
SF3A1	2	30	12-48
NRAS	1	10	
KDM6A	1	49	
SH2B3	1	49	
CALR	1	38	
ATRX	1	8	
PTEN	1	31	
KIT	1	53	

Tabla 4.7. Carga tumoral por gen mutado (promedio, y rango)

No resultó infrecuente encontrar más de una variante en un mismo gen, sobre todo, en genes de gran tamaño como **TET2**, de las 34 muestras que presentaban mutaciones en este gen, en 15 de ellas (44%) se identificaron dos mutaciones. También en **TP53** se encontraron en el 33% de los pacientes con mutaciones, la presencia de más de 1 mutación.

4.2.3. Vías celulares afectadas por mutaciones en pacientes con SMD

Si agrupamos los genes estudiados según la vía celular en la que participan, se acumularon más mutaciones en la vía del procesamiento del DNA (30,8% del total de mutaciones encontrados), seguido de factores de transcripción (19,7%) y procesamiento de RNA (19,2%), con menor frecuencia en genes relacionados con modificación de cromatina (13,6%), receptores/quinasas (13,6%) y por último en genes de la vía **RAS** (3%).

En pacientes con SMD de bajo riesgo (IPSSr muy bajo, bajo, intermedio), los genes más frecuentemente mutados pertenecían a la vía de metilación del DNA (**TET2**, **DNMT3**) y a la de procesamiento del RNA (**SF3B1**, **ZRSR2**). En pacientes considerados como SMD de alto riesgo (IPSSr alto y muy alto) presentaban mayor proporción de mutaciones en genes de transcripción (**TP53**) y modificadores de cromatina (**ASXL1**). Los pacientes con NMP/SMD acumulaban mutaciones en **TET2**, sobre todo, y proporcionalmente se encontraron mayor número de mutaciones de la vía **RAS** (ver figura 4.15).

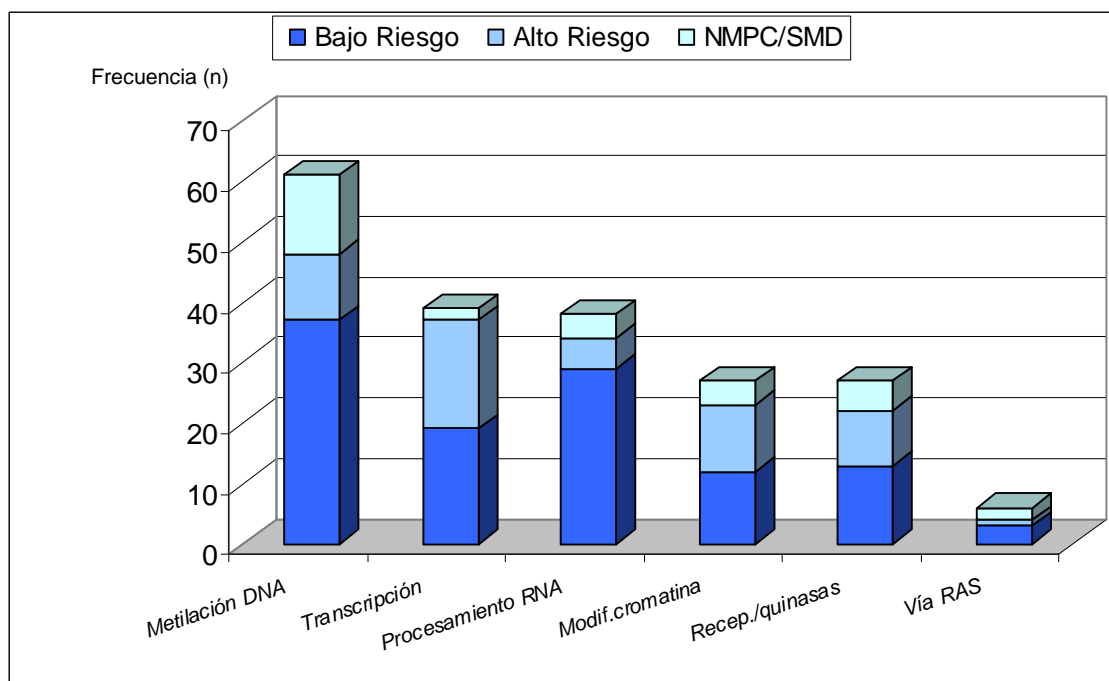


Figura 4.15. Proporción de mutaciones de cada vía en función del subtipo de SMD (bajo, alto riesgo o NMP/SMD).

4.2.4. Relaciones entre variables clínicas y mutaciones

Investigamos las relaciones entre variables clínicas (edad, sexo, diagnóstico OMS, porcentaje de blastos en medula ósea, niveles de hemoglobina, plaquetas y leucocitos al diagnóstico, riesgo citogenético e índice pronóstico internacional revisado) y la presencia de mutaciones en estos genes relacionados con la patología mieloide.

Destacar la asociación entre **SF3B1** y la clasificación OMS ($p < 0,001$) (conocida ya la alta frecuencia de esta mutación en SMD con sideroblastos en anillo: ARSA y ARSA-t), pero además se confirmó la asociación con citogenética de buen pronóstico ($p = 0,02$) y con recuentos plaquetarios más altos al diagnóstico ($p < 0,001$).

Por el contrario, mutaciones en **TP53** se asociaron con niveles más bajos de hemoglobina ($p < 0,001$) al diagnóstico, con tendencia al aumento del porcentaje de blastos en médula ósea ($p = 0,064$), citogenética con pronóstico muy pobre ($p < 0,001$), e IPSSr de muy alto riesgo ($p < 0,001$).

Mutaciones en **TET2** se relacionaron con diagnósticos de categorías OMS de bajo riesgo ($p=0,004$). También otras mutaciones en la vía de DNA metilación se asociaron a categorías OMS de bajo riesgo ($p=0,007$), e IPSSr de bajo riesgo ($p=0,042$) (**IDH2** e **IDH1**, respectivamente).

Otras mutaciones se observaron en cuadros más severos, como **RUNX1** que se asoció con aumento del porcentaje de blastos en médula ósea ($p=0,048$), y **KRAS** con citogenética de mal pronóstico ($p<0,001$).

Resulta interesante destacar la asociación, hasta ahora no descrita, de mutaciones en **GATA1** (factor de transcripción relacionado con la eritropoyesis) y los niveles más bajos de hemoglobina al diagnóstico ($p=0,018$).

Adicionalmente, en nuestra cohorte de pacientes, no encontramos asociación entre mayor edad al diagnóstico y la presencia de mutaciones (**TET2**, **ASXL1** y **DNMT3**) halladas más frecuentemente en población sin patología hematológica, a la que se realizó un estudio mutacional en sangre periférica (110).

4.2.5. Correlación entre mutaciones

Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas ($p<0,005$) en 27 combinaciones de genes mutados, indicando posiblemente la interacción entre diferentes mutaciones en la patogénesis del SMD.

Encontramos una relación excluyente significativa entre mutaciones en **TET2** y en **SF3B1** ($p=0,026$), genes frecuentemente mutados en SMD, pero en cuadros clínicos diferentes.

La presencia de una mutación en la vía de metilación de DNA (**TET2**, **DNMT3A**, **IDH1**, **IDH2**) no se correlacionó con presencia de otras mutaciones de la misma vía. De igual forma, la presencia de mutaciones en genes de la vía de procesamiento del RNA (**SF3B1**, **SRSF2**, **U2AF1**, **ZRSR2**) no se asociaron entre sí.

En la vía de genes modificadores de la cromatina, tanto **ASXL1** como **EZH2** se correlacionaron con mayor fuerza con presencia de mutaciones en **KRAS** ($p= 0,009$, y $p= 0,002$, respectivamente).

Por último, destacar también la asociación entre mutaciones entre **GATA1** y **SF3B1** ($p=0,002$), ambas con implicación en cuadros con mayor relevancia de la diseritropoyesis.

4.2.6. Asociación entre supervivencia global, características clínicas y mutaciones (análisis uni- y multivariante)

En nuestra serie de 106 pacientes, realizamos un análisis univariante de supervivencia global, considerando tanto variables clínicas (edad, sexo, y datos al diagnóstico: niveles de hemoglobina, plaquetas y leucocitos, porcentaje de blastos en médula ósea, clasificación OMS, riesgo citogenético, índice pronóstico IPSS e IPSSr), como la presencia o no de mutaciones relacionados con patología mieloide (34 genes analizados).

Entre las características clínicas, la supervivencia global era significativamente mejor en los grupos con plaquetas por encima de $100 \times 10^9/L$ ($p=0,015$), con menor porcentaje de blastos al diagnóstico ($p= 0,049$), categorías con menor riesgo citogenético ($p= 0,017$), e índices pronósticos IPSS e IPSSr de bajo riesgo ($p= 0,017$ y $p= 0,001$, respectivamente). El valor pronóstico de todos estos factores está ampliamente reconocido en SMD.

El valor de la media de supervivencia (y el intervalo de confianza del 95%) en función de estas variable se resume en tabla 4.8, y las gráficas de supervivencia en la figura 4.16.

	Media Supervivencia (meses)	IC 95%	p
Plaquetas ($\times 10^9/L$)			
≥ 100	46	36-56	0,015
< 100	25	19-41	
Blastos en Médula ósea (%)			
< 2	50	41-59	0,049
2-4	32	19-46	
5-9	30	20-41	
10-19	17	12-22	
> 20	9	0-20	
Categorías de riesgo citogenético			
Muy bueno	41	24-59	0,001
Bueno	47	39-56	
Intermedio	31	19-44	
Pobre	26	9-43	
Muy pobre	12	6-18	
Clasificación pronóstica IPSSr			
Muy bajo	55	43-68	0,001
Bajo	41	32-51	
Intermedio	29	17-41	
Alto	35	19-50	
Muy alto	15	8-22	

Tabla 4.8. Variables clínicas significativas para supervivencia en análisis univariante

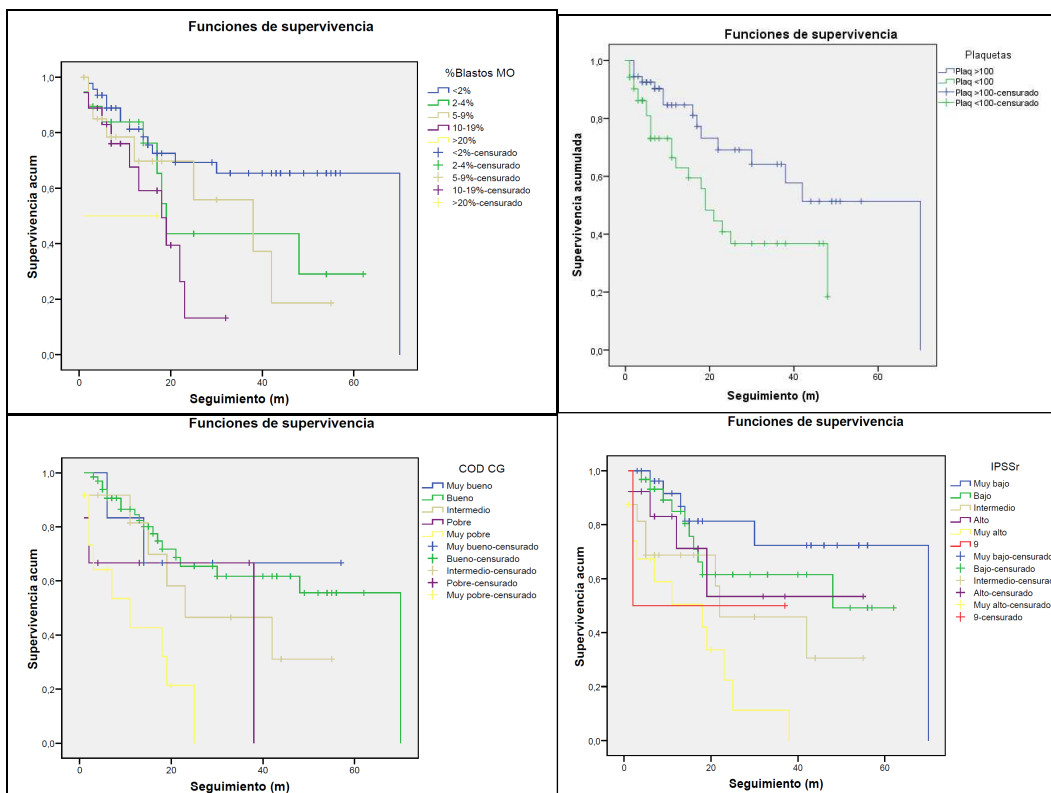


Figura 4.16. Curvas de supervivencia en función de porcentaje de blastos en MO, niveles de plaquetas al diagnóstico, riesgo citogenético, y grupos de riesgo IPSSr

Analizando la presencia de mutaciones de los 34 genes evaluados en los pacientes con SMD, 5 genes presentaban impacto negativo en la supervivencia global de forma significativa en nuestra cohorte: **TP53** ($p = 0,003$), **RUNX1** ($p = 0,035$), **EZH2** ($p = 0,025$), **KRAS** ($p = 0,036$), y **U2AF1** ($p = 0,017$). Los genes **TP53**, **RUNX1** y **KRAS** participan en señales de transcripción, **EZH2** forma parte de la vía de modificación de cromatina y **U2AF1** pertenece al conjunto de genes con función en el procesamiento del RNA.

Agrupando estas mutaciones encontradas según la vía metabólica a la que pertenece, sólo la presencia de mutaciones en la vía de transcripción (que incluye **TP53** y **RUNX1**) alcanzan significación estadística en las curvas de supervivencia ($p = 0,024$). Se resumen los resultados en la tabla 4.9 y figura 4.17.

En el análisis multivariante, considerando las variables clínicas y mutaciones significativas en el análisis univariante (es decir, niveles plaquetas, porcentaje blastos, riesgo citogenético, pronóstico según IPSSr, y presencia de mutaciones en **TP53**, **RUNX1**, **KRAS**, **EZH2**, **U2AF1**), las variables mutaciones en **TP53** y en **EZH2** permanecen como factores pronósticos para supervivencia global (HR: 6,3; IC95%: 2,4-16,5, para **TP53**; y HR: 3,5; IC95%: 1,4-8,8, para **EZH2**).

		Media Supervivencia (meses)	IC 95%	p
TP53	No mutado	42	35-49	0,003
	Mutado	15	5-24	
RUNX1	No mutado	43	36-50	0,035
	Mutado	17	12-22	
EZH2	No mutado	43	36-50	0,025
	Mutado	17	9-26	
KRAS	No mutado	41	34-48	0,036
	Mutado	9	4-15	
U2AF1	No mutado	41	34-49	0,017
	Mutado	8	3-12	
GENES DE TRANSCRIPCIÓN				
No mutados		44	34-53	0,024
1 o más mutados		26	17-34	

Tabla 4.9. Genes con mutaciones significativas para supervivencia en análisis univariante

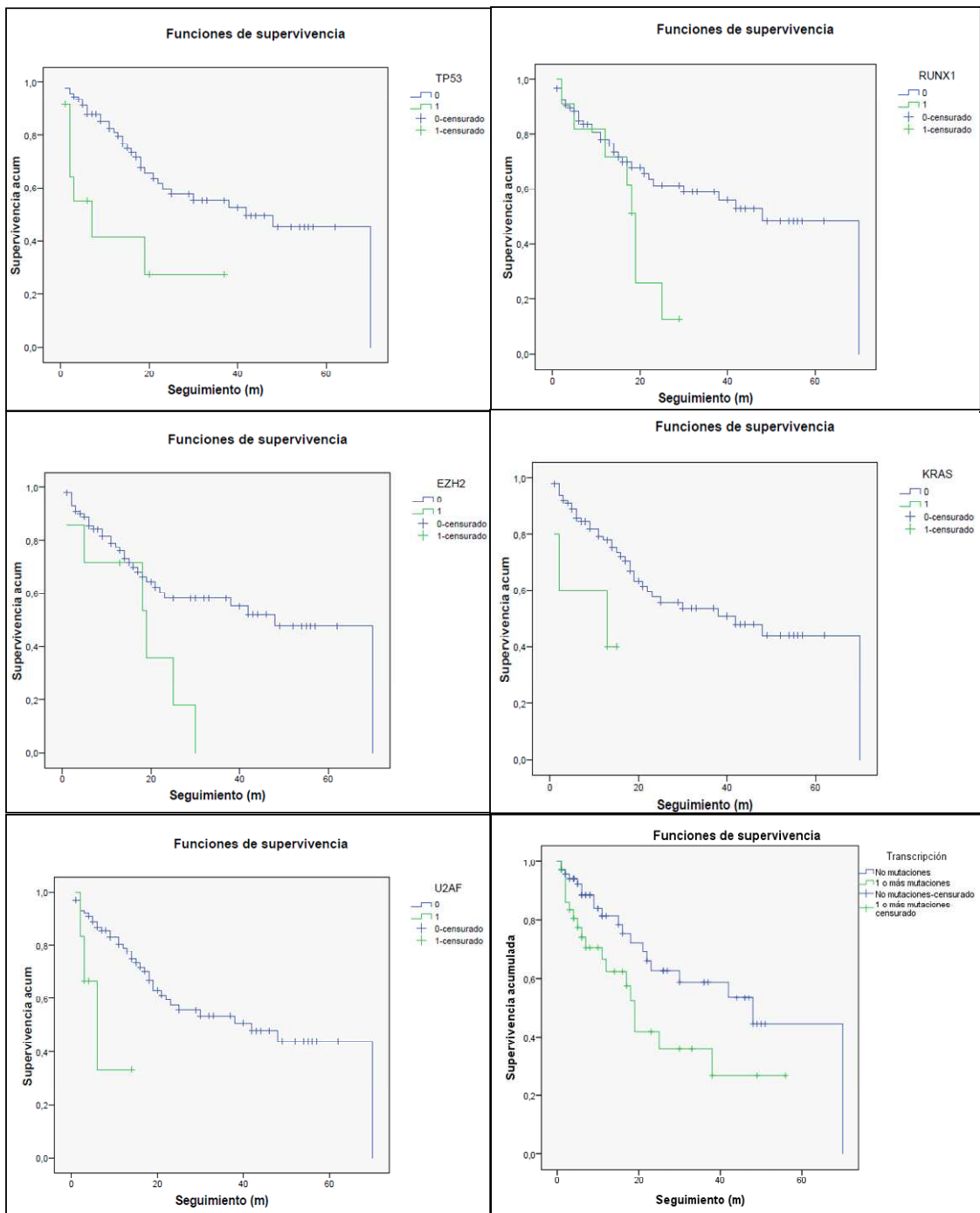


Figura 4.17. Curvas de supervivencia en función de presencia de mutación (1) o no (0) de los genes *TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, *U2AF1*, y con presencia de alguna mutación en la vía de transcripción.

4.2.7. Scores pronósticos moleculares

Bejar y col. encontraron que 5 genes presentaban impacto en la supervivencia global **TP53**, **EZH2**, **RUNX1**, junto con **ETV6** y **ASXL1**, estos dos últimos no han llegado a alcanzar significación en nuestra serie. Haferlach y col. también encontraron significación estadística para los genes **ASXL1**, **KRAS**, **RUNX1**, **TP53**, junto con **NMP1** y **PRPF8**.

Evaluando en nuestra serie el impacto del denominado “Score Bejar”, con presencia o ausencia de alguna mutación en los 5 genes en los que encontraron impacto pronóstico, (**TP53**, **EZH2**, **RUNX1**, **ETV6** y **ASXL1**), se confirmó el pronóstico adverso de la presencia de al menos 1 mutación en estos genes ($p=0,002$; HR: 2,6). Ver tabla 4.10 y figura 4.18.

De la misma forma, consideramos nuestro propio score pronóstico (**score “12 octubre”**), definiendo la presencia de mutación en uno o más de los genes que hemos encontrado significativos para supervivencia (**TP53**, **EZH2**, **RUNX1**, **KRAS** y **U2AF1**). La presencia de mutaciones en estos genes implicaba disminución de supervivencia global de forma muy significativa ($p<0,001$; HR: 4,2).

Se conservaba este impacto pronóstico si combinamos ambos scores (**Bejar y 12 Octubre**), en un **score molecular pronóstico**, considerando la presencia o no de mutaciones en los 7 genes: **TP53**, **EZH2**, **RUNX1**, **ETV6**, **ASXL1**, **KRAS** y **U2AF1** ($p=0,001$; HR: 3,0).

	Supervivencia Media (IC 95%) (meses)	p	HR (IC 95%)
SCORE BEJAR			
TP53, EZH2, RUNX1, ETV6 y ASXL1			
No mutados	48 (39-56)	0,002	2,6 (1,3-4,9)
1 o más mutados	27 (18-35)		
SCORE 12 Octubre			
TP53, EZH2, RUNX1, KRAS y U2AF1			
No mutados	47 (39-56)	<0,001	4,2 (2,1-8,4)
1 mutación	16 (11-22)		
2 mutaciones o más	12 (5-19)		
SCORE MOLECULAR PRONÓSTICO			
TP53, EZH2, RUNX1, ETV6, ASXL1, KRAS y U2AF1			
No mutados	47 (37-57)	0,001	3,0 (1,5-5,8)
1 o más mutados	24 (16-31)		

Tabla 4.10. Scores moleculares con significación pronóstica en supervivencia

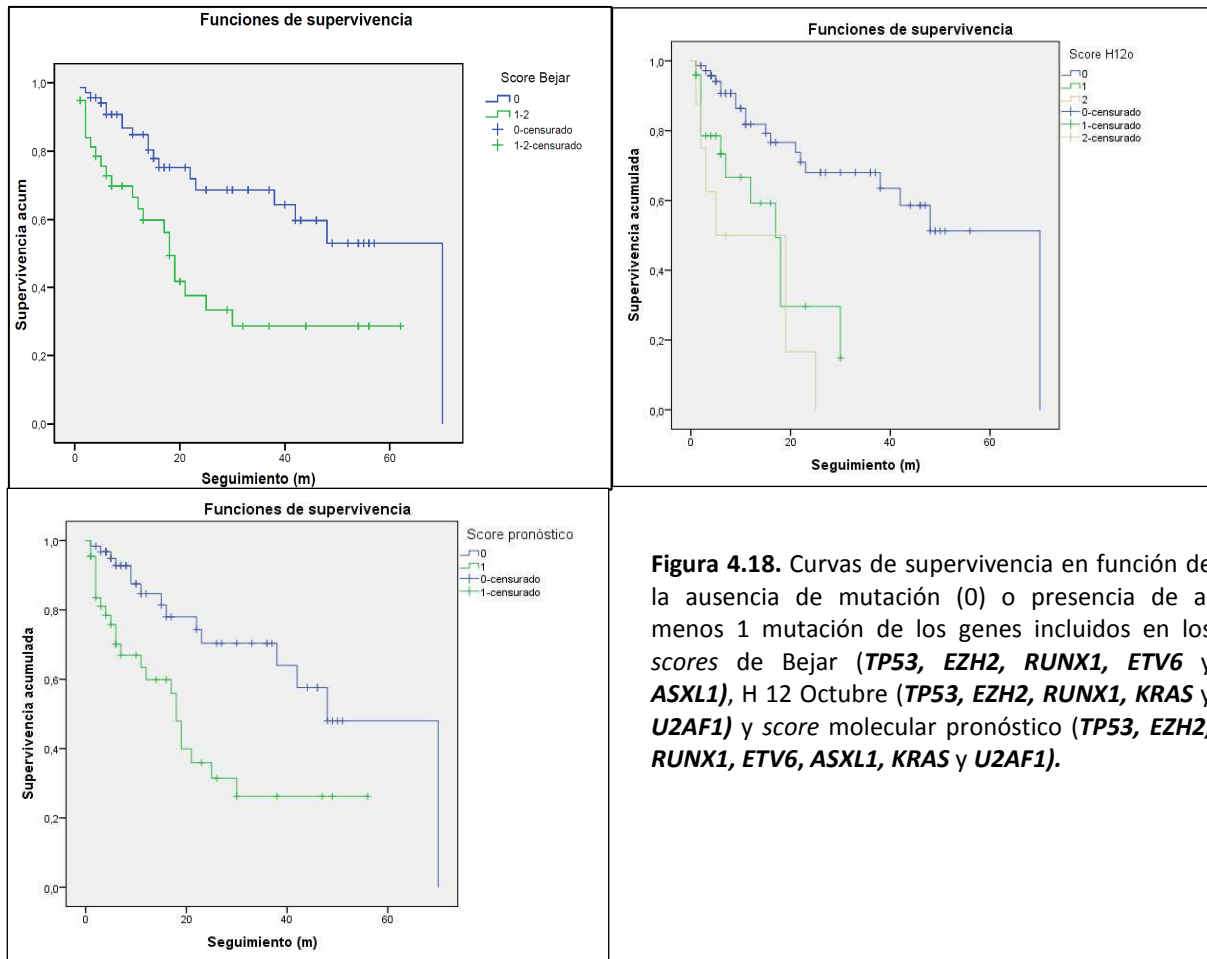


Figura 4.18. Curvas de supervivencia en función de la ausencia de mutación (0) o presencia de al menos 1 mutación de los genes incluidos en los scores de Bejar (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *ETV6* y *ASXL1*), H 12 Octubre (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *KRAS* y *U2AF1*) y score molecular pronóstico (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *ETV6*, *ASXL1*, *KRAS* y *U2AF1*).

4.2.8. Impacto de marcadores moleculares en función del riesgo

Considerando las variables clínicas pronósticas reconocidas en SMD y englobadas en el índice pronóstico IPSSr (que incluye citopenias en sangre periférica, citogenética, y porcentaje de blastos en médula ósea), agrupamos a los pacientes en tres categorías de riesgo: **riesgo bajo** (IPSSr muy bajo y bajo), **riesgo intermedio** (IPSSr intermedio) y **riesgo alto** (IPSSr alto y muy alto).

Se realizó análisis del impacto en la supervivencia global en cada subgrupo de riesgo de pacientes en función de la presencia de mutaciones incluidas en los scores de **Bejar**, **12 Octubre** y **score molecular pronóstico**. El análisis del impacto individual de las mutaciones *TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *KRAS*, y *U2AF1* no se pudo llevar a cabo debido a la baja frecuencia de estas mutaciones al dividir en subgrupos.

En los tres subgrupos de riesgo, presentar al menos una de las mutaciones incluidas en los **scores de Bejar, 12 Octubre y score molecular pronóstico** implicaba peor supervivencia, según reflejan las medias de supervivencia según score pronóstico y subgrupo de riesgo (tabla 4.11, 4.12 y 4.13).

En los tres scores, los pacientes con riesgo bajo alcanzaban una media de supervivencia entorno a 50 meses, en el caso de ausencia de mutaciones de riesgo, frente a una media de 25-35 meses cuando presentaban alguna mutación de riesgo. En los grupos de riesgo intermedio y alto, su supervivencia media estaba entorno a 30 meses, en ausencia de mutaciones de riesgo, frente a 4-15 meses en el caso de presentar mutaciones asociadas a cualquiera de estos scores.

Aunque las diferencias encontradas en supervivencia son relevantes desde el punto de vista clínico, sólo se alcanza significación estadística en los subgrupos de alto riesgo en cualquiera de los scores pronósticos, y en el de riesgo intermedio en el **score 12 Octubre**.

Esto significa que la presencia de al menos una mutación de riesgo conduce a empeorar todavía más el pronóstico, sobre todo en los grupos de pronóstico adverso, según las variables clínicas habitualmente consideradas, y englobadas en el índice pronóstico IPSSr (ver figuras 4.19, 4.20 y 4.21). Y de la misma forma, pacientes con factores de riesgo clínico desfavorables, en ausencia de marcadores moleculares adversos presentan datos de supervivencia superiores a los esperados.

Score Bejar		Supervivencia Media (meses)	IC 95%	p
RIESGO BAJO	No mutaciones	50	37-62	0,665
	1 o más mutaciones	37	24-51	
RIESGO INTERMEDIO	No mutaciones	28	15-41	0,525
	1 o más mutaciones	19	6-32	
RIESGO ALTO	No mutaciones	34	23-46	0,015
	1 o más mutaciones	13	8-17	

Tabla 4.11. Diferencias en supervivencia en cada subgrupo de SMD en función de presencia o no de mutaciones de impacto pronóstico adverso (score Bejar).

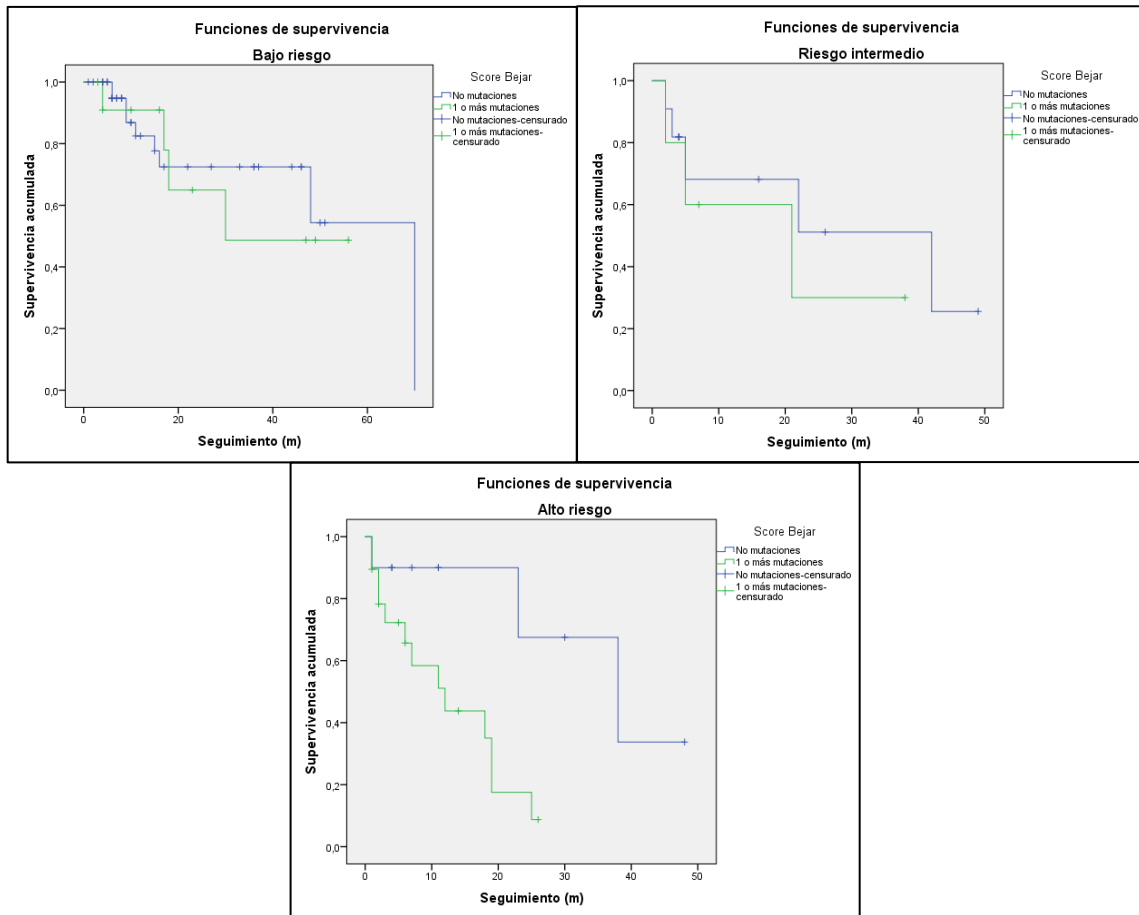


Figura 4.19. Curvas de supervivencia en los tres grupos de riesgo (bajo, intermedio, alto) en función de ausencia de mutaciones (0), o presencia de al menos una mutación de impacto pronóstico adverso en Score Bejar.

Score H 12 Octubre	Supervivencia Media (meses)	IC 95%	p
RIESGO BAJO			
No mutaciones	53	42-64	0,100
1 o más mutaciones	22	14-29	
RIESGO INTERMEDIO			
No mutaciones	31	20-42	0,024
1 o más mutaciones	4	2-6	
RIESGO ALTO			
No mutaciones	30	20-41	0,012
1 o más mutaciones	12	7-17	

Tabla 4.12. Diferencias en supervivencia en cada subgrupo de SMD en función de presencia o no de mutaciones de impacto pronóstico adverso (score 12 Octubre).

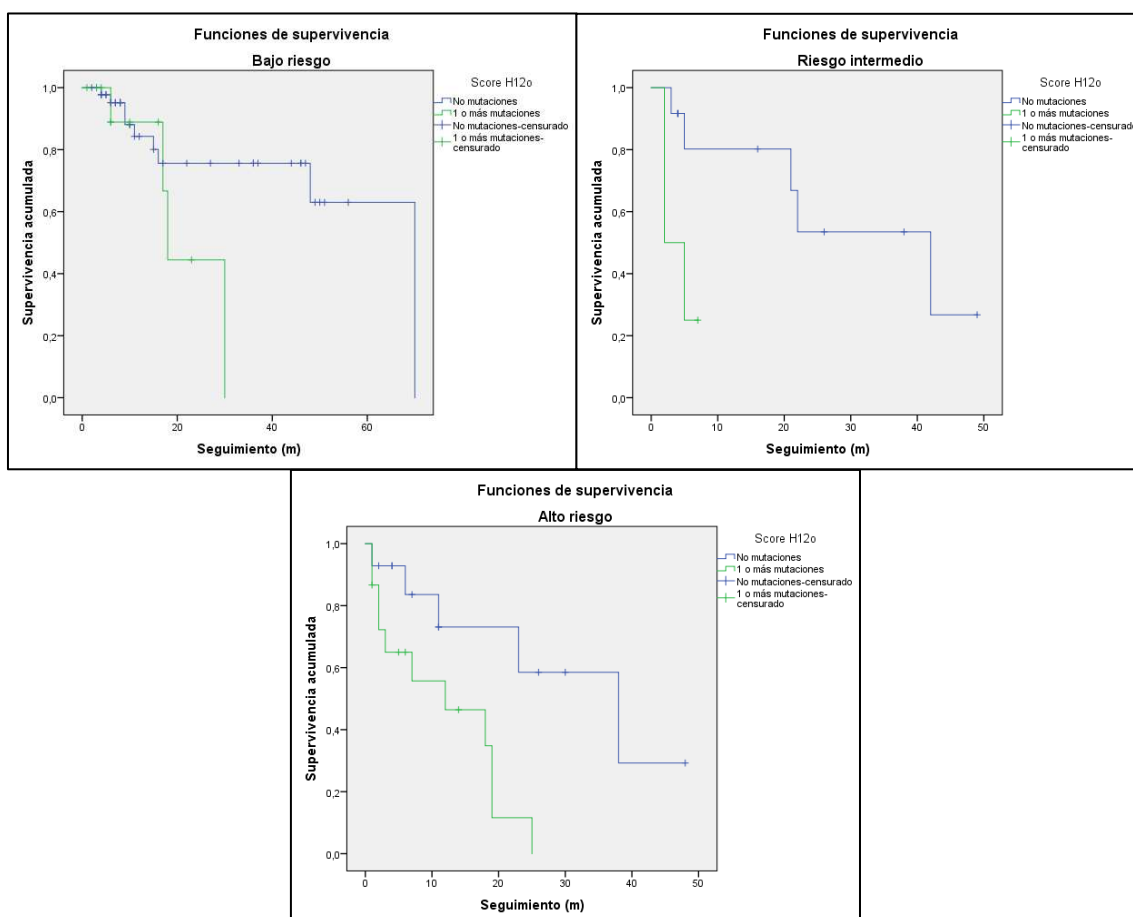


Figura 4.20. Curvas de supervivencia en los tres grupos de riesgo (bajo, intermedio, alto) en función de ausencia de mutaciones (0), o presencia de al menos una mutación de impacto pronóstico adverso en Score 12 Octubre.

Score molecular pronóstico	Supervivencia Media (meses)	IC 95%	p
RIESGO BAJO			
No mutaciones	51	38-64	0,344
1 o más mutaciones	35	22-48	
RIESGO INTERMEDIO			
No mutaciones	31	17-44	0,176
1 o más mutaciones	16	4-28	
RIESGO ALTO			
No mutaciones	32	23-46	0,015
1 o más mutaciones	12	8-17	

Tabla 4.13. Diferencias en supervivencia en cada subgrupo de SMD en función de presencia o no de mutaciones de impacto pronóstico adverso (score molecular pronóstico).

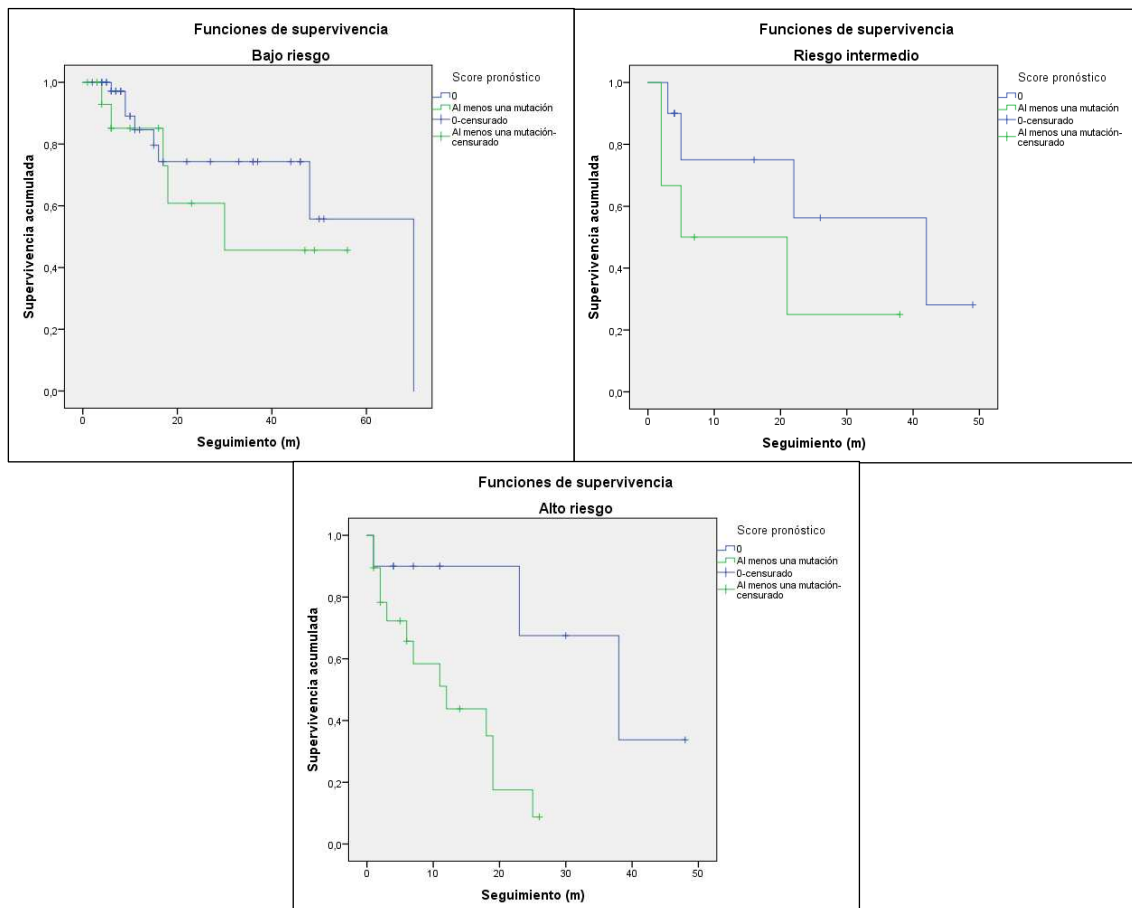


Figura 4.21. Curvas de supervivencia en los tres grupos de riesgo (bajo, intermedio, alto) en función de ausencia de mutaciones (0), o presencia de al menos una mutación de impacto pronóstico adverso.

4.2.9. Impacto de la acumulación de mutaciones

Considerando que la media de presentación de mutaciones por paciente estaba cerca de 2 variantes/muestra, analizamos si la presencia de más de dos mutaciones impactaba en la supervivencia.

En el análisis univariante, la adquisición de más de 2 mutaciones, versus no tener o tener 2 o menos, conllevaba un impacto negativo en la supervivencia global ($p=0,001$; HR: 2,9), ver tabla 4.14 y figura 4.22.

	Supervivencia (meses) Media (IC 95%)	p	HR (IC 95%)
Nº MUTACIONES			
0-2	48 (40-57)	0,001	2,9 (1,5-5,7)
>2	24 (16-32)		

Tabla 4.14. Impacto en la supervivencia en función del número de mutaciones adquiridas

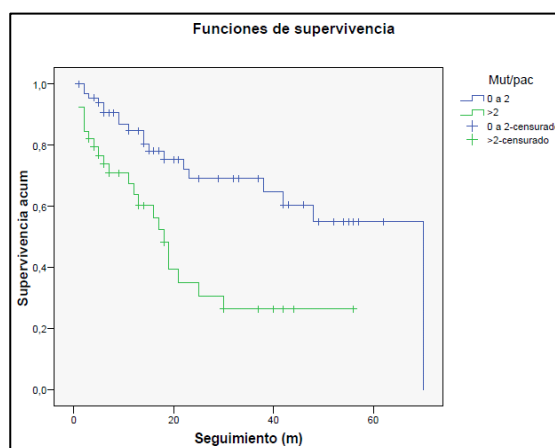


Figura 4.22. Curvas de supervivencia global en función de presentar de 0-2 mutaciones versus más de 2.

4.2.10. Análisis de variaciones en el número de copias

En 85 de los 106 pacientes (80%) se detectaron alteraciones en el número de copias (*copy number variation*: CNV) en al menos 1 de los genes estudiados. La media de alteraciones encontradas por paciente fue de 4,3 CNV/paciente (rango 0-34). Hubo 4 pacientes que presentaban alteraciones (ganancias o pérdidas) en los 34 genes analizados.

Las variaciones del número de copias se encontraron con mayor frecuencia en los siguientes genes: **HRAS** y **ATRX** (en el 41 y 39% de los pacientes, respectivamente), **GATA1** (34%), **SF1** (34%), y **TET2** (27%), con frecuencia entre 10-20%: **ETV6**, **KIT**, **EZH2**, **MPL**, **U2AF1**, **JAK2**, **MLL**, **ASXL1**, **SRSF2** y **KRAS** (ver tabla 4.15).

<i>GEN</i>	<i>Frecuencia CNV (%)</i>	<i>Tipo variación</i>
HRAS	41	Ganancia
ATRX	39	Pérdida
GATA1	34	Pérdida
SF1	34	Ganancia
TET2	27	Pérdida
ETV6	19	Ganancia
TET2	18	Pérdida
KIT	18	Pérdida
EZH2	14	Pérdida
MPL	13	Ganancia
U2AF1	13	Ganancia
JAK2	12	Ganancia
MLL	11	Ganancia
ASXL1	10	G/P
SRSF2	10	Ganancia
KRAS	10	Pérdida

Tabla 4.15. Frecuencia de CNV en los genes analizados, y descripción del tipo de variación adquirida mayoritariamente (ganancia, pérdida, o ambas G/P)

En la siguiente Figura 4.23, se describe gráficamente la distribución de las variaciones en el número de copias, por gen analizado y por paciente, agrupando éstos según clasificación de bajo riesgo, alto riesgo y NMPC/SMD. El código de color utilizado se especifica a continuación:

CNV	Total	Parcial
<i>Pérdida</i>		
<i>Ganancia</i>		
<i>Ganancia/Pérdida</i>		

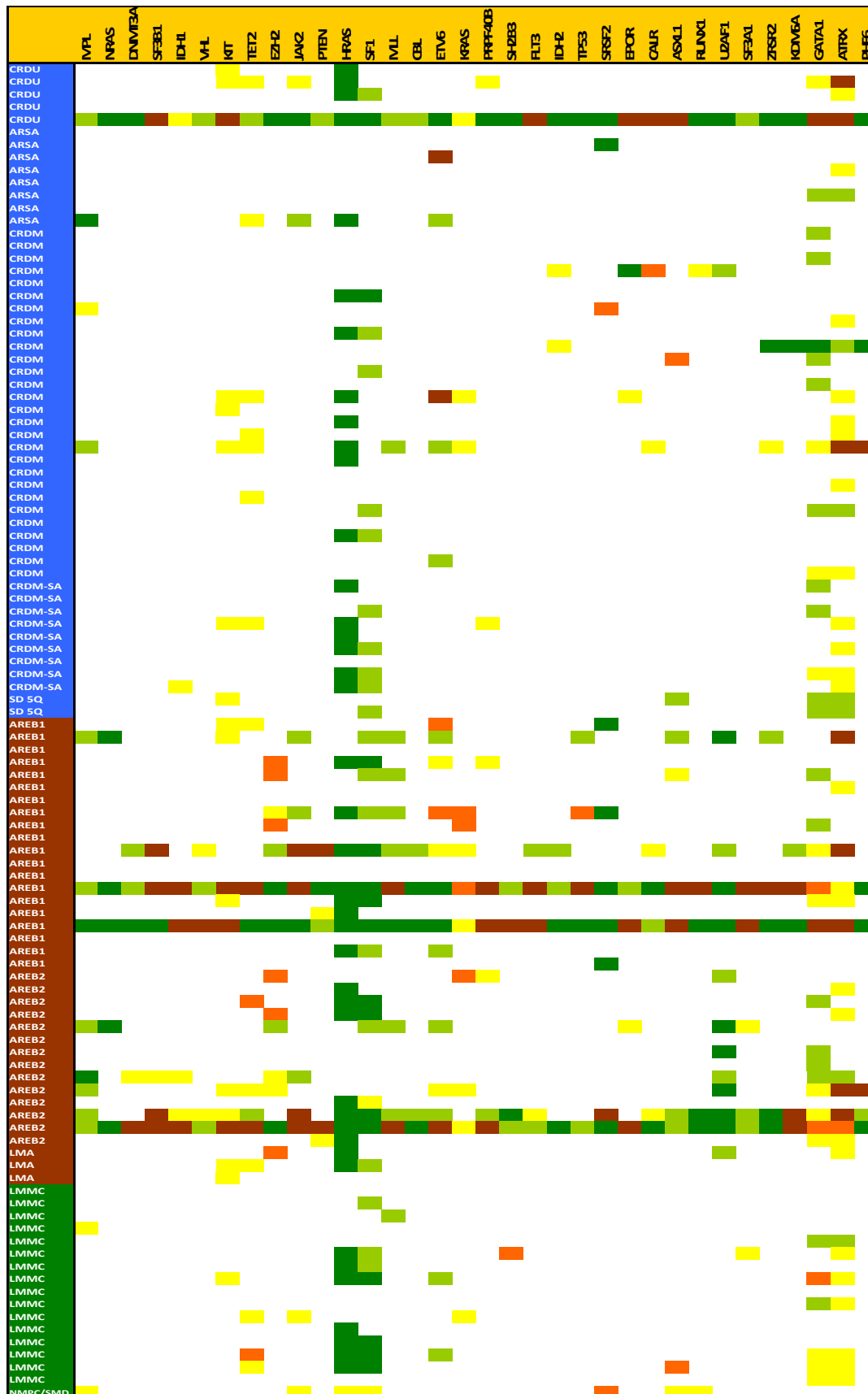


Figura 4.23. Distribución de CNV en los genes y muestras analizadas

Analizando los genes afectados con CNV y el tipo de variación, destacaba que los genes que con mayor frecuencia presentaban variaciones en el número de copias se localizaban en tres cromosomas (cromosomas 11, X, y 4), y que además los genes que se hallan en el mismo cromosoma, presentaban alteración del número de copias en el mismo sentido, es decir, predominio de ganancias o pérdidas de copias. Esto viene a confirmar que las alteraciones del número de copias afectan no sólo a un gen, sino a partes de un cromosoma.

Así, en el cromosomas 11 (**HRAS** y **SF1**), presentaban ganancia de número de copias, en el cromosoma X (**GATA1** y **ATRX**), pérdida de número de copias, y en el cromosoma 4 (**TET2** y **KIT**), ambos también con pérdida de copias.

En el estudio de asociación entre las alteraciones en CNV de estos genes, se obtuvo una relación significativa entre **HRAS** y **SF1** ($p < 0.001$), entre **GATA1** y **ATRX** ($p < 0.001$), y entre **TET2** y **KIT** ($p < 0.001$).

En el análisis de la relación entre las variables clínicas (diagnóstico OMS, niveles de hemoglobina, plaquetas y leucocitos al diagnóstico, riesgo citogenético e índice pronóstico internacional revisado) y la presencia de CNV en estos genes, no se encontró ninguna asociación significativa. Se distribuía de forma proporcional en pacientes con bajo y alto riesgo.

En las siguientes figuras (4.24 y 4.25), se representa la distribución de las alteraciones de CNV en función de los grupos OMS y del riesgo pronóstico según IPSSr, respectivamente.

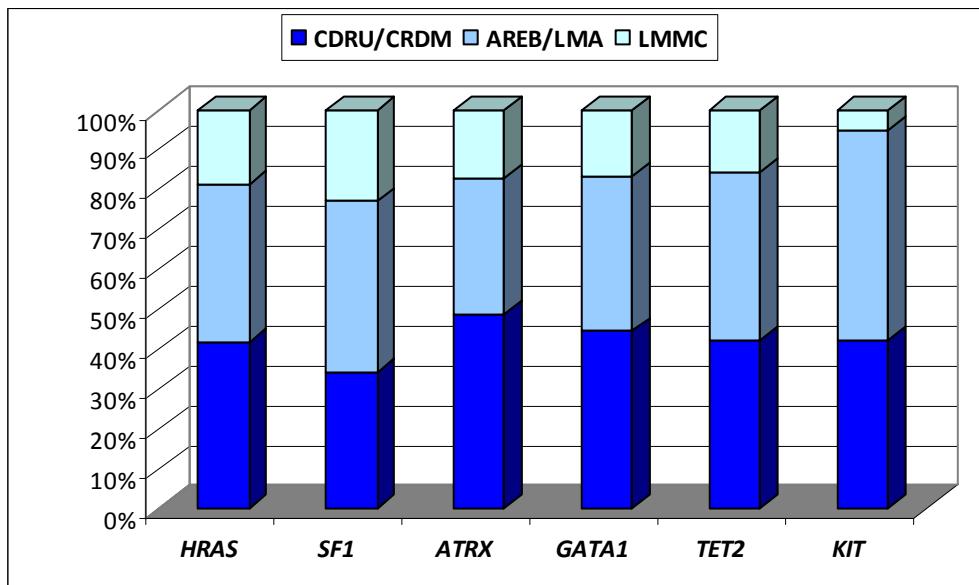


Figura 4.24. Distribución de CNV en los 6 genes más frecuentes, con representación proporcional en los diferentes grupos diagnósticos de la OMS.

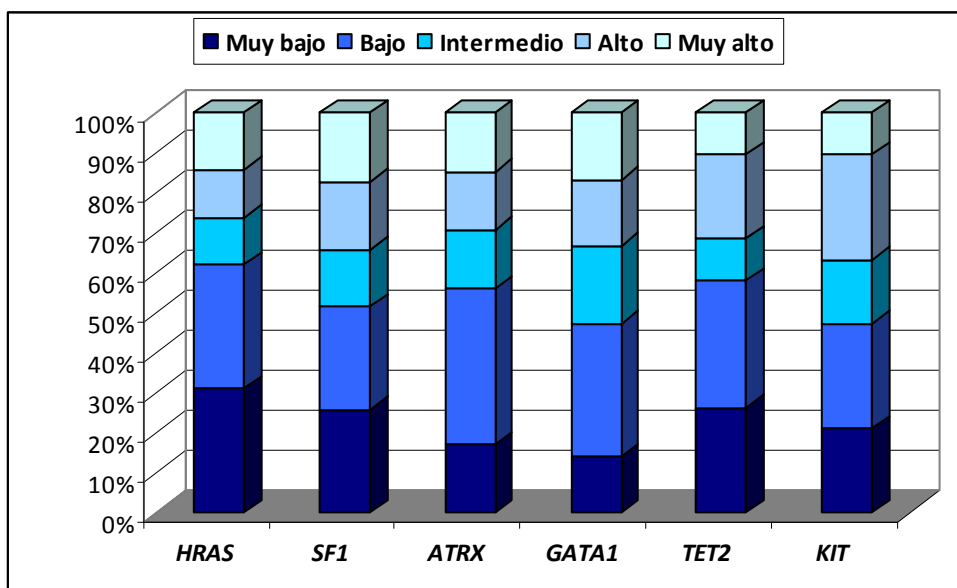


Figura 4.25. Distribución de CNV en los 6 genes más frecuentes, con representación proporcional en los diferentes grupos pronósticos del IPSSr.

En el análisis univariante, en la serie global de pacientes, la presencia de CNV en cualquiera de estos genes, no implicaba cambios significativos en supervivencia (figura 4.26).

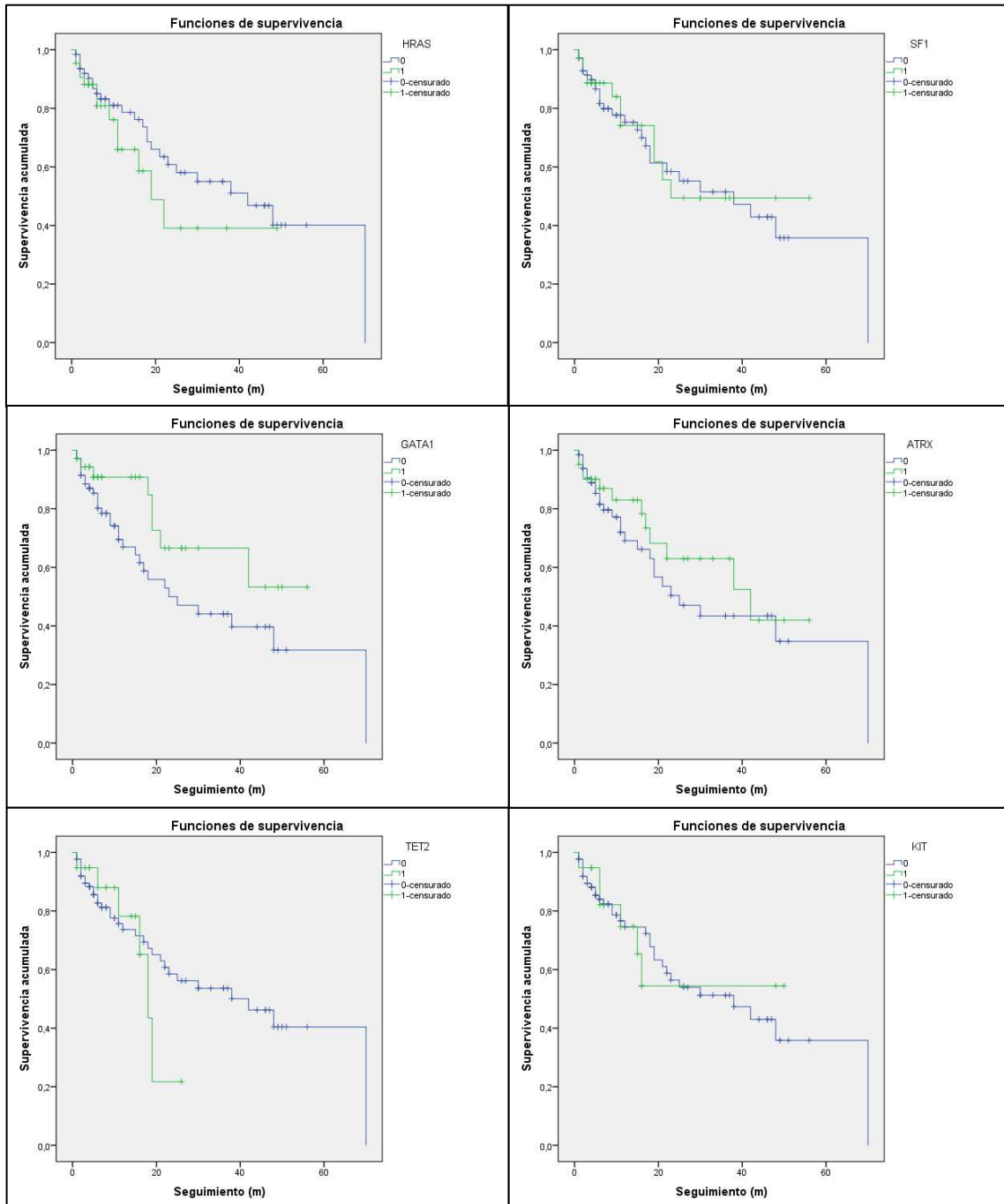


Figura 4.26. Curvas de supervivencia en pacientes con SMD en función de presencia (1) o ausencia (0) de CNV en los genes *HRAS*, *SF1*, *GATA1*, *ATRX*, *TET2* y *KIT*.

Sin embargo, en el análisis multivariante, considerando tanto variables clínicas (edad, sexo, niveles de hemoglobina, plaquetas y leucocitos, porcentaje de blastos en médula ósea, clasificación OMS, riesgo citogenético, índice pronóstico IPSS e IPSSr), como la presencia o no de CNV en estos 6 genes, tanto la presencia de CNV en **GATA1**, como en **HRAS**, junto con niveles de hemoglobina y plaquetas al diagnóstico presentan significación estadística en el modelo.

La presencia de CNV en **HRAS** constituye un factor de riesgo para la supervivencia ($p= 0,011$; HR: 3,3, IC95%: 1,4-7,7), mientras que la presencia de CNV en **GATA1** resulta un factor protector ($p= 0,006$; HR: 0,3, IC95%: 0,1-0,8).

Consideramos a los pacientes agrupados en tres categorías de riesgo: riesgo bajo (IPSSr muy bajo y bajo), riesgo intermedio (IPSSr intermedio) y riesgo alto (IPSSr alto y muy alto), y realizamos el análisis estratificado en función del riesgo y de la presencia o no de CNV en estos dos genes (**GATA1** y **HRAS**).

La presencia de CNV en **GATA1** mejoraba la supervivencia en aquellos pacientes de riesgo bajo ($p= 0,016$) (figura 4.27). A pesar de que ambos grupos presentaban valores similares al diagnóstico de hemoglobina, eritropoyetina, ferritina, porcentaje de blastos en médula ósea, los pacientes con CNV en GATA1 respondían en mayor porcentaje al tratamiento con eritropoyetina, aunque no se alcanzase significación estadística con el número reducido de pacientes (tabla 4.16).

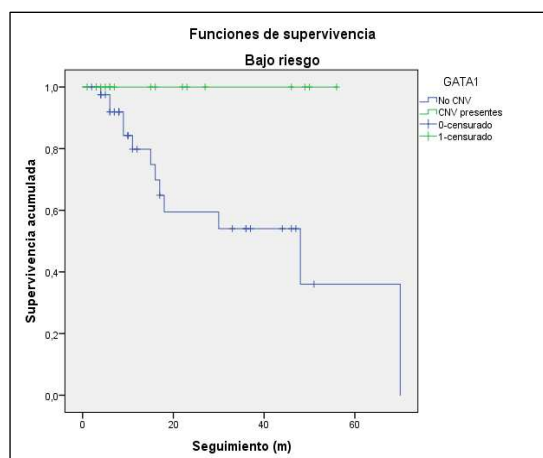


Figura 4.27. Curvas de supervivencia en pacientes de bajo riesgo con presencia o no de CNV en GATA1, y en pacientes de alto riesgo con presencia o no de CNV en HRAS.

SMD BAJO RIESGO	Media	CNV GATA1 N = 18	No CNV GATA1 N = 42	p
Hemoglobina (g/dl)		11	10,5	0,46
EPO basal (UI/L)		312	134	0,43
Ferritina (ng/ml)		390	461	0,54
% Blastos MO		3	3	0,88
% CG buen/muy buen pronóstico		94	89	0,54
%Respuesta a EPO		60	45	0,44
Supervivencia (m)		26	22	0,006

Tabla 4.16. Comparación entre los pacientes con SMD de bajo riesgo con o sin CNV en **GATA1**.

Por el contrario, CNV en **HRAS** implicaba peor supervivencia en pacientes de alto riesgo ($p=0,001$). A pesar de que el grupo de pacientes con CNV en HRAS y el de no CNV en HRAS no presentaban diferencias relevantes al diagnóstico (en recuentos de sangre periférica, porcentaje de blastos en médula ósea, o proporción de paciente con citogenética de alto y muy alto riesgo).

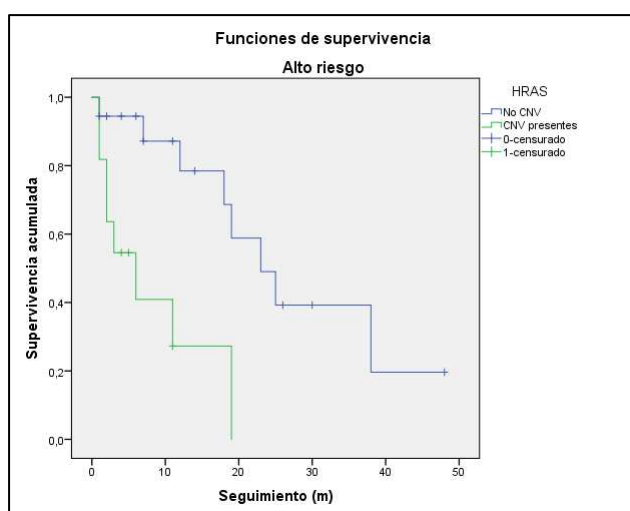


Figura 4.28. Curvas de supervivencia en pacientes de alto riesgo con presencia o no de CNV en HRAS.

SMD ALTO RIESGO	Media	CNV HRAS N = 11	No CNV HRAS N = 18	p
Hemoglobina (g/dl)		8,5	9	0,53
Plaquetas (x10⁹/L)		98	92	0,54
Neutrófilos (x10⁹/L)		1,4	1,4	0,86
% Blastos MO		12	10	0,34
% CG mal/muy mal pronóstico		45	61	0,41
Supervivencia (m)		7	18	0,011

Tabla 4.17. Comparación entre los pacientes con SMD de alto riesgo con o sin CNV en **HRAS**.

Estos resultados habrán de ser confirmados en un grupo mayor de pacientes.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Actualmente, el diagnóstico de SMD constituye la integración de datos clínicos, analíticos, morfológicos y citogenéticos. Aun así, existen casos no concluyentes de citopenias que no cumplen los criterios de displasia en alguna de las series hematopoyéticas por morfología.

La incorporación a la rutina de diagnóstico en estos pacientes de otras técnicas, nos pueden aportar una valiosa ayuda al diagnóstico, así como incluso a marcar factores pronósticos, tan importantes en esta enfermedad tan heterogénea en su presentación y en su evolución.

5.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN PACIENTES Y CONTROLES.

Cuando una muestra con sospecha de SMD no cumple los criterios definitivos para el diagnóstico, dentro de los co-criterios aceptados se incluye la presencia de alteraciones en el inmunofenotipo de serie mieloide o eritroide, que apoyen el diagnóstico de SMD (6). También puede contribuir a definir el diagnóstico diferencial entre entidades reconocidas por la OMS, como las citopenias refractarias con displasia unilínea (CRDU) versus las citopenias de significado incierto (ICUS).

5.1.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES INMUNOFENOTÍPICAS

Desde el grupo internacional de trabajo de la *European LeukemiaNet*, se trabajó en elaborar unos criterios para estandarizar el estudio mediante CMF en muestras de pacientes con sospecha de SMD (51, 52).

Sin embargo, como ellos mismos afirman en sus conclusiones, estas recomendaciones deben ser validadas en otras situaciones. La capacidad de diagnóstico no sólo debe evaluarse frente a controles sanos, sino también frente a personas de edad similar a los pacientes con SMD, en los cuales puede haber alteraciones inmunofenotípicas que no han sido claramente estudiadas. Tampoco se conoce el valor diagnóstico que presenta frente a otras citopenias de causas no clonal, o médulas en situaciones de estrés. Además, para establecer un sistema de

puntuación con valor pronóstico, habría que verificar qué alteraciones son de mayor peso, y ponderarlas en consecuencia.

Aplicamos estas recomendaciones de análisis al panel definido en nuestro laboratorio para diagnóstico de SMD (descripción en Material y Métodos), y lo aplicamos a pacientes con citopenias en los que el objetivo era descartar SMD. Un total de 55 pacientes diagnosticados de SMD y de 51 controles, con citopenias de diferentes orígenes (autoinmunes, toxicidad por fármacos, hiperesplenismo, hipoplasia, otras enfermedades no hematológicas). Nos propusimos este grupo control porque son también los que plantean mayores dificultades desde el punto de vista citológico, debido a que rasgos displásicos pueden ser producidos por alguna de estas situaciones sin que ello implique el diagnóstico de SMD.

Aunque la media de edad fue inferior en el grupo control (62 años versus 75 años en los pacientes), debido a la inclusión de algún paciente pediátrico, la mediana de edad era de 72,5 y 75 años, respectivamente.

No encontramos diferencias entre los niveles de plaquetas, neutrófilos o monocitos, o número de citopenias en sangre periférica, considerando, por tanto, que en ambos casos se trataban de pacientes con citopenias a estudio, y no de controles sanos. Sólo hubo una discreta diferencia en los niveles de hemoglobina (11,4 g/dl en controles y 10,2 g/dl en pacientes).

La presencia de blastos en sangre periférica sólo la encontramos en algún paciente y en ninguno de los controles. Considerando que es una célula no habitual en sangre periférica, su presencia nos debe alertar de que algo está sucediendo en la médula ósea, aunque no sea necesariamente de origen hematológico o neoplásico.

La distribución por grupos según clasificación OMS y su clasificación pronóstica por IPSSr estaban representados según distribución aleatoria, dado que no hubo preselección de pacientes y se fueron incluyendo de forma consecutiva.

En el análisis comparativo realizado, encontramos diferencias entre pacientes y controles en todos los compartimentos analizados: progenitores hematopoyéticos, serie mieloide, serie monocítica, y serie eritroide.

En el compartimiento de progenitores hematopoyéticos, las diferencias más importantes fueron en el porcentaje de blastos mieloides sobre celularidad global (2,4% en pacientes versus 0,8% en controles) y en el porcentaje de blastos linfoides sobre el total de blastos, datos similares a los ya publicados (111).

El aumento de blastos mieloides, incluso en aquellos pacientes sin exceso de blastos por citomorfología, es decir con menos de un 5%, es frecuente. Se ha demostrado que un porcentaje de blastos superior a 2% medidos por CMF implica peor pronóstico dentro del grupo sin exceso de blastos (112). Por tanto, la determinación de blastos por CMF puede ser muy útil en el diagnóstico diferencial entre controles y pacientes, y adicionalmente presentar un relevante valor pronóstico.

Por otro lado, en mayoría de estudios, se ha descrito la disminución del porcentaje de blastos linfoides, como se ha confirmado en nuestra experiencia. Aunque recientemente, en un análisis comparando pacientes con SMD y con citopenias reactivas, aquellos con más de 55 años también pueden presentar esta disminución (113). Por ello, la disminución de la fracción de blastos linfoides es un parámetro a considerar, aunque habrá que tener en cuenta que la edad puede tener influencia junto con el componente displásico.

En relación con las aberrancias antigénicas más frecuentemente detectadas fueron la pérdida de heterogenicidad en la expresión CD34/CD117 (44%), junto con asincronía madurativa con expresión de CD11b/CD15 o alteración en la expresión de CD13/CD33 (11%). Los resultados comunicados por diferentes grupos en cuanto a las aberrancias antigénicas se encuentran en este rango, alteraciones en expresión de CD117 en un 15-64%, en CD45 entre 5-43%, y expresión de CD11b/CD15 en un 30-56%.

A diferencia de otras publicaciones (31, 38, 39, 42, 114) que encuentran expresiones aberrantes de marcadores con infidelidad de línea en un 20-40% de los pacientes con SMD, en nuestros casos no encontramos expresión aberrante de CD56, CD7, CD10, CD19 en los blastos mieloides de nuestros pacientes, incluso en aquellas muestras con exceso de blastos. Ogata y col. encontraron que este parámetro presentaba mayor variabilidad interlaboratorios (40).

En cuanto a la serie mielóide, no encontramos diferencias en la relación neutrófilos/linfocitos, que se puede esperar disminuida en pacientes con SMD, aunque probablemente se deba a que parte de nuestros controles tenían también neutropenia. La menor complejidad encontrada en la s. granulocítica de los pacientes frente a los controles (medida por el pico máximo de la complejidad) constituye una de las alteraciones que se repiten con más frecuencia en los diferentes estudios realizados (27, 41, 42, 39, 114, 115), en rango variable, entre un 16 y un 84% de las muestras de SMD.

Las alteraciones en el patrón madurativo CD11b/CD13/CD16 encontradas en el 60% de los pacientes reproducen valores publicados previamente, Starchuski y col. encuentran esta aberrancia en el 48-56% de los casos (39), van Loosdrecht en un 64% y Steltler en un 78% (38, 27). Otras alteraciones menos frecuentes, en la expresión de CD15 y CD10 (33% pacientes en nuestro estudio), también han sido comunicadas, con frecuencias variables entre 11-60% (27, 39, 41, 114). En los controles, sólo encontramos un caso que presentaba ausencia de expresión de CD10 en granulocitos maduros, hallazgo que está descrito también en neutropenias de origen autoinmune (39).

En los pacientes con SMD, se encontraba aumentada proporcionalmente la serie monocítica, y como alteraciones más frecuentes la expresión de CD56 (27% de los casos) y aberrancias en el esquema de maduración CD36/CD14 y/o infraexpresión de CD33/CD13 (en un 16%). La expresión de CD56 sobre monocitos no es un rasgo exclusivo de displasia, también se puede observar en hematopoyesis en regeneración, activación y respuesta inflamatoria (52), pero es un marcador que puede hacernos sospechar de displasia (en ausencia de las condiciones previas descritas) incluso antes de que los rasgos morfológicos sean evidentes. Su presencia en SMD no es infrecuente, entre 14-48% en la mayoría de las series (27, 38, 39, 41, 42, 114)

Nuestro panel de análisis es muy limitado para el estudio de diseritropoyesis. En algunos pacientes (15%) detectamos expresión disminuida de CD36, pero la valoración adecuada de la displasia en serie eritroide se requiere incluir más marcadores (CD71, CD235a).

En los estudios publicados hasta el momento, cada grupo que ha analizado las aberrancias por CMF de las poblaciones mielomonocíticas en pacientes con SMD ha utilizado marcadores bastante comunes, pero las estrategias de análisis han sido diferentes. Sin embargo, aunque

esto podría conducir a gran variabilidad, hay resultados que son constantes y, por tanto, reproducibles en diferentes laboratorios.

El aumento de blastos mieloides, con la disminución de la fracción correspondiente a blastos linfoides, y la presencia de algunas expresiones aberrantes se encuentran de forma no infrecuente en pacientes con SMD.

La pérdida de complejidad en la serie mieloide y alteraciones en el patrón de maduración CD11b/CD13/CD16 constituyen las alteraciones más frecuentes en relación con la disgranulopoyesis.

La expresión de CD56 en monocitos es un marcador muy útil, excluyendo situaciones de regeneración o inflamación.

5.1.2. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL "SCORE DIAGNÓSTICO" DE OGATA

Una de las propuestas para despistaje de SMD por inmunofenotipo, consiste en el "score diagnóstico" (40), en el que una puntuación de dos o superior fue más frecuente en pacientes con SMD. La ventaja que presenta es que los parámetros que puntúan son aplicables en la mayoría de los laboratorios (porcentaje de blastos mieloides, fracción de blastos linfoides del total de blastos, expresión de CD45 en mieloblastos, y el pico de máxima fluorescencia de la complejidad en granulocitos). El score fue validado en una cohorte de pacientes en Italia y otra en Japón.

Aplicando este score a nuestras muestras de pacientes y controles, alcanzamos una sensibilidad del 53%, algo inferior a la publicada (65% en Japón y 89% en Italia), pero con una especificidad del 96%, similar a las publicadas (98% en Japón y 90% en Italia).

Se trata de una herramienta muy válida para el diagnóstico de SMD, con una alta especificidad. Si consideramos que establecer el diagnóstico de SMD presenta implicaciones importantes desde el punto de vista pronóstico, el objetivo es obtener la mayor especificidad posible.

Además estos rangos de sensibilidad y especificidad son similares a los otros sistemas más complejos (28).

5.1.3. RESULTADOS DEL DISEÑO DE UNA BASE DE DATOS DE MADURACIÓN

Uno de los datos significativos en la evaluación de la displasia, consiste en detectar alteraciones en la maduración mieloide, en la que se van produciendo una ganancia y pérdida de expresión de ciertos marcadores según las etapas madurativas alcanzadas.

Para ello, hay que establecer claramente el patrón considerado “normal” para poder encontrar patrones “aberrantes” que se desvíen de esta normalidad. Sin embargo, estas diferencias no son fáciles de establecer en todas las ocasiones, más teniendo en cuenta que no se dispone de este patrón “normal” de una forma sistemática. Esto se refleja en los intentos de estandarización realizados por algunos grupos para establecer unas pautas de análisis que garanticen la reproducibilidad de los patrones de maduración (39, 116, 117). Otros investigadores apuestan por marcadores que estén menos sujetos a variabilidad según los observadores (118).

La posibilidad de diseñar una base de datos de maduración mieloide con la herramienta del programa de análisis *Infinicyt*[®], nos permite, por un lado establecer nuestro patrón de “normalidad”, y por otro lado, nos proporciona un método de análisis objetivo independiente del observador.

La selección de un conjunto de muestras control de pacientes con citopenias de causa no clonal presenta la ventaja de poder discriminar realmente muestras con diagnóstico de SMD de forma más específica (excluyendo posibles alteraciones causadas por infecciones, fármacos, etc.). Por otro lado, la desventaja es menor sensibilidad, puesto que las diferencias entre las muestras control y de pacientes pueden disminuir. Sin embargo, elegimos este tipo de muestras control debido a que son las que nos pueden realmente plantear más problemas en el diagnóstico diferencial con SMD si se tiene en cuenta sólo rasgos displásicos morfológicos.

Construimos una base de datos de maduración mieloide con los marcadores mieloides (CD13, CD11b, CD16 y CD45) que se modifican a lo largo de la maduración (119). Se compararon tanto

las muestras control como las de pacientes para identificar la expresión que se desviaba en 2DE respecto a la media de los controles para cada uno de los estadios madurativos y para cada uno de los marcadores seleccionados (CD13, CD11b, CD16 y CD45).

Los controles presentaron una media de 1,9 desviaciones (rango 0-4), mientras que las muestras de pacientes con SMD presentaban una media de 4,5 desviaciones (rango 0-14). Considerando estos pacientes según riesgo pronóstico (bajo, intermedio, alto), confirmamos que a mayor riesgo, mayor impacto en las desviaciones del patrón normal (media de 3,7 en bajo riesgo; 4,5 en riesgo intermedio; 6,8 en alto riesgo). Remarcar que las puntuaciones más altas son obtenidas por SMD de riesgo intermedio y alto, cuando estamos sólo valorando displasia mieloide, y no porcentaje de blastos ni alteraciones citogenéticas. Es decir, el componente displásico, concretamente la disgranulopoyesis, juega un papel importante también en pacientes de más alto riesgo.

Esta relación entre alteraciones inmunofenotípicas y clasificación de riesgo en SMD ya había sido también comprobada por diferentes grupos. Stachurski y col. (39) observaron que el número de alteraciones inmunofenotípicas en la línea mielomonocítica se incrementaba a medida que se progresaba en clasificación de la OMS (media de 5,3 alteraciones en AR/ARSA; media de 6,9 en CRDM; y media de 7,9 en AREB). Reis-Alves y col. confirmaron que el número de alteraciones inmunofenotípicas aumentaban a mayor riesgo en diferentes clasificaciones: OMS, IPSS, WPSS e IPSSr (120). Alhan y col evaluaron si un score basado en alteraciones inmunofenotípicas (FCSS) podría añadir valor pronóstico al IPSS-R (121). Confirmaron en 159 pacientes que menor número de alteraciones por citometría de flujo se asociaba con mejor supervivencia global y menor riesgo de evolución, mientras que aberrancias en los progenitores mieloides se asociaba con dependencia transfusional y mayor riesgo de progresión.

La evaluación de la base de datos como herramienta diagnóstica basándonos en el diseño de una curva ROC demuestra que es fiable como test diagnóstico ($p= 0,016$). El cálculo del punto óptimo de corte, considerando valores de sensibilidad y especificidad nos permite aproximarnos a dos puntos: **4,5** (sensibilidad 45% y especificidad 100%), para diagnosticar pacientes, aunque con baja sensibilidad, y **3,5** (sensibilidad 59% y especificidad 90%), que nos

hace sospechar la probabilidad de que se trate de un paciente, lo que habrá que intentar confirmar por otros métodos.

Nuestro diseño de la base de datos de maduración nos permite, de una forma objetiva, establecer el diagnóstico de SMD en pacientes (con alta especificidad), pero continuamos con rangos de sensibilidad bajos cuando se utiliza como técnica aislada, resultados similares a los obtenidos en estudios previos (27, 28, 36, 38, 122, 123, 124).

Probablemente, sea debido a que existe un solapamiento en la puntuación entre pacientes con SMD, sobre todo de bajo riesgo, y controles. Por otro lado, sólo estamos evaluando parcialmente los rasgos de dishematopoyesis, concretamente la displasia mieloide, por lo que muestras sólo con diseritropoyesis o dismegacariopoyesis no son tenidos en cuenta.

Una aproximación por citometría de flujo, considerando diferentes aspectos del estudio de dishematopoyesis, puede apoyar el diagnóstico y añadir valor pronóstico.

Consideramos a la luz de nuestros resultados, y en concordancia con recomendaciones previas de otros autores (125), que el informe del estudio de inmunofenotipo debe integrarse en un informe global junto con datos citológicos, citogenéticos y moleculares, si se dispone de ellos.

El “*score diagnóstico*” de Ogata constituye una herramienta fácil de aplicar con fines de despistaje, que hemos reproducido con nuestras muestras, confirmando la alta especificidad y alto valor predictivo positivo.

Si se dispone de un panel más amplio, la aplicación de las recomendaciones del grupo de trabajo de la *European LeukemiaNet*, nos permite caracterizar mejor los cambios displásicos. Al menos tres alteraciones de las características analizadas y en al menos dos compartimentos, nos permiten aproximarnos al diagnóstico de SMD.

Por último, una herramienta útil y objetiva para la evaluación de las alteraciones de la maduración mieloide nos la proporciona el módulo de base de datos de maduración del programa *Infinicyt*[®].

5.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL PERFIL MUTACIONAL EN PACIENTES CON SMD MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA

Además de contribuir al diagnóstico, podría ser de utilidad en el reconocimiento de factores pronósticos o de respuesta al tratamiento. De forma semejante a la LMA, en la que los marcadores moleculares han definido subgrupos de riesgo en pacientes con citogenética normal, en SMD podrían definir pacientes de más riesgo dentro, sobre todo, del grupo de paciente con bajo riesgo clínico y/o citogenético que justificaría incluso el inicio de medidas terapéuticas precozmente.

La tecnología basada en secuenciación profunda de amplicones permite investigar mutaciones con alta sensibilidad y de forma masiva en múltiples muestras. Gracias a estas técnicas de NGS, se puede aplicar un amplio panel de mutaciones para estudiar a los pacientes con patología mieloide.

5.2.1. MUTACIONES EN PACIENTES CON SMD

Analizamos 34 genes relacionados con patología mieloide en nuestros pacientes con SMD mediante NGS. Revisando los paneles de genes analizados por las series amplias publicadas hasta el momento, aunque todos ellos son diferentes, incluyen los genes más relevantes. Así, los trabajos de Pappaemmail y col. (126) y de Haferlach y col. (127), coinciden en 14 de los 15 genes más relevantes y en 22 de los 30 más frecuentes (128).

Por ello, el grupo de Haferlach y col. (129) propone un panel consenso para estudio de mutaciones en SMD y LMA, por secuenciación masiva, que recoge todas las mutaciones relevantes comunicadas en los grandes estudios (55, 126, 127). De los 27 genes propuestos, nuestro panel incluye 21, excluimos *BCOR*, *BRAF*, *CEBPA*, *GATA2*, *NPM1*, *WT1*, la mayoría aplicados a LMA y que ya estudiábamos por otros métodos. Igualmente, el grupo de expertos en SMD de *European LeukemiaNet* aconsejan el estudio molecular si se dispone de él, y del panel de 23 genes más frecuentemente mutados que presentan, nuestro estudio recoge 21 de los mismos.

En la aplicación de nuestro panel de genes en el estudio de 106 casos de pacientes con SMD, encontramos un total de 198 variantes puntuales y/o deleciones/inserciones, que consideramos como mutaciones somáticas en 94 de los 106 pacientes (88.7%). A medida que las técnicas de secuenciación masiva van mejorando profundidad, y por tanto de sensibilidad, y se van ampliando el panel de genes a analizar en paralelo, el porcentaje de pacientes con mutaciones se va incrementando. Desde un 51% de pacientes con al menos una mutación descrita por Bejar y col. (55), al 74% de pacientes con mutaciones por secuenciación en el trabajo de Papaemmanuil y col (126), y el último gran estudio publicado de Haferlach ya describió mutaciones en un 89.5% de los pacientes (127), en el rango de nuestro trabajo.

Los genes que presentan mutaciones de forma más frecuente en SMD coinciden en los distintos estudios, y nuestros resultados reproducen estas incidencias (ver tabla 4.6. en Resultados). Tanto *TET2* como *SF3B1* constituyen los genes mutados con mayor frecuencia en todos los estudios, entorno al 20%-30% de los pacientes. Entre 10-20% presentan mutaciones en *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, entre el 5-10% en *TP53*, *ZRSR2*, *EZH2*, *U2AF1*, y en el resto de genes se encuentran mutaciones en menos del 5% de los pacientes.

A diferencia de las alteraciones citogenéticas, encontradas con mayor frecuencia en pacientes con alto riesgo, encontramos mutaciones somáticas en proporciones similares en pacientes de bajo y alto riesgo (1,8 mutaciones/paciente en muestras de SMD bajo riesgo, 2 mutaciones/paciente en SMD alto riesgo, y 1,8 mutaciones/paciente en NMPC/SMD). Nuestros resultados difieren en parte de los hallados por Haferlach y col (127). Aunque observaron que casi el 73% de los pacientes con SMD bajo riesgo (AR, ARSA, CRDM) y citogenética normal presentaban mutaciones, y la media era de 1,5-2 mutaciones/paciente, similar a nuestros datos, en pacientes con SMD de alto riesgo (AREB1 y 2) analizaron un mayor número de mutaciones, una media de 3,5-4 mutaciones/paciente. Las mutaciones encontradas en NMPC/SMD (1,8 por paciente) están en rango similar a las comunicadas previamente por Kohlmann y col (54).

En nuestro caso, la incidencia de más de 2 mutaciones fue similar en alto y bajo riesgo (entorno al 30% de los pacientes), sin embargo, comprobamos que la acumulación de mutaciones implicaba menor supervivencia global, media de supervivencia de 48 meses con 0-

2 mutaciones, frente a 24 meses en aquellos con más de 2 mutaciones. Similares resultados comunicó Papaemmanuil (126), los pacientes con 1-2 mutaciones presentaban un tiempo de progresión a leucemia (42-49 meses) similar a los que no tenían mutaciones, y a partir de 2 mutaciones este tiempo se reducía significativamente (27, 18, y 4 meses con 3, 4 -5, y 6 o más mutaciones, respectivamente).

Estas observaciones pueden contribuir al diagnóstico y pronóstico de pacientes con SMD, sobre todo de bajo riesgo. Por un lado, la presencia de mutaciones en pacientes con SMD de bajo riesgo puede constituir un marcador clonal en casos probables de SMD con diagnóstico no concluyente por morfología, y que raramente presentan alteraciones citogenéticas que apoyen diagnóstico definitivo. Para ello, hay que considerar el tipo de mutación y siempre que el resto de datos sean congruentes también con el diagnóstico, puesto a día de hoy el diagnóstico de SMD no puede basarse exclusivamente en datos moleculares, presentándose en más del 10% de individuos mayores de 60 años mutaciones en genes relacionados incluso con patología hematológica como **TET2**, **DNMT3A** y **ASXL1** (110, 130).

Por otro lado, habrá que tener en cuenta aquellos pacientes con clasificación pronóstica de bajo riesgo, pero que presenten más de 2 mutaciones, puesto que probablemente el riesgo de transformación a leucemia sea más alto, y aunque actualmente falten más datos que confirmen el beneficio del tratamiento precoz en estos casos, al menos puede alertar sobre la vigilancia más estrecha de estos pacientes por su riesgo de transformación.

A pesar de encontrar un número similar de mutaciones en pacientes de alto y bajo riesgo, en lo que sí existían diferencias era en el tipo de genes afectados. Los genes correspondientes a la vía de metilación del DNA (**TET2**, **DNMT3**) y a la de procesamiento del RNA (**SF3B1**) estaban preferencialmente mutados en pacientes con SMD de bajo riesgo (IPSSr muy bajo, bajo, intermedio), mientras que las mutaciones en genes de transcripción (**TP53**) y modificadores de cromatina (**ASXL1**) se encontraban en SMD de alto riesgo (IPSSr alto y muy alto). Estos resultados están en consonancia con los publicados previamente (126, 127). Los pacientes con NMP/SMD acumulaban mutaciones en **TET2**, sobre todo, y proporcionalmente se encontraron mayor número de mutaciones de la vía **RAS**. La presencia de este tipo de mutaciones ya se había descrito previamente en LMMC (54).

La presencia de varias variantes de un mismo gen no es infrecuente en SMD. En un 44% de nuestros pacientes con mutaciones en **TET2**, se encontraron dos variantes, con frecuencias alélicas similares, entorno a 40-50% cada una. Esto está en consonancia con lo descrito por el grupo de Hiwase y col, quienes también encontraron más de una variante de **TET2** en el 60% de sus casos (131). De igual forma, cuando presentaban dos variantes de **TET2**, la frecuencia alélica era similar en ambas variantes (como en nuestros casos, 40-50%), sugiriendo un origen clonal bialélico, pero cuando encontraban tres variantes de **TET2**, una de ellas se presentaba con menor frecuencia que las otras dos, lo que podría representar evolución subclonal. Además, 3 o más variantes de **TET2** parecía implicar peor pronóstico.

También **TP53** presentó más de una variante alélica en nuestra serie, en el 33% de los casos con mutación. De nuevo, ambas variantes presentaban, en general, frecuencias alélicas muy similares.

5.2.2 IMPACTO DE LAS MUTACIONES EN LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Dada la heterogenicidad tanto clínica como citogenética de los SMD, y actualmente también demostrada molecular, la mayoría de estudios se encuentran dificultades para asociar a un determinado perfil mutacional unas características clínicas o alguna alteración citogenética concreta, salvo algunos casos concretos. Los resultados que obtuvimos en el análisis de la relación entre variables clínicas (edad, sexo, diagnóstico OMS, porcentaje de blastos en medula ósea, niveles de hemoglobina, plaquetas y leucocitos al diagnóstico, riesgo citogenético e índice pronóstico internacional revisado) y la presencia de mutaciones en estos genes relacionados con la patología mieloide son similares a los descritos.

Una relación bien establecida consiste en la presencia de mutaciones de **SF3B1** con subtipos de SMD que presentan sideroblastos en anillo (70, 71, 72). En nuestra serie se confirmó esta asociación entre **SF3B1** y la clasificación OMS ($p < 0,001$), pero además se observó relación con citogenética de buen pronóstico ($p = 0,02$) y con recuentos plaquetarios más altos al diagnóstico ($p < 0,001$), como había sido previamente descrito (56, 71). En otros genes de esta vía de procesamiento de RNA no conseguimos demostrar relaciones significativas con características clínicas, aunque otros grupos han observado la relación de mutaciones de

SRSF2 con neutropenia y profunda trombocitopenia y de **ZRSR2** con aislada neutropenia en SMD avanzados (75).

Aunque las mutaciones de **TET2** son de las más frecuentes en SMD, y se han definido algunas características clínicas, como aumento de las mismas en LMMC y en citogenéticas normales (55), no se ha establecido claramente su implicación pronóstica. En nuestra serie, las mutaciones en **TET2** se asociaron con diagnósticos de categorías OMS de bajo riesgo ($p=0,004$). También otras mutaciones de la vía de DNA metilación se asociaron a categorías OMS de bajo riesgo ($p=0,007$), e IPSSr de bajo riesgo ($p=0,042$) (**IDH2** e **IDH1**, respectivamente), aunque en este caso, el resultado difiere del de otras series las han relacionado con peor supervivencia y mayor riesgo de transformación a leucemia (62). Esta variabilidad de resultados puede deberse a que son mutaciones que se localizan en menos del 10% de los pacientes, y esto implica mayor dificultad para establecer asociaciones.

Por otro lado, las mutaciones en **TP53** se encuentran en el espectro de subtipos de SMD de peor pronóstico, con aumento de blastos, citogenéticas complejas (55, 83). También encontramos asociación con niveles más bajos de hemoglobina ($p<0,001$) al diagnóstico, con tendencia al aumento del porcentaje de blastos en médula ósea ($p=0,064$), citogenética con pronóstico muy pobre ($p<0,001$), e IPSSr de muy alto riesgo ($p<0,001$), de forma congruente con los datos publicados.

Otras mutaciones que de forma uniforme se están relacionando con características clínicas adversas en la mayoría de los estudios son mutaciones en **RUNX1**, en las que encontramos asociación con aumento del porcentaje de blastos en médula ósea ($p=0,048$), y mutaciones en genes de la vía RAS, concretamente mutaciones en **KRAS** se relacionaban con citogenética de mal pronóstico ($p<0,001$). Tanto las mutaciones en **RUNX1** como en genes de la vía **RAS** se habían relacionado con trombocitopenia y aumento de blastos (55, 56, 126, 127).

La expresión de los factores de transcripción **GATA1** y **GATA2** constituye un punto de regulación importante en el inicio y mantenimiento de la eritropoyesis, y también de la megacariopoyesis (leonar 1993). Mutaciones en **GATA1** se han relacionado con síndrome mieloproliferativo transitorio con o sin síndrome de Down (132), y con anemia de Blackand-Diamond (133). También la inactivación en cultivos de **GATA1** produce alteración en la

maduración de los eritroblastos (134). En nuestros pacientes con SMD, encontramos asociación entre mutaciones en **GATA1** y los niveles más bajos de hemoglobina al diagnóstico, lo cual parece tener una estrecha relación fisiopatológica.

Finalmente, en nuestra cohorte de pacientes, no encontramos asociación entre mayor edad al diagnóstico y la presencia de mutaciones (**TET2**, **ASXL1** y **DNMT3**) halladas más frecuentemente en población mayor sin patología hematológica, a la que se realizó un estudio mutacional en sangre periférica (110, 130). Tampoco esta relación entre pacientes con SMD y mayor edad había sido descrito en otras series, por lo que habrá que establecer si realmente este hallazgo en paciente sin patología puede contribuir y en qué medida al desarrollo posterior de SMD.

5.2.3. RELACIONES ENTRE MUTACIONES

La existencia de mutaciones en genes que participan en diferentes vías celulares, apoyan la compleja fisiopatología de los SMD. La relación entre las mismas viene condicionada, posiblemente, por la contribución de estas alteraciones al mecanismo de la dishematopoyesis, bien por exclusión cuando están involucradas en la misma vía funcional, o bien por colaborar unas con otras potenciándose efectos desde distintos procesos.

Encontramos correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en 27 combinaciones de genes mutados, indicando posiblemente la interacción entre diferentes mutaciones en la patogénesis del SMD. Algunas de estas relaciones se establecieron entre genes con mutaciones muy infrecuentes, por lo que para ver su relevancia habrá que confirmarlas en series más amplias.

La única relación excluyente con significación fue entre **TET2** y **SF3B1** ($p = 0,026$). Ambas representan mutaciones frecuentes en SMD, aunque en perfiles clínicos diferentes (**TET2** presenta mayor frecuencia de mutaciones en LMMC y **SF3B1** se relaciona con cuadros con sideroblastos en anillo). No se ha encontrado asociación entre mutaciones en los diferentes genes de la vía de metilación entre sí (**TET2**, **DNMT3A**, **IDH1**, **IDH2**). Esta ausencia de asociación, posiblemente debido a que supondría una redundancia de función, se había descrito anteriormente (53, 61, 135).

De igual forma, la presencia de una mutación en **SF3B1** de la vía de metilación de DNA no se correlacionó con presencia de otras mutaciones de la misma vía (**SRSF2**, **U2AF1**, **ZRSR2**), también descritas anteriormente como mutaciones excluyentes (69). Las mutaciones en **SF3B1** se han relacionado de forma excluyente con cariotipos complejos y mutaciones en **TP53** (75). También en nuestra serie, las mutaciones en **SF3B1** y en **TP53** se relacionaban de forma excluyente, pero sin alcanzar significación estadística ($p= 0,086$). Tampoco alcanzamos a encontrar asociación entre mutaciones de **SF3B1** y **DNMT3A** en nuestros casos ($p= 0,093$), como se ha descrito por otros grupos (75, 136), posiblemente debido a que nuestra serie no seleccionaba exclusivamente pacientes con ARSA.

Las mutaciones en los genes modificadores de la cromatina, tanto **ASXL1** como **EZH2** se han relacionado con cuadros clínicos de peor pronóstico y mayor riesgo de transformación leucémica. Además, hemos encontrado una correlación con mayor fuerza con presencia de mutaciones en **KRAS** ($p= 0,009$, y $p= 0,002$, respectivamente). Esta relación ya comunicada también por otros grupos puede estar indicando una colaboración por diferentes vías en el riesgo leucémico (elli). Se ha observado en un modelo animal que mutaciones de **ASXL1** colaboran en la vía **RAS (NRAS)** favoreciendo la leucemogénesis (137).

La fuerte asociación encontrada entre mutaciones entre **GATA1** y **SF3B1** ($p=0,002$), ambas con implicación en cuadros con mayor relevancia de la diseritropoyesis de nuevo apoyan la idea de cooperación entre diferentes vías en el proceso patogénico del SMD.

5.2.4. IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS MUTACIONES EN SMD

En la búsqueda de factores pronósticos en nuestra serie de 106 pacientes, realizamos el análisis en función de datos clínicos y moleculares. Aunque el número de pacientes no alcanza el de otras grandes series publicadas (55, 126, 127), nuestra serie presenta la ventaja de disponer de toda la información diagnóstica, y evolución clínica de los pacientes. Dado que el número de pacientes que recibieron tratamientos con posible impacto en la supervivencia fue alrededor de un tercio de la serie (22 pacientes tratados con azacitidina, 2 con quimioterapia intensiva tipo LMA, 3 con trasplante alogénico, 4 con quimioterapia a dosis bajas, y 4 con lenalidomida), no se ha podido analizar el impacto de estas mutaciones en respuesta al tratamiento por el reducido número de pacientes. Aunque estudios previos han remarcado el valor de las mutaciones, sobre todo de **TP53**, independientemente de la respuesta al tratamiento tanto de hipometilantes (101) como de lenalidomida (103).

En el análisis univariante, la supervivencia global era significativamente mejor en los grupos con plaquetas por encima $100 \times 10^9/L$, con menor porcentaje de blastos al diagnóstico, con menor riesgo citogenético y con índices pronósticos IPSS e IPSSr de bajo riesgo. Todas estas variables están reconocidas como factores pronósticos de forma relevante (26).

En cuanto a las mutaciones en los 34 genes evaluados, encontramos que mutaciones en 5 genes presentaban impacto negativo en la supervivencia global **TP53**, **RUNX1**, **EZH2**, **KRAS**, y **U2AF1**. El pronóstico adverso de mutaciones en estos genes está en consonancia con resultados previos. Bejar y col. encontraron también disminución de la supervivencia global en mutaciones de los genes **TP53**, **EZH2**, **RUNX1**, junto con **ETV6** y **ASXL1** (55), estos dos últimos no han llegado a alcanzar significación en nuestra serie. Haferlach y col. también encontraron significación estadística para supervivencia para los genes **ASXL1**, **KRAS**, **RUNX1**, **TP53**, junto con **NMP1** y **PRPF8** (127). A pesar de que **U2AF1** pertenece a la vía de procesamiento de RNA, estudios han relacionado mutaciones en SMD con peor supervivencia y mayor riesgo de progresión a leucemia (79, 138).

En el análisis multivariante, considerando las variables clínicas y mutaciones significativas en el análisis univariante, únicamente mutaciones en **TP53** y en **EZH2** permanecen como factores

pronósticos para supervivencia global (HR: 6,3; IC95%: 2,4-16,5, para **TP53**; y HR: 3,5; IC95%: 1,4-8,8, para **EZH2**).

Consideramos los genes con impacto pronóstico en supervivencia global encontrados en nuestra serie, en el trabajo de Bejar y en el de Haferlach (salvo **NMP1** Y **PRPF8** que no estaban incluidos en nuestro panel), y los agrupamos en el denominado **score molecular pronóstico**. La presencia o no de mutaciones en alguno de estos 7 genes: **TP53**, **EZH2**, **RUNX1**, **ETV6**, **ASXL1**, **KRAS** y **U2AF1** tiene un impacto significativo en la supervivencia ($p=0,001$: HR: 3,0). Además, considerando a los pacientes estratificado por riesgo (bajo, intermedio y alto), la presencia de alguna mutación en estos genes implica disminución de supervivencia global. En pacientes con SMD de bajo grado, la supervivencia media de 50 meses disminuye a 25-35 meses, y en SMD de intermedio-alto riesgo, de 30 meses a 4-15 meses en el caso de presentar alguna mutación asociada. Sólo se encontró significación estadística en el subgrupo de alto riesgo, pero las diferencias clínicas son relevantes.

Estos datos implican que la presencia de al menos una mutación de riesgo conduce a empeorar todavía más el pronóstico, sobre todo en los grupos de pronóstico adverso, según las variables clínicas habitualmente consideradas, y englobadas en el índice pronóstico IPSSr. De la misma forma, pacientes con factores de riesgo clínico desfavorables, en ausencia de marcadores moleculares adversos presentan datos de supervivencia superiores a los esperados. Por tanto, cada vez vamos teniendo más datos que apoyan la inclusión de resultados moleculares en los índices pronósticos en SMD. Probablemente, el esfuerzo a nivel internacional que se está realizando para recoger datos moleculares en una amplia serie de pacientes permita dar el paso definitivo hacia un nuevo IPSS revisado molecular.

5.2.5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS EN LA VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS

Se pensaba que la mayor parte de la variabilidad genética consistía en variaciones en un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, *SNPs*), sin embargo, ahora se han demostrado amplias zonas del genoma que presentan variación en el número de copias (*copy number variation*, *CNV*), es decir, que no están representado por dos genes, y que están contribuyendo también a nuestra variabilidad génica. Esto conduce a un desequilibrio en la carga génica, que

puede no tener efectos, o bien relacionarse con enfermedades congénitas (139, 140), neurológicas (141, 142) o tumorales (143, 144, 145).

Hasta ahora, no hay muchos datos de CNV en enfermedades hematológicas. Recientemente el grupo del *Cancer Genome Project* (146) ha analizado las mutaciones y CNV en 42 muestras de LMA. Encontraron una deleción intersticial de **BCOR**, tres casos de duplicaciones parciales en tándem de **MLL**, y una nueva amplificación de **KRAS**. También en el trabajo de Papaemmanuil y col. utilizan CNV para detectar alteraciones citogenética en un 13% de los pacientes: deleciones de 5q, 11q, 20q, y 17p, monosomía de 7, trisomías de 8 y 21, e isocromosoma X, y apuntan que en un futuro sea una herramienta para detección de mutaciones y alteraciones citogenéticas en un solo ensayo (126).

En un 80% de los pacientes de nuestra serie se detectaron alteraciones en el número de copias (CNV) en al menos 1 de los genes estudiados. La media de alteraciones encontradas por paciente fue de 4,3 CNV/paciente (rango 0-34). Hubo 4 pacientes que presentaban alteraciones (ganancias o pérdidas) en los 34 genes analizados, que puede estar asociado a un fenómeno descrito en tumores, en los que se producen múltiples reordenamientos y variaciones en el número de copias de ADN, restringido a uno o varios cromosomas, y que se denomina cromoptrisis (147).

En los cromosomas 11, X y 4 se acumulaban los genes con mayor frecuencia de CNV: **HRAS** y **SF1** en cromosoma 11, **GATA1** y **ATRX** en cromosoma X, **TET2** y **KIT** en cromosoma 4. Además, los genes que se hallan en el mismo cromosoma, presentan alteración del número de copias en el mismo sentido, es decir, predominio de ganancias o pérdidas de copias. Esto viene a confirmar que las alteraciones del número de copias afectan no sólo a un gen, sino a partes de un cromosoma.

En el análisis multivariante, considerando también las características clínicas, la presencia de CNV en **HRAS** constituía un factor de riesgo para la supervivencia ($p= 0,011$; HR: 3,3, IC95%: 1,4-7,7), mientras que la presencia de CNV en **GATA1** resulta un factor protector ($p= 0,006$; HR: 0,3, IC95%: 0,1-0,8).

Estos hallazgos requieren, por un lado, la confirmación de estas alteraciones por otras técnicas y, por otro lado, el análisis en un mayor número de pacientes.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Las recomendaciones del grupo de trabajo de *EuropeanLeukemia Net* (2012) para análisis mediante citometría de flujo en pacientes con sospecha de SMD nos permiten diferenciar a los pacientes con SMD frente a otras citopenias mediante algunos parámetros consistentes: aumento de blastos mieloides, disminución de la fracción de blastos linfoides, pérdida de complejidad y alteraciones en el patrón de maduración en relación con la disgranulopoyesis, y la expresión de CD56 en monocitos, como marcadores más útiles.
2. Demostramos la aplicabilidad del "score diagnóstico" de Ogata y colaboradores, publicado para despistaje de SMD por citometría, en nuestra población de muestras, con una sensibilidad del 53%, y una especificidad del 96%, similar a las publicadas.
3. La herramienta del *Infinicyt*[®] de base de datos de maduración constituye un test diagnóstico fiable para discriminar entre pacientes con SMD y otros con citopenias de origen no clonal.
4. El número de alteraciones inmunofenotípicas, considerando nuestra puntuación en la base de datos de maduración, se correlacionan con el riesgo pronóstico.
5. El análisis por secuenciación masiva de nueva generación y alta profundidad nos ha permitido demostrar la presencia de mutaciones puntuales en el 89% de los pacientes con SMD, siendo el promedio entorno a 2 mutaciones por paciente. A diferencia de las alteraciones citogenéticas, en pacientes con SMD de bajo riesgo encontramos similar incidencia de mutaciones, por lo que puede constituir un marcador clonal útil en el diagnóstico.
6. La acumulación de más de 2 mutaciones en un mismo paciente se asoció con impacto negativo en la supervivencia.

7. La presencia de determinadas mutaciones se asocian con cuadros clínicos concretos dentro de la variabilidad de pacientes con SMD. Las mutaciones en *SF3B1* se asocian a un determinado subgrupo OMS (con sideroblastos en anillo), y además con niveles más altos de plaquetas y citogenética de buen pronóstico. También las mutaciones en *TET2* se relacionaron con subgrupos OMS de bajo riesgo. Por el otro lado, mutaciones en *TP53*, *RUNX1*, y *NRAS* se asocian con mayor porcentaje de blastos, citogenéticas de mal pronóstico e IPSS de mayor riesgo. Por último, destaca la asociación entre niveles más bajos de hemoglobina y mutaciones en el factor de transcripción *GATA1*, implicado en la regulación de la eritropoyesis.

8. En nuestra serie de pacientes, encontramos 5 genes cuyo estado mutacional presenta implicaciones pronósticas en relación con supervivencia global: *TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, y *U2AF1*. Considerando estos genes, junto con otros descritos también con relevancia pronóstica, diseñamos el “score molecular pronóstico”, que incluye 7 genes (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *ETV6*, *ASXL1*, *KRAS* y *U2AF1*). La presencia de 1 o más mutaciones en estos genes impacta de forma negativa en la supervivencia de los pacientes con SMD.

9. Tras la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo (SMD bajo, intermedio y alto riesgo), la presencia o no de alguna mutación en estos genes del “score molecular pronóstico” conduce a disminución en la supervivencia global de forma relevante en cada subgrupo. Por tanto, la incorporación de datos moleculares a los índices pronósticos de SMD puede ayudar a mejorar la definición de las categorías pronósticas.

10. La implicación de las variaciones del número de copias (CNVs) en la oncogénesis, y en particular en la patología hematológica, constituye un campo muy reciente de investigación. Las alteraciones CNV en dos genes *GATA1* y *HRAS* presentan repercusión en la supervivencia de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Neukirchen J, Schoonen W, Strupp C, Gattermman N, Aul C, Haas R, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res.* 2011; 35: 1591–6.
2. Sekkeres MA. The epidemiology of MDS. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2010; 24: 287-94.
3. Parikh S, Bessler M. Recent insights into inherited bone marrow failure syndromes. *Curr Opin Pediatr.* 2012; 24: 23–32.
4. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) y Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH). Guías española de diagnóstico y tratamiento de síndromes mielodisplásicos y leucemia mielomonocítica crónica. *Haematologica.* 2012; 97 S5.
5. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood.* 2013; 122: 2943-64.
6. Valent P. et al. Definition and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007; 31: 727-36.
7. Orazi A. Histopathology in the diagnosis and classification of AML, MDS and MDS/MPD. *Pathobiology* 2007; 74: 97–114.
8. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: international working group on morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematol.* 2008;93: 1712-7.
9. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007; 110: 4385-95.
10. Giagounidis A, Haase D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013; 26: 337-53.
11. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2005; 90: 1168-78.
12. Greenberg PL. Risk factors and their relationship to prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 1998; 22 S1: S3-S6.
13. Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010; 196: 159-66.
14. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al.

- Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011; 144: 27-40.
15. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89: 2079-88.
 16. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 820-9.
 17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982; 51: 189-99.
 18. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100: 2292-302.
 19. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Nachtamp K, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*. 2011; 96: 1433-40
 20. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
 21. Howe RB, Porwit-MacDonald A, Wanat R, Tehrani R, Hellström-Lindberg E. The WHO classification of MDS does make a difference. *Blood*. 2004; 103: 3265-70.
 22. Naqvi K, Jabbour E, Bueso-Ramos C, Pierce S, Borthakur G, Estrov Z, et al. Implications of discrepancy in morphologic diagnosis of myelodysplastic syndrome between referral and tertiary care centers. *Blood*. 2011; 118: 4690-3.
 23. Font P, Loscertales J, Benavente C, Bermejo A, Callejas M, Garcia-Alonso L, et al. Inter-observer variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. *Ann Hematol*. 2013; 92: 19-24.
 24. Senent L, Arenillas L, Luño E, Ruiz JC, Sanz G, Florensa L. Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013; 98: 568-75.
 25. Font P, Loscertales J, Soto C, Ricard P, Novas CM, Martín-Clavero E. Interobserver variance in myelodysplastic syndromes with less than 5 % bone marrow blasts: unilineage vs. multilineage dysplasia and reproducibility of the threshold of 2 % blasts. *Ann Hematol*. 2015; 94: 565-73.
 26. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120: 2454-65.

27. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001; 98: 979-87.
28. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003; 102: 394-403.
29. Malcovati L, Della Porta MG, Lunghi M, Pascutto C, Vanelli L, Travaglino E et al. Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2005; 19: 776–83.
30. Sandes AF, Kerbauy DM, Matarraz S, Chauffaille Mde L, López A, Orfao A, et al. Combined flow cytometric assessment of CD45, HLA-DR, CD34, and CD117 expression is a useful approach for reliable quantification of blast cells in myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013; 84: 157-66.
31. Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura H, Tachibana M, Taniguchi O, et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; 100: 3887-96.
32. Ogata K, Kakumoto K, Matsuda A, Tohyama K, Tamura H, Ueda Y, et al. Differences in blast immunophenotypes among disease types in myelodysplastic syndromes: A multicenter validation study. *Leuk Res*. 2012; 36: 1229-36.
33. Font P, Subira D, Martínez-Chamorro C, Castañón S, Arranz E, Ramiro S, et al. Evaluation of CD7 and terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) expression in CD34+ myeloblasts from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2006; 30: 957-63.
34. Sternberg A, Killick S, Littlewood T, Hatton C, Peniket A, Seidl T, et al. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005; 106: 2982-91.
35. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Weiss T, Schnittger S, Haferlach C. The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics, and immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2009; 115: 4524-32.
36. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer*. 2010; 116: 4549-63.
37. Cutler JA, Wells DA, van de Loosdrecht AA, de Baca ME, Kalnoski MH, Zehentner BK, et al. Phenotypic abnormalities strongly reflect genotype in patients with unexplained cytopenias. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011; 80: 150-7.
38. Huang J, Lai P, Zhou M, Weng J, Lu Z, Du X. A multiparametric flow cytometry immunophenotypic scoring system for the diagnosis and

- prognosis of myelodysplastic syndromes. *Clin Lab.* 2012; 58: 1241-51.
39. Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, Andersen M, Xiao Z, Raza A, Woda BA, et al. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing Myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res.* 2008; 32: 215-24.
40. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica.* 2009; 94: 1066-74.
41. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78: 154-68.
42. Chu SC, Wang TF, Li CC, Kao RH, Li DK, Su YC, et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2011; 35: 868-73.
43. Falco P, Levis A, Stacchini A, Ciriello MM, Geuna M, Notari P, et al. Prognostic relevance of cytometric quantitative assessment in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2011; 87: 409-18.
44. Della Porta MG, Lanza F, Del Vecchio L; Italian Society of Cytometry (GIC). Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011; 80: 201-11.
45. Fajtova M, Kovarikova A, Svec P, Kankuri E, Sedlak J. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54: 2523-30.
46. Mathis S, Chapuis N, Debord C, Rouquette A, Radford-Weiss I, Park S, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2013; 27: 1981-7.
47. Westers TM, Alhan C, Chamuleau ME, van der Vorst MJ, Eeltink C, Ossenkoppele GJ, et al. Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood.* 2010; 115: 1779-84.
48. Hellström-Lindberg E, Negrin R, Stein R, Krantz S, Lindberg G, Vardiman J, et al. Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *Br J Haematol.* 1997; 99: 344-51.
49. Alhan C, Westers TM, van der Helm LH, Eeltink C, Huls G, Witte BI, et al. Absence of aberrant myeloid progenitors by flow cytometry is associated with favorable response to azacitidine in higher risk myelodysplastic syndromes.

- Cytometry B Clin Cytom. 2014; 86: 207-15.
50. Westers TM, van der Velden VH, Alhan C, Bekkema R, Bijkerk A, Brooimans RA, et al. Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. *Leuk Res.* 2012; 36: 422-30.
51. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2009; 94: 1124-34.
52. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia.* 2012; 26: 1730-41.
53. Graubert T, Walter MJ. Genetics of Myelodysplastic syndromes: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011; 2011: 543-9.
54. Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3858-65.
55. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011; 364: 2496–2506.
56. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, Abdel-Wahab O, Steensma DP, Galili N, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 3376-82.
57. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood.* 2009; 114: 3285-91.
58. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010; 363: 2424-33.
59. Itzykson R, Kosmider O, Fenaux P. Somatic mutations and epigenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013; 26: 355-64.
60. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2011; 25: 1153-8.
61. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010; 18: 553–67.

62. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, et al. *IDH1* mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. 2010; 95: 1668-74.
63. Lin CC, Hou HA, Chou WC, Kuo YY, Liu CY, Chen CY, et al. IDH mutations are closely associated with mutations of DNMT3A, ASXL1 and SRSF2 in patients with myelodysplastic syndromes and are stable during disease evolution. *Am J Hematol*. 2014; 89: 137-44.
64. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccion N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009; 145: 788-800.
65. Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2499-506
66. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccion N, Esterni B, et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010; 151: 365-75.
67. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010; 42: 722-6.
68. Wang J, Ai X, Gale RP, Xu Z, Qin T, Fang L, et al. TET2, ASXL1 and *EZH2* mutations in Chinese with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2013; 37: 305-11.
69. Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2013; 162: 587-605.
70. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011; 365: 1384-95.
71. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011; 118: 6239-46.
72. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jädersten M, Jansson M et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015; 126: 233-41.
73. Cazzola M, Rossi M, Malcovati L; et al. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013; 121: 260-9.
74. Thol F, Kade S, Schlarmann C, Löffeld P, Morgan M, Krauter J, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 119: 3578-84.
75. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccion N, Hidalgo-

- Curtis C, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 119: 3211-8.
76. Patnaik MM, Lasho TL, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Garcia-Manero G, et al. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. *Blood*. 2012; 119: 569-72.
77. Wu SJ, Kuo YY, Hou HA, Li LY, Tseng MH, Huang CF, et al. The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. *Blood*. 2012; 120: 3106-11.
78. Lin J, Yang J, Wen XM, Yang L, Deng ZQ, Qian Z, et al. Detection of SRSF2-P95 mutation by high-resolution melting curve analysis and its effect on prognosis in myelodysplastic syndrome. *PLoS One*. 2014; 9: e115693.
79. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 2012; 119: 3203-10.
80. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood*. 2004; 104: 1474-81.
81. Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T, et al. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*. 2004; 103: 2316-24.
82. Steensma DP, Gibbons RJ, Mesa RA, Tefferi A, Higgs DR. Somatic point mutations in RUXN1/CBFA2/AML1 are common in high-risk myelodysplastic syndrome, but not in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Eur J Haematol*. 2005; 74: 47-53.
83. Kita-Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Nakao M, et al. International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2001; 115: 309-12.
84. Bally C, Adès L, Renneville A, Sebert M, Eclache V, Preudhomme C, et al. Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. *Leuk Res*. 2014; 38: 751-5.
85. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1971-9.
86. Padron E, Yoder S, Kunigal S, Mesa T, Teer JK, Al Ali N, et al. ETV6 and signaling gene mutations are associated with secondary transformation of myelodysplastic syndromes to chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123: 3675-7.

-
87. Wall M, Rayeroux KC, MacKinnon RN, Zordan A, Campbell LJ. ETV6 deletion is a common additional abnormality in patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and monosomy 7. *Haematologica*. 2012; 97:1933-6.
88. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7: 387-97.
89. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation.
90. Ingram W, Lea NC, Cervera J, Germing U, Fenaux P, Cassinat B et al. The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia*. 2006; 20: 1319-21.
91. de Renzis B, Mansat-De Mas V, Wattel E, Beyne-Rauzy O, Knoops L, Cabrespine A, et al. Prognostic impact of JAK2V617F mutation in myelodysplastic syndromes: A matched case control study. *Leuk Res Rep*. 2013; 2: 64-6.
92. Nadeau S, An W, Palermo N, Feng D, Ahmad G, Dong L, et al. Oncogenic Signaling by Leukemia-Associated Mutant Cbl Proteins. *Biochem Anal Biochem*. 2012; Suppl 6(1), pii: 7921.
93. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*. 2009; 460: 904-8.
94. Schwaab J, Ernst T, Erben P, Rinke J, Schnittger S, Ströbel P, et al. Activating CBL mutations are associated with a distinct MDS/MPN phenotype. *Ann Hematol*. 2012; 91: 1713-20.
95. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007; 92: 744-52.
96. Shih LY, Huang CF, Wang PN, Wu JH, Lin TL, Dunn P, et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004; 18: 466-75.
97. Daver N, Strati P, Jabbour E, Kadia T, Luthra R, Wang S, et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2013; 88: 56-9.
98. Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 373-84.
99. Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, Kahan J, Lübbert M, Lazcano O, et al. N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 1993; 82: 590-9.
100. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to

- azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011; 25: 1147-52.
101. Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Perez-Ladaga A, Zaneveld J et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in Myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014; 124: 2705–12.
102. Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarrokhi A, Jankowska AM, Hasrouni E, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia*. 2014; 28: 78-87.
103. Saft L, Karimi M, Ghaderi M, Matolcsy A, Mufti GJ, Kulasekararaj A, et al. p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica*. 2014; 99: 1041-9.
104. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2014; 32: 2691–98.
105. Kim M, Yahng SA, Kwon A, Park J, Jeon YW, Yoon JH, et al. Mutation in TET2 or TP53 predicts poor survival in patients with myelodysplastic syndrome receiving hypomethylating treatment or stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2015; 50: 1132-4.
106. Qian Z, Joslin JM, Tennant TR, Reshmi SC, Young DJ, Stoddart A, et al. Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chem Biol Interact*. 2010; 184: 50-7.
107. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Fu B, Tang G et al. Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison with de novo diseases. *Leuk Res*. 2015; 39: 348-54.
108. Pellagatti A, Boultonwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015; 95: 3-15.
109. Zhang L, Padron E, Lancet J. The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2015; 39: 6-17.
110. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014; 371: 2488-98.
111. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*. 2008; 111: 1067-77.
112. Molteni A, Riva M, Cesana C, Speziale V, Nichelatti M, Scarpatti B, et al. Prognostic relevance of the flow cytometric count of medullar blasts in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015; 94: 519-25.
113. Reis-Alves SC, Traina F, Metzke K, Lorand-Metze I. Improving the differential diagnosis between myelodysplastic syndromes and

- reactive peripheral cytopenias by multiparametric flow cytometry: the role of B-cell precursors. *Diagn Pathol.* 2015; 10: 44.
114. Chopra A, Pati H, Mahapatra M, Mishra P, Seth T, Kumar S, et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndrome: analysis of diagnostic utility using maturation pattern-based and quantitative approaches. *Ann Hematol.* 2012; 9: 1351-62.
115. Moon HW, Huh JW, Lee M, Hong KS, Chung WS. Immunophenotypic features of granulocytes, monocytes, and blasts in myelodysplastic syndromes. *Korean J Lab Med.* 2010; 30: 97-104.
116. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, Jouault H, Maynadié M, Lacombe F. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78 :4-10.
117. Monaghan SA, Surti U, Doty K, Craig FE. Altered neutrophil maturation patterns that limit identification of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012; 82: 217-28.
118. Satoh C, Dan K, Yamashita T, Jo R, Tamura H, Ogata K. Flow cytometric parameters with little interexaminer variability for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2008; 32: 699-707.
119. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004; 60: 1-13.
120. Reis-Alves SC, Traina F, Harada G, Campos PM, O.Saad ST, Metze K et al. Immunophenotyping in myelodysplastic syndromes can add prognostic information to well-established and new clinical scores. *PLOSOne.* 2013; 8: e81048.
121. Alhan C, Westers TM, Cremers EMP, Cali C, Witte BI, Ossenkoppele GJ, et al. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2014; 167: 100-9.
122. Xu F, Li X, Wu L, He Q, Zhang Z, Chang C. Flow cytometric scoring system (FCMSS) assisted diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) and the biological significance of FCMSS-based immunophenotypes. *Br J Haematol.* 2010; 149: 587-97.
123. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica.* 2012; 97: 1209-17.
124. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2006; 108: 1037-44.
125. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, Brodersen LE, Burbury

- K, Cremers E et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes- proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for flow cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014; 28: 1793-8.
126. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P et al. Clinical and biological implications of driver mutations in Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013; 122: 3616–27.
127. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014; 28: 241–247.
128. Rose D, Kohlmann A, Nagata Y, Ogawa S, Haferlach C, Kern W et al. Robust molecular pattern for myelodysplastic syndromes in two independent cohorts investigated by next-generation sequencing can be revealed by comparative bioinformatic analyses. *Br J Haematol*. 2014; 167: 278-80.
129. Bacher U, Kohlmann A, Haferlach T. Mutational profiling in patients with MDS: ready for every-day use in the clinic? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015; 28: 32-42.
130. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014; 371: 2477-87.
131. Hiwase D, Hahn C, Babic M, Moore S, Singhal D, Kutyna M, et al. Multiple mutations in the same gene suggest clonal diversity and is associated with poor prognosis in MDS. *Leuk Res*. 2015; 39 S1: S77-8.
132. Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, et al. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children. *Eur J Pediatr*. 2015; 174: 525-31.
133. Klar J, Khalfallah A, Arzoo PS, Gazda HT, Dahl N. Recurrent GATA1 mutations in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2014; 166: 949-51.
134. Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, Pierre-Eugène C, Sternberg A, Arlet JB, et al. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 119: 1532-42.
135. DiNardo CD, Jabbour E, Ravandi F, Takahashi K, Daver N, Routbort M, et al. IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia* accepted article preview 31 July 2015.
136. Martín I, Such E, Vicente A, Navarro B, López-Pavía M, Gómez M, et al. Frequency and prognostic impact of SF3B1 and DNMT3A mutations in refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS). *Leuk Res*. 2015; 39 S1: S154.
137. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*. 2012; 22: 180-93.

-
138. Graubert TA, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2011; 44: 53-7
139. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy JG, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res.* 2014; 115: 884-96
140. Bademci G, Diaz-Horta O, Guo S, Duman D, Van Booven D, Foster J 2nd, et al. Identification of copy number variants through whole-exome sequencing in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014; 18: 658-61.
141. Sakai M, Watanabe Y, Someya T, Araki K, Shibuya M, Niizato K, et al. Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients. *Mol Cytogenet.* 2015; 8: 46.
142. Wang D, Li X, Jia S, Wang Y, Wang Z, Song X, et al. Copy number variants associated with epilepsy from gene expression microarrays. *J Clin Neurosci.* 2015 Aug 11 [Epub ahead of print].
143. Czubak K, Lewandowska MA, Klonowska K, Roszkowski K, Kowalewski J, Figlerowicz M, et al. High copy number variation of cancer-related microRNA genes and frequent amplification of DICER1 and DROSHA in lung cancer. *Oncotarget.* 2015; 6: 23399-416.
144. Berg M, Nordgaard O, Kørner H, Oltedal S, Smaaland R, Søreide JA, et al. Molecular subtypes in stage II-III colon cancer defined by genomic instability: early recurrence-risk associated with a high copy-number variation and loss of RUNX3 and CDKN2A. *PLoS One.* 2015; 10: e0122391.
145. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* 2015; 518: 495-501.
146. Bolli N, Manes N, McKeirrell T, Chi J, Park N, Gundem G, et al. Characterization of gene mutations and copy number changes in acute myeloid leukemia using a rapid target enrichment protocol. *Haematologica.* 2015; 100: 214-22.
147. Zhang CZ, Spektor A, Cornils H, Francis JM, Jackson EK, Liu S, et al. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature.* 2015; 522: 179-84.

ANEXOS

Anexo 8.1. Descripción de mutaciones en los genes analizados en 106 pacientes con SMD

Gen	Posición	Transcripción	Mutación ADN	Tipo	Mutación proteína	Función
ASXL1	chr20:30954248	NM_015338.5	c.119C>T	SNV	p.Ala40Val	missense
ASXL1	chr20:31017794	NM_015338.5	c.656G>T	SNV	p.Gly219Val	missense
ASXL1	chr20:31017845	NM_015338.5	c.707A>G	SNV	p.Lys236Arg	missense
ASXL1	chr20:31022284	NM_015338.5	c.1769_1770insT	INDEL	p.Tyr591Leu	frameshiftInsertion
ASXL1	chr20:31022359	NM_015338.5	c.1844_1845insA	INDEL	p.Asp616Arg	frameshiftInsertion
ASXL1	chr20:31022592	NM_015338.5	c.2077C>T	SNV	p.Arg693*	nonsense
ASXL1	chr20:31022851	NM_015338.5	c.2336C>T	SNV	p.Pro779Leu	Missense
ASXL1	chr20:31022898	NM_015338.5	c.2384_2384delC	INDEL	p.Trp796Gly	frameshiftDeletion
ASXL1	chr20:31022978	NM_015338.5	c.2463_2464insA	INDEL	p.Thr822Asn	frameshiftInsertion
ASXL1	chr20:31022983	NM_015338.5	c.2468T>G	SNV	p.Leu823*	Nonsense
ASXL1	chr20:31023054	NM_015338.5	c.2540_2540delC	INDEL	p.Thr848fs	frameshiftDeletion
ASXL1	chr20:31023070	NM_015338.5	c.2555C>A	SNV	p.Ser852Ter	Nonsense
ASXL1	chr20:31023159	NM_015338.5	c.2644C>T	SNV	p.Gln882*	Nonsense
ASXL1	chr20:31023355	NM_015338.5	c.2841_2841delG	INDEL	p.Glu948Arg	frameshiftDeletion
ASXL1	chr20:31023498	NM_015338.5	c.2983_2984insA	INDEL	p.His995fs	frameshiftInsertion
ASXL1	chr20:31023725	NM_015338.5	c.3210T>A	SNV	p.Cys1070*	Nonsense
ASXL1	chr20:31023725	NM_015338.5	c.3210T>A	SNV	p.Cys1070Ter	Nonsense
ASXL1	chr20:31024013	NM_015338.5	c.3498C>G	SNV	p.Ser1166Arg	Missense
ASXL1	chr20:31024260	NM_015338.5	c.3745A>G	SNV	p.Met1249Val	Missense
ASXL1	chr20:31024704	NM_015338.5	c.4189G>A	SNV	p.Gly1397Ser	Missense
ASXL1	chr20:31024704	NM_015338.5	c.4189G>A	SNV	p.Gly1397Ser	Missense
ASXL1	chr20:31024867	NM_015338.5	c.4352C>T	SNV	p.Ser1451Phe	Missense
ATRX	chrX:76937221	NM_000489.3	c.3527A>T	SNV	p.Lys1176Met	missense,missense
CALR	chr19:13054590	NM_004343.3	c.1117G>A	SNV	p.Asp373Asn	Missense
CALR	chr19:13054605	NM_004343.3	c.1132G>C	SNV	p.Glu378Gln	Missense
CALR	chr19:13054610	NM_004343.3	c.1137G>C	SNV	p.Glu379Asp	Missense
CBL	chr11:119142446	NM_005188.3	c.445C>T	SNV	p.Arg149*	Nonsense
CBL	chr11:119144678	NM_005188.3	c.692_692delC	INDEL	p.Cys232Ala	frameshiftDeletion
CBL	chr11:119148919	NM_005188.3	c.1139T>C	SNV	p.Leu380Pro	Missense
CBL	chr11:119149002	NM_005188.3	c.1222T>C	SNV	p.Trp408Arg	Missense
CBL	chr11:119149004	NM_005188.3	c.1224G>C	SNV	p.Trp408Cys	Missense
CBL	chr11:119156133	NM_005188.3	c.1798_1799insC	INDEL	p.Val600fs	frameshiftInsertion
CBL	chr11:119167674	NM_005188.3	c.2083G>T	SNV	p.Glu695*	Nonsense
CBL	chr11:119170220	NM_005188.3	c.2450C>A	SNV	p.Ser817Tyr	Missense
CBL	chr11:119170331	NM_005188.3	c.2561C>A	SNV	p.Ser854*	Nonsense
CBL	chr11:119170480	NM_005188.3	c.2710G>A	SNV	p.Val904Ile	Missense
DNMT3A	chr2:25457242	NM_022552.4	c.2645G>A	SNV	p.Arg882His	Missense
DNMT3A	chr2:25457242	NM_022552.4	c.2645G>A	SNV	p.Arg882His	Missense
DNMT3A	chr2:25457242	NM_022552.4	c.2645G>A	SNV	p.Arg882His	Missense
DNMT3A	chr2:25459860	NM_022552.4	c.2423C>T	SNV	p.Thr808Ile	Missense

DNMT3A	chr2:25462048	NM_022552.4	c.2359G>A	SNV	p.Ala787Thr	Missense
DNMT3A	chr2:25463184	NM_022552.4	c.2309C>T	SNV	p.Ser770Leu	Missense
DNMT3A	chr2:25463212	NM_022552.4	c.2281A>C	SNV	p.Met761Leu	missense
DNMT3A	chr2:25463229	NM_022552.4	c.2264T>C	SNV	p.Phe755Ser	missense
DNMT3A	chr2:25464431	NM_022552.4	c.2082T>A	SNV	p.His694Gln	missense
DNMT3A	chr2:25464431	NM_022552.4	c.2082T>A	SNV	p.His694Gln	missense
DNMT3A	chr2:25464431	NM_022552.4	c.2082T>A	SNV	p.His694Gln	missense
DNMT3A	chr2:25467462	NM_022552.4	c.1613_1614	INDEL	p.Ile539fs	frameshiftInsertion
DNMT3A	chr2:25467523	NM_022552.4		SNV		spliceite_5
DNMT3A	chr2:25468202	NM_022552.4		SNV		spliceite_5
DNMT3A	chr2:25469068	NM_022552.4	c.1389_1389delG	INDEL	p.Lys464Ser	frameshiftDeletion
DNMT3A	chr2:25471016	NM_022552.4	c.745C>T	SNV	p.Gln249*	nonsense
DNMT3A	chr2:25523096	NM_022552.4	c.89A>C	SNV	p.Glu30Ala	missense
ETV6	chr12:12022496	NM_001987.4	c.602T>C	SNV	p.Leu201Pro	missense
ETV6	chr12:12022496	NM_001987.4	c.602T>C	SNV	p.Leu201Pro	missense
ETV6	chr12:12022496	NM_001987.4	c.602T>C	SNV	p.Leu201Pro	missense
ETV6	chr12:12037394	NM_001987.4	c.1025G>A	SNV	p.Trp342*	nonsense
EZH2	chr7:148506401	NM_004456.4		SNV		spliceite_3
EZH2	chr7:148507462	NM_004456.4	c.1992T>G	SNV	p.Asp664Glu	missense
EZH2	chr7:148508781	NM_004456.4	c.1883G>C	SNV	p.Gly628Ala	missense
EZH2	chr7:148511209	NM_004456.4	c.1693T>A	SNV	p.Cys565Ser	missense
EZH2	chr7:148512627	NM_004456.4	c.1506_1516	INDEL		frameshiftDeletion
EZH2	chr7:148523619	NM_004456.4	c.834A>T	SNV	p.Leu278Phe	missense
EZH2	chr7:148525838	NM_004456.4	c.619C>T	SNV	p.Arg207*	nonsense
EZH2	chr7:148525899	NM_004456.4	c.557_557delA	INDEL	p.Asp186Val	frameshiftDeletion
FLT3	chr13:28589759	NM_004119.2	c.2621A>G	SNV	p.Tyr874Cys	missense
FLT3	chr13:28599077	NM_004119.2	c.2211G>C	SNV	p.Met737Ile	missense
FLT3	chr13:28626716	NM_004119.2	c.580G>A	SNV	p.Val194Met	missense
GATA1	chrX:48649676	NM_002049.3	c.160A>T	SNV	p.Thr54Ser	missense
GATA1	chrX:48649688	NM_002049.3	c.172G>T	SNV	p.Ala58Ser	missense
GATA1	chrX:48651631	NM_002049.3	c.797C>T	SNV	p.Thr266Met	missense
GATA1	chrX:48652413	NM_002049.3	c.1084C>A	SNV	p.His362Asn	missense
IDH1	chr2:209108301	NM_005896.2	c.548A>G	SNV	p.Tyr183Cys	missense
IDH1	chr2:209113112	NM_005896.2	c.395G>T	SNV	p.Arg132Leu	missense
IDH1	chr2:209113112	NM_005896.2	c.395G>A	SNV	p.Arg132His	missense
IDH1	chr2:209113112	NM_005896.3	c.395G>T	SNV	p.Arg132Leu	missense
IDH1	chr2:209113113	NM_005896.2	c.394C>G	SNV	p.Arg132Gly	missense
IDH1	chr2:209116164	NM_005896.2	c.112G>A	SNV	p.Asp38Asn	missense
IDH2	chr15:90627553	NM_002168.2	c.1304C>T	SNV	p.Thr435Met	missense
IDH2	chr15:90631596	NM_002168.2	c.673G>A	SNV	p.Asp225Asn	missense
IDH2	chr15:90631838	NM_002168.2	c.515G>A	SNV	p.Arg172Lys	missense
IDH2	chr15:90631934	NM_002168.2	c.419G>A	SNV	p.Arg140Gln	missense
IDH2	chr15:90631934	NM_002168.2	c.419G>A	SNV	p.Arg140Gln	missense
IDH2	chr15:90631934	NM_002168.2	c.419G>A	SNV	p.Arg140Gln	missense
IDH2	chr15:90631934	NM_002168.2	c.419G>A	SNV	p.Arg140Gln	missense

JAK2	chr9:5073770	NM_004972.3	c.1849G>T	SNV	p.Val617Phe	missense
JAK2	chr9:5073770	NM_004972.3	c.1849G>T	SNV	p.Val617Phe	missense
JAK2	chr9:5073770	NM_004972.3	c.1849G>T	SNV	p.Val617Phe	missense
JAK2	chr9:5073770	NM_004972.3	c.1849G>T	SNV	p.Val617Phe	Missense
JAK2	chr9:5073770	NM_004972.3	c.1849G>T	SNV	p.Val617Phe	Missense
JAK2	chr9:5090745	NM_004972.3	c.2893G>A	SNV	p.Glu965Lys	Missense
JAK2	chr9:5126343	NM_004972.3	c.3188G>A	SNV	p.Arg1063His	Missense
JAK2	chr9:5126343	NM_004972.3	c.3188G>A	SNV	p.Arg1063His	Missense
JAK2	chr9:5126715	NM_004972.3	c.3323A>G	SNV	p.Asn1108Ser	Missense
JAK2	chr9:5126715	NM_004972.3	c.3323A>G	SNV	p.Asn1108Ser	Missense
KDM6A	chrX:44896923	NM_021140.2	c.643T>C	SNV	p.Tyr215His	Missense
KIT	chr4:55569954	NM_000222.2	c.821C>T	SNV	p.Thr274Met	Missense
KRAS	chr12:25362762	NM_004985.3	c.531_533delGAA	INDEL	p.Lys180Ser	nonframeshiftDeletion
KRAS	chr12:25362762	NM_004985.3	c.531_533delGAA	INDEL	p.Lys180Ser	nonframeshiftDeletion
KRAS	chr12:25398281	NM_004985.3	c.38G>A	SNV	p.Gly13Asp	Missense
KRAS	chr12:25398284	NM_004985.3	c.35G>A	SNV	p.Gly12Asp	Missense
KRAS	chr12:25398284	NM_033360.3	c.35G>A	SNV	p.Gly12Asp	Missense
MLL	chr11:118344191	NM_005933.3	c.2317C>G	SNV	p.Pro773Ala	Missense
MLL	chr11:118344500	NM_005933.3	c.2626A>G	SNV	p.Arg876Gly	Missense
MLL	chr11:118348730	NM_005933.3	c.3383C>G	SNV	p.Pro1128Arg	Missense
MLL	chr11:118369127	NM_005933.3	c.5836T>C	SNV	p.Cys1946Arg	Missense
MLL	chr11:118377003	NM_005933.3	c.10387A>G	SNV	p.Thr3463Ala	Missense
MPL	chr1:43804305	NM_005373.2	c.305G>C	SNV	p.Arg102Pro	Missense
MPL	chr1:43804313	NM_005373.2	c.313T>C	SNV	p.Phe105Leu	Missense
MPL	chr1:43815009	NM_005373.2	c.1544G>T	SNV	p.Trp515Leu	Missense
MPL	chr1:43818309	NM_005373.2	c.1774C>T	SNV	p.Arg592Ter	Nonsense
MPL	chr1:43818376	NM_005373.2	c.1841G>T	SNV	p.Gly614Val	Missense
NRAS	chr1:115252204	NM_002524.4	c.436G>A	SNV	p.Ala146Thr	Missense
PHF6	chrX:133549048	NM_032458.2	c.732G>C	SNV	p.Leu244Phe	Missense
PHF6	chrX:133549110	NM_032458.2	c.794T>C	SNV	p.Ile265Thr	Missense
PHF6	chrX:133549150	NM_032335.3	c.837G>A	SNV	p.Met279Ile	Missense
PRPF40B	chr12:50025238	NM_012272.1	c.55A>G	SNV	p.Ser19Gly	Missense
PRPF40B	chr12:50026641	NM_012272.1	c.242C>T	SNV	p.Ala81Val	Missense
PRPF40B	chr12:50037001	NM_001031698.2		INDEL		spliceite_5 utr_3
PRPF40B	chr12:50037001	NM_001031698.2		INDEL		spliceite_5 utr_3
PTEN	chr10:89690828	NM_000314.4	c.235G>A	SNV	p.Ala79Thr	Missense
RUNX1	chr21:36164601	NM_001754.4	c.1274C>T	SNV	p.Pro425Leu	Missense
RUNX1	chr21:36164803	NM_001754.4	c.1072A>C	SNV	p.Thr358Pro	Missense
RUNX1	chr21:36171607	NM_001754.4	c.958C>T	SNV	p.Arg320*	Nonsense
RUNX1	chr21:36171660	NM_001754.4	c.904_904delA	INDEL	p.Ile302Phe	frameshiftDeletion
RUNX1	chr21:36206774	NM_001754.4	c.722_737	INDEL	p.His241Arg	frameshiftDeletion
RUNX1	chr21:36206869	NM_001754.4	c.642_643	INDEL	p.Lys215Gly	Nonsense
RUNX1	chr21:36206893	NM_001754.4	c.617_618insA	INDEL	p.Arg207Thr	frameshiftInsertion
RUNX1	chr21:36252865	NM_001754.4	c.497G>A	SNV	p.Arg166Gln	Missense
RUNX1	chr21:36252866	NM_001754.4	c.496C>G	SNV	p.Arg166Gly	Missense

RUNX1	chr21:36252877	NM_001754.4	c.485G>A	SNV	p.Arg162Lys	Missense
RUNX1	chr21:36421162	NM_001754.4	c.35C>T	SNV	p.Ser12Leu	Missense
SF3A1	chr22:30733713	NM_005877.4	c.1917G>C	SNV	p.Met639Ile	missense
SF3A1	chr22:30742327	NM_005877.4	c.363_364insCAG	INDEL	p.Thr123Gln	nonframeshiftInsertion
SF3B1	chr2:198266713	NM_012433.2	c.2219G>T	SNV	p.Gly740Val	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198266834	NM_012433.2	c.2098A>G	SNV	p.Lys700Glu	missense
SF3B1	chr2:198267359	NM_012433.2	c.1998G>C	SNV	p.Lys666Asn	missense
SF3B1	chr2:198267360	NM_012433.2	c.1997A>G	SNV	p.Lys666Arg	missense
SF3B1	chr2:198267360	NM_012433.2	c.1997A>G	SNV	p.Lys666Arg	missense
SF3B1	chr2:198267371	NM_012433.2	c.1986C>G	SNV	p.His662Gln	missense
SF3B1	chr2:198267371	NM_012433.2	c.1986C>A	SNV	p.His662Gln	missense
SF3B1	chr2:198267483	NM_012433.2	c.1874G>T	SNV	p.Arg625Leu	missense
SF3B1	chr2:198267484	NM_012433.2	c.1873C>T	SNV	p.Arg625Cys	missense
SF3B1	chr2:198267484	NM_012433.2	c.1873C>T	SNV	p.Arg625Cys	missense
SH2B3	chr12:111885310	NM_005475.2	c.1198G>A	SNV	p.Glu400Lys	missense
TET2	chr4:106155837	NM_001127208.2	c.739_739delT	INDEL	p.Ser247fs	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106155890	NM_017628.4	c.792_792delC	INDEL	p.Thr265Leu	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106155993	NM_017628.4	c.895_895delG	INDEL	p.Asp299Met	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106156048	NM_017628.4	c.949C>T	SNV	p.Gln317*	nonsense
TET2	chr4:106156384	NM_017628.4	c.1285G>A	SNV	p.Gly429Arg	missense
TET2	chr4:106156670	NM_017628.4	c.1571_1572insTCTC	INDEL	p.Glu524Asp	frameshiftInsertion
TET2	chr4:106156747	NM_017628.4	c.1648C>T	SNV	p.Arg550*	nonsense
TET2	chr4:106157054	NM_001127208.2	c.1955A>C	SNV	p.Gln652Pro	missense
TET2	chr4:106157059	NM_017628.4	c.1960C>A	SNV	p.Gln654Lys	missense
TET2	chr4:106157064	NM_017628.4	c.1966_1967delCC	INDEL	p.Pro656Leu	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106157159	NM_017628.4	c.2060C>T	SNV	p.Ala687Val	missense
TET2	chr4:106157296	NM_017628.4	c.2198_2198delC	INDEL	p.Gln734Arg	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106157525	NM_017628.4	c.2427_2427delA	INDEL	p.Gln810Arg	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106157698	NM_017628.4	c.2599T>C	SNV	p.Tyr867His	missense
TET2	chr4:106157698	NM_017628.4	c.2599T>C	SNV	p.Tyr867His	missense
TET2	chr4:106157986	NM_017628.4	c.2887C>T	SNV	p.Gln963*	nonsense
TET2	chr4:106158000	NM_017628.4	c.2902_2903delCC	INDEL	p.Gln969Asn	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106158004	NM_017628.4	c.2905C>T	SNV	p.Gln969*	nonsense
TET2	chr4:106158012	NM_017628.4	c.2914_2914delT	INDEL	p.Ser972Leu	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106158201	NM_017628.4	c.3103_3103delT	INDEL	p.His1036Thr	frameshiftDeletion

TET2	chr4:106158350	NM_017628.4	c.3251A>C	SNV	p.Gln1084Pro	missense
TET2	chr4:106158350	NM_017628.4	c.3251A>C	SNV	p.Gln1084Pro	missense
TET2	chr4:106158399	NM_017628.4	c.3301_3307	INDEL	p.Leu1101Ile	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106162553	NM_001127208.2	c.3467A>T	SNV	p.Asn1156Ile	Missense
TET2	chr4:106164725	NM_001127208.2		SNV		spliceite_5
TET2	chr4:106164741	NM_001127208.2	c.3609C>G	SNV	p.Ser1203Arg	Missense
TET2	chr4:106164925	NM_001127208.2	c.3794_3797	INDEL	p.Asn1266fs	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106180783	NM_001127208.2	c.3811T>C	SNV	p.Cys1271Arg	Missense
TET2	chr4:106180841	NM_001127208.2	c.3869C>G	SNV	p.Ser1290Ter	Nonsense
TET2	chr4:106182957	NM_001127208.2	c.3996_3997insA	INDEL	p.Met1333fs	frameshiftInsertion
TET2	chr4:106190797	NM_001127208.2	c.4075C>T	SNV	p.Arg1359Cys	Missense
TET2	chr4:106190798	NM_001127208.2	c.4076G>A	SNV	p.Arg1359His	Missense
TET2	chr4:106190860	NM_001127208.2	c.4138C>T	SNV	p.His1380Tyr	Missense
TET2	chr4:106190860	NM_001127208.2	c.4138C>T	SNV	p.His1380Tyr	Missense
TET2	chr4:106190868	NM_001127208.2	c.4146C>G	SNV	p.His1382Gln	Missense
TET2	chr4:106193775	NM_001127208.2	c.4237G>T	SNV	p.Glu1413Ter	Nonsense
TET2	chr4:106193778	NM_001127208.2	c.4240C>G	SNV	p.Gln1414Glu	Missense
TET2	chr4:106193794	NM_001127208.2	c.4256C>G	SNV	p.Pro1419Arg	Missense
TET2	chr4:106193884	NM_001127208.2	c.4347_4347delT	INDEL	p.Arg1451fs	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106193889	NM_001127208.2	c.4352_4352delG	INDEL	p.Arg1452fs	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106193989	NM_001127208.2	c.4452_4452delC	INDEL	p.Asn1484fs	frameshiftDeletion
TET2	chr4:106196213	NM_001127208.2	c.4546C>T	SNV	p.Arg1516Ter	Nonsense
TET2	chr4:106196261	NM_001127208.2	c.4594C>T	SNV	p.Gln1532Ter	Nonsense
TET2	chr4:106196278	NM_001127208.2	c.4611G>T	SNV	p.Gln1537His	Missense
TET2	chr4:106196672	NM_001127208.2	c.5005A>T	SNV	p.Lys1669Ter	Nonsense
TET2	chr4:106197285	NM_001127208.2	c.5618T>C	SNV	p.Ile1873Thr	Missense
TET2	chr4:106197306	NM_001127208.2	c.5639T>C	SNV	p.Leu1880Pro	Missense
TET2	chr4:106197354		c.5687G>A	SNV	p.Arg1896Lys	
TET2	chr4:106197378	NM_001127208.2	c.5711A>G	SNV	p.His1904Arg	Missense
TET2	chr4:106197392	NM_001127208.2	c.5725G>T	SNV	p.Glu1909Ter	Nonsense
TP53	chr17:7573978	NM_000546.5	c.1049T>C	SNV	p.Leu350Pro	Missense
TP53	chr17:7577117	NM_000546.5	c.821T>A	SNV	p.Val274Asp	Missense
TP53	chr17:7577120	NM_000546.5	c.818G>A	SNV	p.Arg273His	Missense
TP53	chr17:7577120	NM_000546.5	c.818G>A	SNV	p.Arg273His	Missense
TP53	chr17:7577121	NM_000546.5	c.817C>T	SNV	p.Arg273Cys	Missense
TP53	chr17:7577517	NM_000546.5	c.764T>A	SNV	p.Ile255Asn	Missense
TP53	chr17:7577568	NM_000546.5	c.713G>A	SNV	p.Cys238Tyr	Missense
TP53	chr17:7577568	NM_000546.5	c.713G>T	SNV	p.Cys238Phe	Missense
TP53	chr17:7577570	NM_000546.5	c.711G>A	SNV	p.Met237Ile	Missense
TP53	chr17:7577570	NM_000546.5	c.711G>A	SNV	p.Met237Ile	Missense
TP53	chr17:7577571	NM_000546.5	c.704_709	INDEL	p.Asn235Met	nonframeshiftDeletion
TP53	chr17:7578206	NM_000546.5	c.643A>G	SNV	p.Ser215Gly	Missense
TP53	chr17:7578236	NM_000546.5	c.613T>A	SNV	p.Tyr205Asn	Missense
TP53	chr17:7578461	NM_000546.5	c.469G>A	SNV	p.Val157Ile	Missense
TP53	chr17:7578466	NM_000546.5	c.464C>T	SNV	p.Thr155Ile	Missense

TP53	chr17:7579365	NM_000546.5	c.307_321	INDEL	p.Tyr103Gly	nonframeshiftDeletion
U2AF1	chr21:44514777	NM_006758.2	c.470A>G	SNV	p.Gln157Arg	missense
U2AF1	chr21:44514777	NM_006758.2	c.470A>C	SNV	p.Gln157Pro	missense
U2AF1	chr21:44514777	NM_006758.2	c.470A>C	SNV	p.Gln157Pro	missense
U2AF1	chr21:44524456	NM_006758.2	c.101C>T	SNV	p.Ser34Phe	missense
U2AF1	chr21:44524456	NM_006758.2	c.101C>T	SNV	p.Ser34Phe	missense
U2AF1	chr21:44524456	NM_006758.2	c.101C>T	SNV	p.Ser34Phe	missense
ZRSR2	chrX:15818078	NM_005089.3		SNV		spliceite_3
ZRSR2	chrX:15822249	NM_005089.3	c.328C>T	SNV	p.Gln110*	nonsense
ZRSR2	chrX:15822297	NM_005089.3	c.376C>T	SNV	p.Arg126*	nonsense
ZRSR2	chrX:15833916	NM_005089.3	c.674T>A	SNV	p.Leu225Gln	missense
ZRSR2	chrX:15833921	NM_005089.3	c.679T>C	SNV	p.Tyr227His	missense
ZRSR2	chrX:15834000	NM_005089.3	c.758T>G	SNV	p.Val253Gly	missense
ZRSR2	chrX:15836766	NM_005089.3		SNV		spliceite_3
ZRSR2	chrX:15838385	NM_005089.3	c.883C>T	SNV	p.Arg295*	nonsense
ZRSR2	chrX:15838436	NM_005089.3	c.934T>G	SNV	p.Cys312Gly	missense

Anexo 8.2. Listado de tablas

- Tabla 1.1.** Criterios definidos como pre-requisitos, decisivos o co-criterios en el diagnóstico de SMD
- Tabla 1.2.** Cambios de dishematopoyesis de causa no clonal
- Tabla 1.3.** Rasgos displásicos más frecuentes encontrados en sangre periférica
- Tabla 1.4.** Rasgos displásicos más frecuentes encontrados en médula ósea
- Tabla 1.5.** Alteraciones cromosómicas recurrentes consideradas como evidencia de SMD
- Tabla 1.6.** Nueva revisión citogenética, adaptada de Schanz JCO 2012
- Tabla 1.7.** Clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) de los SMD.
- Tabla 1.8.** Sistema pronóstico internacional (IPSS) para SMD
- Tabla 1.9.** Sistema pronóstico basado en la clasificación de la OMS (= WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS) para SMD
- Tabla 1.10.** Clasificación de la OMS 2008
- Tabla 1.11.** Parámetros establecidos para cálculo del IPSSr.
- Tabla 1.12.** Recomendaciones del grupo trabajo de ELN para análisis de displasia por itometría de flujo.
- Tabla 1.13.** Vías celulares y genes frecuentemente mutados en SMD
-
- Tabla 3.1.** Panel de anticuerpos utilizado en el estudio por citometría de flujo
- Tabla 3.2.** Flujo de trabajo para secuenciación masiva con la tecnología de *Life Technologies*
- Tabla 3.3.** Genes seleccionados y regiones secuenciadas
- Tabla 3.4.** Condiciones para la amplificación inicial de los fragmentos (amplicones)
-
- Tabla 4.1.** Características de los pacientes y controles incluidos en el análisis
- Tabla 4.2.** Resumen de los resultados del análisis inmunofenotípico en pacientes y controles
- Tabla 4.3.** Diferencias de maduración normalizadas para un paciente.
- Tabla 4.4.** Posibles valores del test diagnóstico, con los correspondientes valores de sensibilidad y (1- especificidad) en función de los mismos
- Tabla 4.5.** Características de los pacientes con SMD incluidos en el análisis
- Tabla 4.6.** Frecuencia de mutaciones encontradas. Comparación con otras series.
- Tabla 4.7.** Carga tumoral por gen mutado (promedio, y rango)
- Tabla 4.8.** Variables clínicas significativas para supervivencia en análisis univariante

- Tabla 4.9.** Genes con mutaciones significativas para supervivencia en análisis univariante
- Tabla 4.10.** Scores moleculares con significación pronóstica en supervivencia
- Tabla 4.11.** Diferencias en supervivencia en cada subgrupo de SMD en función de presencia o no de mutaciones de impacto pronóstico adverso (score Bejar)
- Tabla 4.12.** Diferencias en supervivencia en cada subgrupo de SMD en función de presencia o no de mutaciones de impacto pronóstico adverso (score 12 Octubre)
- Tabla 4.13.** Diferencias en supervivencia en cada subgrupo de SMD en función de presencia o no de mutaciones de impacto pronóstico adverso (score molecular pronóstico)
- Tabla 4.14.** Impacto en la supervivencia en función del número de mutaciones adquiridas
- Tabla 4.15.** Frecuencia de CNV en los genes analizados, y descripción del tipo de variación adquirida mayoritariamente (ganancia, pérdida, o ambas G/P)
- Tabla 4.16.** Comparación entre los pacientes con SMD de bajo riesgo con o sin CNV en ***GATA1***
- Tabla 4.17.** Comparación entre los pacientes con SMD de alto riesgo con o sin CNV en ***HRAS***

Anexo 8.3. Listado de figuras

- Figura 1.1.** Curva de incidencia de SMD según sexo y décadas de edad
- Figura 1.2.** Rasgos displásicos en serie mieloide.
- Figura 1.3.** Rasgos displásicos en serie eritroide.
- Figura 1.4.** Rasgos displásicos en serie megacariocítica.
- Figura 1.5.** Distribución de alteraciones citogenéticas en 2124 pacientes con SMD.
- Figura 1.6.** Curvas de supervivencia global en función de la clasificación FAB de SMD.
- Figura 1.7.** Curvas de supervivencia global y riesgo de progresión a leucemia aguda en pacientes con SMD en función de los grupos de riesgo del IPSS.
- Figura 1.8.** Supervivencia global (meses) y tiempo (meses) a transformación leucémica en pacientes con SMD en función del grupo de riesgo del IPSSr.
- Figura 1.9.** Vías celulares funcionales y genes implicados
- Figura 1.10.** Esquema de la participación de los genes de metilación y modificadores de la cromatina en la regulación epigenética
-
- Figura 3.1.** Estrategia de análisis para progenitores
- Figura 3.2.** Estrategia de análisis de la serie mieloide
- Figura 3.3.** Análisis de la población monocítica y de la serie eritroide
- Figura 3.4.** Estrategia de análisis de la población linfocito B
- Figura 3.5.** Tecnología de secuenciación masiva por método de semiconducción iónica
- Figura 3.6.** Resume los pasos del procedimiento de amplificación y preparación de librerías
- Figura 3.7.** Se selecciona tipo de muestra (ADN) y tipo de amplificación (amplicones)
- Figura 3.8.** Pantalla de inicio del secuenciador
- Figura 3.9.** Microchip Ion PI™ y procedimiento de carga de muestra y reactivos.
- Figura 3.10.** Densidad uniforme de carga del microchip
- Figura 3.11.** Tamaño medio de fragmentos leídos
- Figura 3.12.** Gráfico de las alteraciones genómicas analizadas
-
- Figura 4.1.** Esquemas de maduración en s. granulocítica
- Figura 4.2.** Representación de la distribución de las variables del score Ogata en controles y pacientes

- Figura 4.3.** Archivo fusionado de la población granulocítica de los controles
- Figura 4.4.** Representación de la expresión de los marcadores CD16 (rojo), CD13 (azul) y CD11b (naranja) durante los diferentes estadios madurativos de la s. granulocítica en las muestras de los controles.
- Figura 4.5.** S. granulocítica de un control, esquema CD11b/CD16 y esquema CD13/CD16
- Figura 4.6.** Diferencias de maduración normalizadas para un control.
- Figura 4.7.** S. granulocítica de un paciente, esquema CD11b/CD16 y esquema CD13/CD16
- Figura 4.8.** Diferencias de maduración normalizadas para un paciente.
- Figura 4.9.** Representación de la distribución del número de desviaciones acumuladas en los 4 estadios madurativos y en los marcadores CD16, CD13, CD11b, CD45, en controles, pacientes con bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo.
- Figura 4.10.** Curva ROC de nuestro test diagnóstico
- Figura 4.11.** Distribución de los pacientes según clasificación OMS.
- Figura 4.12.** Distribución de las causas de mortalidad.
- Figura 4.13.** Frecuencia de mutaciones, proporción en función de subtipo de SMD
- Figura 4.14.** Distribución de mutaciones en los genes analizados por muestra de paciente
- Figura 4.15.** Proporción de mutaciones de cada vía en función del subtipo de SMD (bajo, alto riesgo o NMP/SMD).
- Figura 4.16.** Curvas de supervivencia en función de porcentaje de blastos en MO, niveles de plaquetas al diagnóstico, riesgo citogenético, y grupos de riesgo IPSSr
- Figura 4.17.** Curvas de supervivencia en función de presencia de mutación (1) o no (0) de los genes *TP53*, *RUNX1*, *EZH2*, *KRAS*, *U2AF1*, y con presencia de alguna mutación en la vía de transcripción.
- Figura 4.18.** Curvas de supervivencia en función de la ausencia de mutación (0) o presencia de al menos 1 mutación de los genes incluidos en los *scores* de Bejar (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *ETV6* y *ASXL1*), H 12 Octubre (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *KRAS* y *U2AF1*) y *score* molecular pronóstico (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *ETV6*, *ASXL1*, *KRAS* y *U2AF1*).
- Figura 4.19.** Curvas de supervivencia en los tres grupos de riesgo (bajo, intermedio, alto) en función de ausencia de mutaciones (0), o presencia de al menos una mutación de impacto pronóstico adverso en Score Bejar.

- Figura 4.20.** Curvas de supervivencia en los tres grupos de riesgo (bajo, intermedio, alto) en función de ausencia de mutaciones (0), o presencia de al menos una mutación de impacto pronóstico adverso en Score 12 Octubre.
- Figura 4.21.** Curvas de supervivencia en los tres grupos de riesgo (bajo, intermedio, alto) en función de ausencia de mutaciones (0), o presencia de al menos una mutación de impacto pronóstico adverso.
- Figura 4.23.** Distribución de CNV en los genes y muestras analizadas
- Figura 4.22.** Curvas de supervivencia global en función de presentar de 0-2 mutaciones versus más de 2.
- Figura 4.23.** Distribución de CNV en los genes y muestras analizadas
- Figura 4.24.** Distribución de CNV en los 6 genes más frecuentes, con representación proporcional en los diferentes grupos diagnósticos de la OMS.
- Figura 4.25.** Distribución de CNV en los 6 genes más frecuentes, con representación proporcional en los diferentes grupos pronósticos del IPSSr.
- Figura 4.26.** Curvas de supervivencia en pacientes con SMD en función de presencia (1) o ausencia (0) de CNV en los genes *HRAS*, *SF1*, *GATA1*, *ATRX*, *TET2* y *KIT*.
- Figura 4.27.** Curvas de supervivencia en pacientes de bajo riesgo con presencia o no de CNV en *GATA1*, y en pacientes de alto riesgo con presencia o no de CNV en *HRAS*.
- Figura 4.28.** Curvas de supervivencia en pacientes de alto riesgo con presencia o no de CNV en *HRAS*.