

# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Facultat de Medicina i Odontologia**

Departament de Medicina



## **Caracterización molecular de la anemia refractaria con sideroblastos en anillo mediante un panel de secuenciación de segunda generación**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Iván Martín Castillo**

Dirigida por:

**Dr. Miguel Ángel Sanz Alonso**

**Dr. José Vicente Cervera Zamora**

**Dra. Esperanza Such Taboada**





VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departament de Medicina

**MIGUEL ÁNGEL SANZ ALONSO**, Catedrático y Profesor Honorario del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia e Investigador Emérito del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

**JOSÉ VICENTE CERVERA ZAMORA**, Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia y Jefe de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitari i Politècnic La Fe,

**ESPERANZA SUCH TABOADA**, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia y adjunta del Servicio de Citogenética Hematológica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe,

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada: “**Caracterización molecular de los síndromes mielodisplásicos con sideroblastos en anillo**” ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Iván Martín Castillo**, Licenciado en Biología y Máster en Investigación Biomédica, y reúne a nuestro juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

En Valencia a 1 de julio de 2019

Fdo.: **Dr. Miguel Ángel Sanz Alonso.**

Fdo.: **Dr. José Vte. Cervera Zamora**

Fdo.: **Dra. Esperanza Such Taboada**



***“En los momentos de crisis, sólo la imaginación  
es más importante que el conocimiento”***

*Albert Einstein*



# AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado a que esta Tesis salga adelante y que han estado a mi lado en los buenos y malos momentos.

En primer lugar quería darle las gracias al Prof. Miguel Ángel Sanz por darme la oportunidad de unirme a su grupo, por ser uno de mis referentes científicos, y por dedicarme su valioso tiempo en guiarme en todos los aspectos de este manuscrito. Gracias especialmente a él y al Dr. Guillermo Sanz, por mostrar interés y valorar mi primer trabajo de investigación que expuse en el Servicio de Hematología una mañana de 2014. Para ellos fue una sesión más, pero para un principiante y temeroso investigador como yo, fue el impulso definitivo que me animó a dedicarme a esto.

Gracias al Dr. José Cervera por contratarme y darme un oficio cuando más perdido estaba y más negro lo veía todo. Gracias por tu paciencia en formarme, por escuchar siempre mis propuestas, por todo lo que me has enseñado y por tener siempre un plan para que aprendiera de los mejores las últimas novedades. Aunque quizás al irme sentiste que te fallara, he de decirte que en parte fue consecuencia de la ilusión y entusiasmo que me transmitiste por la Hematología, disfruto de la investigación y actualmente me siguen faltando horas para llevar a cabo todas las ideas que se me pasan por la cabeza.

A la Dra. Esperanza Such, gracias por ayudar a decidir a Jose a que me diera la primera oportunidad, por exigirme para que no me relajara, por valorar y defender siempre mi trabajo y por tener más confianza en mí que incluso yo mismo. Gracias por las mañanas que me sentaste a tu lado para enseñarme hematología, biología molecular, estadística, cariotipos, etc. Siempre con una sonrisa y con mucha paciencia. Gracias por “ponerme las pilas”, ¿y la Tesis pa cuando?, y ayudar a que le diera un último y definitivo impulso a este trabajo.

A mis compañer@s de laboratorio, a M<sup>a</sup> Ángeles, por cuidar del chico nuevo y enseñarme desde el primer día con gran amabilidad. El aterrizaje en un sitio nuevo siempre es difícil, pero con personas como tú todo se hace más fácil. A la Dra. Mariam Ibáñez, por rescatarme de ordenar Carnoys (menuda listita de muestras Jose jaja) y ser la primera en confiarme tus experimentos. Gracias por toda la biología molecular que me has enseñado, por tener siempre palabras de ánimo y por ayudarme siempre que te he necesitado. Gracias a la Dra. Eva Villamón, por ser una excelente compañera, una gran amiga, una buena profesora de laboratorio y ser una de las

personas que más ha valido la pena encontrarme en este camino. Gracias a hematólogas como María, Inés e Irene por todo lo que me han enseñado y ayudado, especialmente en mis primeros trabajos de investigación que era cuando más lo necesitaba. Gracias a todo el Servicio de Hematología del Hospital la Fe por estar lleno de excelentes profesionales y aportar tanto a mi formación.

Gracias a mi “supercompí” “supermaja” Ana. Gran parte de esta travesía la he recorrido con tu ayuda, como persona y profesional eres un 10. Gracias a Mari Carmen, Emma y Desi, siempre sacándome una sonrisa y haciendo más llevaderos mis días en el laboratorio.

Gracias a todos mis compañeros de la Unidad Genómica. Gracias a Dolors por las valiosas clases de biología molecular pero también de la vida en el coche de camino al trabajo. Gracias a Laia por todo lo que me ha enseñado y a Sarah y Jorge por todo lo que me han ayudado.

Gracias al resto de Servicios del Hospital la Fe por estar lleno de profesionales como el Dr. Silvestre Oltra y la Dra. Eva Barragán que siempre me han ayudado en todo lo que he necesitado.

Agradecer también al Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Valencia, especialmente a la Dra. Blanca Navarro, por darme la oportunidad de volver a trabajar en un campo que me apasiona. Gracias por animarme y ayudarme en todos los trabajos que me he propuesto realizar, incluida esta Tesis.

A mis amigos de Universidad, Isaac, Gustavo, Jesús, Alberto y Sheila, por compartir conmigo tantos momentos únicos. Quien iba a pensar que el desastre que se le escapaban las *Drosophilas* por el laboratorio pudiera tener algún futuro en la Genética.

A Raúl, por ser mi mejor amigo desde la infancia y estar siempre que le he necesitado.

Y por supuesto, dar las gracias a los más importantes, mi familia. Gracias a mi madre, por tu esfuerzo en darme los estudios que yo quería y ser el ejemplo más valioso para comportarme por la vida. Gracias a mi padre, que aunque hace años que se fue, siempre le he sentido a mi lado, ayudándome de una manera que un científico como yo no sabría explicar. Gracias a mis abuelos que lamentablemente se fueron también, porque gran parte de lo que soy se lo debo a ellos.

Y por último, pero no menos importante, a mi mujer Vanesa y a mis hijas, Aitana y Lucía. Gracias Vanesa por entenderme, creer en mí y por ser mi compañera durante media vida. Gracias por darme lo más importante que tengo, nuestras hijas. Gracias Aitana y Lucía por enseñarme lo que es la felicidad, gracias por recordarme cada día que lo más especial de mi vida ocurre cuando apago el ordenador, levanto la cabeza y os veo riendo, jugando...



# ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. GENERALIDADES SOBRE LA HEMATOPOYESIS.....	3
1.2. MIELOPOYESIS: SERIE ERITROBLÁSTICA .....	4
1.3. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS.....	6
1.3.1. Criterios diagnósticos.....	6
1.3.2. Métodos de clasificación.....	8
1.3.3. Estimación del pronóstico .....	10
1.4. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS CON SIDEROBLASTOS EN ANILLO .....	11
1.4.1. Descripción, patogenia y opciones terapéuticas .....	11
1.4.2. Alteraciones moleculares .....	14
1.4.3. Gen <i>SF3B1</i> .....	15
1.5. MUTACIONES GENÉTICAS Y RESPUESTA A AZACITIDINA .....	20
1.6. SECUENCIACIÓN DE ÚLTIMA GENERACIÓN EN ONCOHEMATOLOGÍA .....	21
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4. PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1. PACIENTES.....	35
4.2. ESTUDIO CITOGENÉTICO.....	35
4.2.1. Cultivo.....	35
4.2.2. Sacrificio del cultivo .....	36
4.2.3. Preparación de extensiones.....	36
4.2.4. Tinción de bandas G.....	36
4.2.5. Análisis del cariotipo .....	36
4.3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES.....	37
4.3.1. Extracción de ácidos nucleicos .....	37
4.3.2. Caracterización molecular de los pacientes .....	37

4.4. DEFINICIONES.....	42
4.5. RESPUESTA A AZACITIDINA .....	43
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	43
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	46
5.1 ANÁLISIS DE CALIDAD DE LA SECUENCIACIÓN .....	49
5.2. FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LA SERIE GLOBAL .....	50
5.3. MUTACIONES EN GENES DE <i>SPLICING</i> .....	57
5.4. MUTACIONES EN GENES DE METILACIÓN .....	58
5.5. OTRAS MUTACIONES GENÉTICAS.....	60
5.6. IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y DE LAS MUTACIONES EN EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES .....	62
5.7. IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y DE LAS MUTACIONES EN LA RESPUESTA A AZACITIDINA.....	68
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>87</b>
<b>9. PROYECCIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>105</b>
<b>10. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS .....</b>	<b>109</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Alteraciones morfológicas constitutivas de displasia.....	7
<b>Tabla 2.</b> Criterios mínimos para el diagnóstico de los SMD. ....	7
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los SMD según la FAB. ....	8
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de los SMD según la OMS 2016. ....	9
<b>Tabla 5.</b> Índice Pronóstico Internacional Revisado (IPSS-R). ....	11
<b>Tabla 6.</b> Estudios que analizan la relevancia en el pronóstico de las mutaciones de <i>SF3B1</i> en pacientes con SMD. ....	19
<b>Tabla 7.</b> Estudios más relevantes en pacientes tratados con agentes hipometilantes (HMA). ....	21
<b>Tabla 8.</b> Genes incluidos en el panel. ....	39
<b>Tabla 9.</b> Características principales de la serie global de pacientes con SMD-SA. ....	47
<b>Tabla 10.</b> Mutaciones <i>missense</i> , <i>frameshift</i> y <i>nonsense</i> en la serie analizada. ....	52
<b>Tabla 11.</b> Mutaciones en regiones de <i>splicing</i> en la serie analizada. ....	56
<b>Tabla 12.</b> Tipos y frecuencias de las mutaciones de <i>SF3B1</i> encontradas en la serie. ....	58
<b>Tabla 13.</b> Características de los pacientes con mutaciones en <i>JAK2</i> . ....	61
<b>Tabla 14.</b> Características de los pacientes con progresión a LMA. ....	64
<b>Tabla 15.</b> Análisis multivariantes para la supervivencia y para el riesgo de transformación leucémica. ....	67
<b>Tabla 16.</b> Características de los pacientes tratados con azacitidina. ....	69



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> División y diferenciación de la célula madre (CFU-LM) para dar lugar a los progenitores y precursores hematopoyéticos de las distintas series celulares (Metcalf D, 2007).....	4
<b>Figura 2.</b> Diferenciación y maduración en la serie eritroblástica (Nispon E, 2001). .....	5
<b>Figura 3.</b> Aspecto morfológico de los sideroblastos en anillo a dos aumentos de microscopía. ....	12
<b>Figura 4.</b> Algoritmo de tratamiento empleado en los SMD de bajo riesgo. ....	14
<b>Figura 5.</b> Componentes de U2snRNP donde se muestra la partícula SF3B1 en interacción directa con el ARNm.....	16
<b>Figura 6.</b> Organización en dominios funcionales de la subunidad 1 del factor de <i>splicing</i> SF3B.....	16
<b>Figura 7.</b> Representación del desarrollo de sideroblastos en anillo en los pacientes con SMD.....	17
<b>Figura 8.</b> Frecuencia mutacional junto con las alteraciones citogenéticas más frecuentes identificadas en una cohorte de 738 pacientes con SMD. ....	22
<b>Figura 9.</b> Secuenciación por síntesis con dos tecnologías (Modificada de Goodwin <i>et al.</i> , 2016).....	24
<b>Figura 10.</b> Los paneles NGS de amplicones se basan en la amplificación por PCR de las regiones de interés mediante la unión de cebadores específicos.....	38
<b>Figura 11.</b> Esquema del proceso de preparación de las librerías y su secuenciación.	40
<b>Figura 12.</b> Imagen del software IGV que muestra la detección de una variante en el gen <i>TP53</i> .....	41
<b>Figura 13.</b> Informe de calidad obtenido tras secuenciar 53 muestras en la primera carrera NGS. ....	49
<b>Figura 14.</b> Número de mutaciones encontradas en los pacientes de la serie con SMD-SA.....	50
<b>Figura 15.</b> Distribución de mutaciones obtenida en los 122 pacientes de la serie con SMD-SA.....	51
<b>Figura 16.</b> Localización de las mutaciones en el gen <i>DNMT3A</i> y estructura de su proteína. ....	59

<b>Figura 17.</b> Curvas para la supervivencia global según los índices pronósticos calculados.....	62
<b>Figura 18.</b> Curva de supervivencia global según la dependencia transfusional de los pacientes.....	63
<b>Figura 19.</b> Curvas de supervivencia de los pacientes con SMD-SA según sus mutaciones.....	65
<b>Figura 20.</b> Curvas de supervivencia global según el número de mutaciones por paciente.....	68
<b>Figura 21.</b> Curvas de supervivencia global para los pacientes tratados con azacitidina. .....	70

# GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**ADN** = Ácido desoxirribonucleico

**AEE** = Agente estimulante de la eritropoyesis

**AREB** = Anemia refractaria con exceso de blastos

**AREB-T** = Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

**ARN** = Ácido ribonucleico

**AR** = Anemia refractaria

**ARSA** = Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

**AZA** = Azacitidina

**CH** = Concentrado de hematíes

**CG** = Citogenética

**CRDM-SA** = Citopenia refractaria con displasia multilinea y sideroblastos en anillo

**DEC** = Decitabina

**DU** = Displasia unilínea

**DM** = Displasia multilinea

**FAB** = Franco-Americano-Británico

**FISH** = *Fluorescence in situ hybridization*

**Hb** = Hemoglobina

**HMA** = Agentes hipometilantes

**IPSS** = *International Prognostic Scoring System*

**IPSS-R** = *Revised International Prognostic Scoring System*

**ISCN** = Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica

**LMA** = Leucemia mieloide aguda

**LMC** = Leucemia mieloide crónica

**LMMC** = Leucemia mielomonocítica crónica

**MO** = Médula ósea

**NGS** = *Next generation sequencing*

**NMP** = Neoplasias mieloproliferativas

**NTP** = Nucleótido trifosfato

**OMS** = Organización Mundial de la Salud

**PCR** = Reacción en cadena de la polimerasa

**PMN** = Leucocitos polimorfonucleares

**SA** = Sideroblastos en anillo

**SG** = Supervivencia global

**SMD** = Síndrome mielodisplásico

**SMD/NMP-SA-T** = Síndrome mielodisplásico/neoplasia mieloproliferativa con sideroblastos en anillo y trombocitosis

**SMPC** = Síndrome mieloproliferativo crónico

**SP** = Sangre periférica

**SNP** = *Single Nucleotide Polymorphism*

**t-LMA** = Transformación a leucemia mieloide aguda

**TPH** = Trasplante de progenitores hematopoyéticos

**VAF** = *Variant allele frequency*

# 1. INTRODUCCIÓN

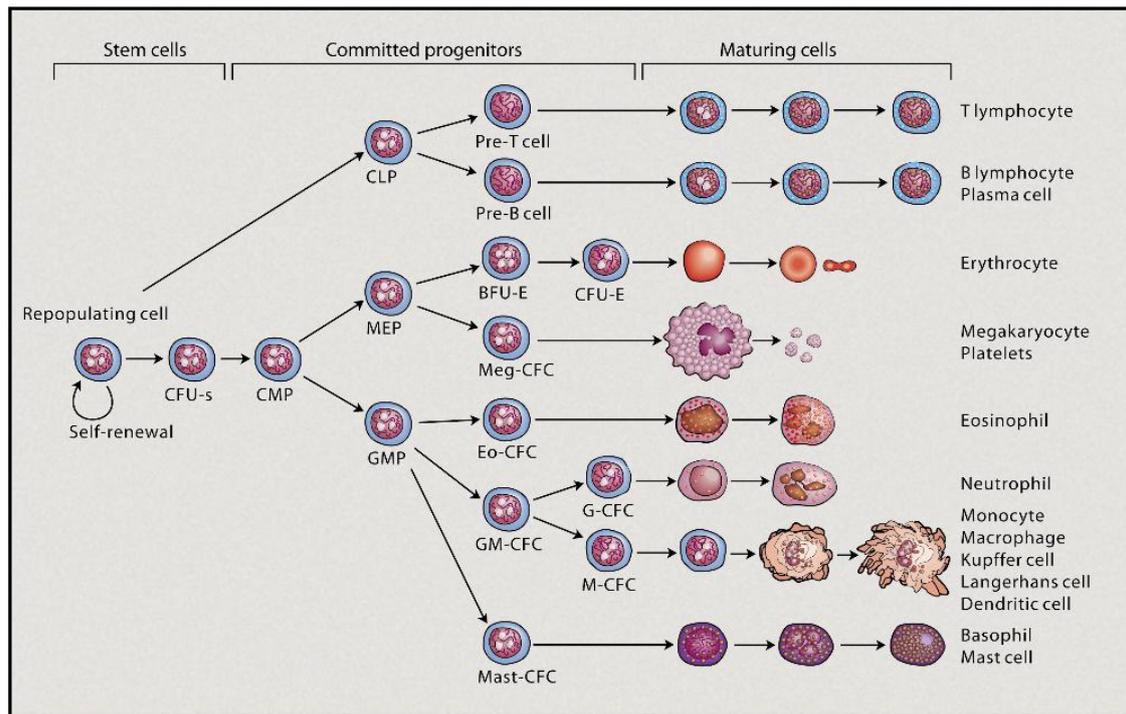


## 1.1. Generalidades sobre la hematopoyesis

La hematopoyesis es el mecanismo fisiológico responsable de la formación continua de los distintos tipos de elementos formes sanguíneos y se desarrolla en la médula ósea debido a su capacidad de permitir el anidamiento, el crecimiento y la diferenciación de las células germinales hematopoyéticas. Durante los dos primeros años de vida la médula ósea activa (médula roja) se localiza en todos los huesos y es gradualmente reemplazada por tejido medular inactivo (médula amarilla o grasa). En el adulto los huesos que albergan médula ósea con capacidad hematopoyética son: cráneo, esternón, costillas, clavículas, vértebras, pelvis y las epífisis de los huesos largos.

Las células germinales hematopoyéticas hallan en la médula ósea el lecho y las condiciones idóneas para su desarrollo y diferenciación hacia células maduras. Entre las células germinales, las correspondientes al estadio más diferenciado, son reconocibles con el microscopio óptico y se denominan **precursores** hematopoyéticos, mientras que las células más inmaduras o **progenitores** no son reconocibles mediante técnicas microscópicas, debido a que no poseen distintivos morfológicos precisos (Woessner *et al.*, 2006).

El primer estadio de célula progenitora se denomina CFU-LM o célula madre linfomieloide y consiste en una célula pluripotente con capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación múltiple (Schoemans *et al.*, 2008). A partir de la célula CFU-LM aparece la célula germinal linfoide (CFU-L), que dará lugar a linfocitos B, linfocitos T y linfocitos NK, y la célula germinal mieloide (CFU-M) que dará lugar a plaquetas, eritrocitos, granulocitos, monocitos y células dendríticas mieloides (**Figura 1**).



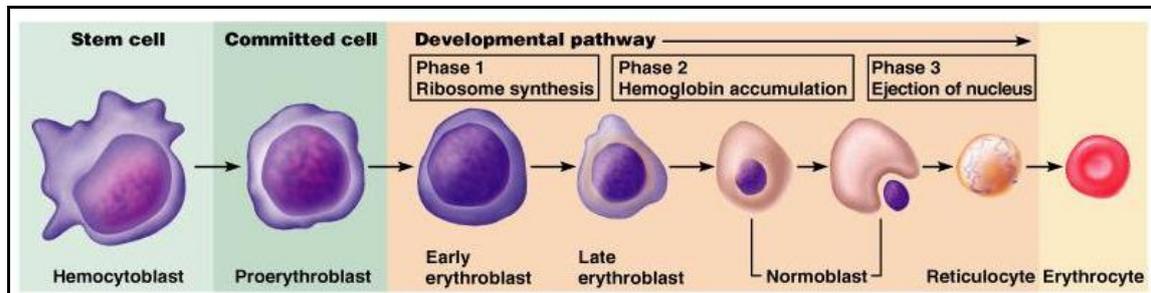
**Figura 1.** División y diferenciación de la célula madre (CFU-LM) para dar lugar a los progenitores y precursores hematopoyéticos de las distintas series celulares (Metcalf D, 2007).

La hematopoyesis está regulada por mecanismos de gran complejidad en los que las células hematopoyéticas interactúan entre sí, con su microambiente, con factores de crecimiento y con la matriz extracelular. Éste alto número de interacciones celulares requiere un amplio número de receptores de superficie especializados en la adhesión celular, como el receptor de la célula T, y en la transmisión de señales procedentes de otras células como las interleucinas, los factores de crecimiento, etc. (Lee *et al.*, 2008).

## 1.2. Mielopoyesis: serie eritroblástica

La mielopoyesis comprende el proceso de generación, desarrollo y maduración de los componentes mieloides sanguíneos: eritrocitos, megacariocitos, monocitos y granulocitos. La mayoría de las células de la médula ósea pertenecen a precursores granulocíticos y eritroides con una proporción normal de 2 a 1. La secuencia madurativa de la serie eritroblástica se inicia con el proeritroblasto, una célula de gran tamaño con una relación núcleo-citoplasma aumentada y un nucléolo evidente. Su división y maduración da lugar al eritroblasto basófilo, éste al eritroblasto policromático

y finalmente al eritroblasto ortocromático (**Figura 2**). Los cambios morfológicos que experimentan los progenitores eritroides durante su maduración se caracterizan por una notable disminución del tamaño nuclear, con una condensación progresiva de la cromatina y la desaparición de los nucléolos (Kaushansky *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Diferenciación y maduración en la serie eritoblástica (Nicpon E, 2001).

Mediante la tinción de Perls (liberación de los iones férricos de las proteínas con ácido clorhídrico y precipitación posterior con ferrocianuro potásico) es posible identificar en el citoplasma de algunos eritroblastos distintos depósitos de hierro a modo de gránulos de hemosiderina. Estos eritroblastos, de nombre sideroblastos, suelen tener en condiciones normales de 1 a 4 gránulos hemosiderínicos distribuidos arbitrariamente por su superficie citoplasmática.

El eritroblasto ortocromático tiene un tamaño pequeño (7-10  $\mu\text{m}$ ) y un núcleo picnótico con cromatina muy condensada. No posee capacidad mitótica, pero mantiene la capacidad de síntesis de proteínas y hemoglobina. Con la pérdida del núcleo, el eritroblasto ortocromático se transforma en reticulocito, elemento anucleado que todavía posee cierta capacidad de síntesis de ARN, proteínas y hemoglobina, gracias a la persistencia de algunas mitocondrias, ribosomas y restos de retículo endoplásmico (Perkins *et al.*, 2009).

El reticulocito permanece algunos días en la médula ósea y pasa posteriormente a la sangre periférica, donde persiste alrededor de 24 horas y finaliza su maduración. A medida que el reticulocito madura, va perdiendo retículo gránulo-filamentoso hasta transformarse en un eritrocito maduro. Los eritrocitos ya formados son elementos anucleados, de color rosado, con forma de disco bicóncavo y poseen una alta concentración de hemoglobina la cual les permite desarrollar su función principal: captar oxígeno y transportarlo a los tejidos.

### 1.3. Síndromes mielodisplásicos

#### 1.3.1. Criterios diagnósticos

La producción de las distintas células sanguíneas es susceptible de verse afectada por multitud de procesos patológicos que a su vez pueden afectar a la proliferación y/o diferenciación celular. Estas alteraciones pueden surgir tanto en la estirpe linfoide como mieloide y por tanto dar lugar a la gran heterogeneidad de trastornos hematológicos descritos (Alber *et al.*, 2016). En particular, los síndromes mielodisplásicos (SMD), son hemopatías clonales que afectan a la línea mieloide y se caracterizan por una anormal diferenciación y maduración celular que cursa con una mielopoyesis ineficaz e intensamente alterada en su morfología y/o función. Constituyen un complejo y heterogéneo grupo de neoplasias de las células progenitoras hematopoyéticas que comparten como características comunes la presencia de citopenias, mielodisplasia, hematopoyesis ineficaz y un riesgo variable de progresión a leucemia mieloide aguda (LMA). Constituyen una de las neoplasias hematológicas más frecuentes en personas de edad avanzada con una mediana de presentación de 70 años y un 25% de los pacientes diagnosticados con más de 80 años (Germing *et al.*, 2004).

En su patogenia intervienen diversas alteraciones citogenéticas combinadas con mutaciones del ADN en genes que intervienen en la proliferación, diferenciación o apoptosis celular.

Debido a la heterogeneidad de los SMD, el diagnóstico requiere de una completa anamnesis y exploración física del paciente, así como una exhaustiva revisión de su historia clínica que incluya los antecedentes personales y familiares de otros trastornos de susceptibilidad hereditaria a neoplasias de estirpe mieloide (anemia de Fanconi, disqueratosis congénita,...) así como posibles exposiciones a tóxicos (tabaco, alcohol, benzol,...) y fármacos (quimioterápicos, factores de crecimiento, etc.) (Valcárcel *et al.*, 2012). Respecto a las exploraciones complementarias, en los estudios de sangre periférica (SP) y medula ósea (MO) pueden descubrirse citopenias o displasias en alguna de las series mieloides: megacariocítica, eritrocítica o granulocítica. Se considera que una línea es displásica cuando el 10% o más de sus elementos son dismórficos (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Alteraciones morfológicas constitutivas de displasia

<b>Diseritropoyesis</b>	Puentes internucleares, multinuclearidad, mitosis anómalas, punteado basófilo, cariorrexis, <u>sideroblastos en anillo</u> .
<b>Disgranulopoyesis</b>	Gigantismo nuclear, hipersegmentación/hiposegmentación nuclear, núcleos en anillo, bastones de Auer.
<b>Dismegacariopoyesis</b>	Núcleos dispersos, bilobulados, monolobulados de distintos tamaños, micromegacariocitos.

En la última actualización de las guías españolas para el diagnóstico y tratamiento de los SMD (Sanz *et al.*, 2012), un grupo de expertos propuso unos criterios mínimos para su diagnóstico (**Tabla 2**) según los cuales el diagnóstico de SMD pueden establecerse por la presencia de algunos prerequisites junto con alguno de los criterios definitivos. Estos criterios continúan hoy vigentes y resultan de gran ayuda para su identificación.

**Tabla 2.** Criterios mínimos para el diagnóstico de los SMD.

<b>A. Prerequisites</b>	Citopenia constante en una o más de las líneas siguientes: eritroide (Hb <11/dl); neutrofílica (<1.500/ $\mu$ l) o megacariocítica (plaquetas <100.000/ $\mu$ l) con la exclusión de enfermedades hematológicas y no hematológicas como causa de la citopenia/displasia.
<b>B. Criterios decisivos (relacionados con el SMD)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Displasia en al menos el 10% de las células de 1 o más de las líneas mieloides de MO.</li> <li>2. 5-19% de blastos en MO.</li> <li>3. Anomalías cromosómicas típicas por CG o FISH (+8, -7, 5q-, 20q-, otras).</li> </ol>
<b>C. Cuando se cumplen los prerequisites pero no los criterios definitivos y presenta clínica.</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fenotipo atípico en MO con citometría de flujo que indica población monoclonal.</li> <li>2. Datos moleculares de clonalidad: perfil genético, mutaciones puntuales.</li> <li>3. Disminución de formación de colonias en MO y SP.</li> </ol>

MO: médula ósea; SP: sangre periférica; CG: citogenética convencional; FISH: hibridación *in situ* fluorescente; Hb: hemoglobina; SMD: síndrome mielodisplásico.

Fuente: modificado de Valent *et al.*, 2007.

### 1.3.2. Métodos de clasificación

Existen dos métodos de clasificación de los SMD: el sistema clásico franco-americano-británico (FAB) y el sistema establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El sistema FAB (**Tabla 3**) fue propuesto en 1982 (Bennet *et al.*, 1982) y se basa casi exclusivamente en criterios morfológicos mientras que el sistema de la OMS de 2001 (Jaffe *et al.*, 2001) y su actualización de 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008) era una ampliación del FAB que incluía además características clínicas y biológicas. En 2014, un comité clínico compuesto por más de 100 patólogos, hematólogos, oncólogos y genetistas de todo el mundo se reunió para proponer una nueva revisión de la clasificación de la OMS. Esta nueva clasificación, publicada en 2016 (Arber *et al.*, 2016), siguió la misma filosofía de anteriores ediciones en incorporar características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas y de genética molecular para definir las entidades hematológicas. De ésta manera en el área de los SMD fueron siete las entidades recogidas (**Tabla 4**).

**Tabla 3.** Clasificación de los SMD según la FAB.

Subtipo	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Monocitos SP	Sideroblastos anillo MO (%)
AR	<1	<5	<1x10 <sup>9</sup> /L	<15
ARSA	<1	<5 No bastones de Auer	<1x10 <sup>9</sup> /L	>15
AREB	<5	5-20 No bastones de Auer	<1x10 <sup>9</sup> /L	Indiferente
AREB-T	≥5	21-30 Pueden o no observarse bastones de Auer	Indiferente	Indiferente
LMMC	<5	0-20	>1x10 <sup>9</sup> /L	Indiferente

AR: anemia refractaria; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; AREB-T: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación; LMMC: leucemia mielomonocítica crónica; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

Fuente: modificado de Bennett *et al.*, 1982.

Tabla 4. Clasificación de los SMD según la OMS 2016.

Subtipo		Displasia	Citopenias <sup>1</sup>	Sideroblastos anillo MO (%)	Blastos MO y SP (%)	Citogenética
SMD-DU		1	1-2	<15% / <5% <sup>2</sup>	MO <5%, SP <1%	Cualquiera, exc. SMD con del(5q) aislada
SMD-DM		2-3	1-3	<15% / <5% <sup>2</sup>	MO <5%, SP <1%	Cualquiera, exc. SMD con del(5q) aislada
SMD-SA	SMD-SA-DU	1	1-2	≥15% / ≥5% <sup>2</sup>	MO <5 %, SP <1%	Cualquiera, exc. SMD con del(5q) aislada
	SMD-SA-DM	2-3	1-3	≥15% / ≥5% <sup>2</sup>	MO <5%, SP <1%	Cualquiera, exc. SMD con del(5q) aislada
SMD-EB	SMD-EB-1	0-3	1-3	Indiferente	MO 5-9 %, SP 2-4%	Indiferente
	SMD-EB-2	0-3	1-3	Indiferente	MO 10-19 %, SP 5-19%	Indiferente
SMD con del(5q) aislada		1-3	1-2	Indiferente	MO <5%, SP ≤1%	del (5q) solo o con 1 anomalía adicional exc. -7/del(7q)
SMD inclasificable		0-3	1-3	<15%	MO <5%, SP <1%	Indiferente, exc. alteración definitoria de SMD
Citopenia refractaria de la infancia		1-3	1-3	Indiferente	MO <5%, SP <2%	Indiferente

SMD: síndrome mielodisplásico; DU: displasia unilínea; DM: displasia multilínea; SA: sideroblastos en anillo; EB: exceso de blastos; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; exc. : exceptuando.

<sup>1</sup>Citopenias definidas como hemoglobina <10 g/dL, recuento de plaquetas <100 x 10<sup>9</sup>/L y recuento absoluto de neutrófilos <1.8 x 10<sup>9</sup>/L; raramente, los SMD pueden presentarse con anemia o trombocitopenia por encima de estos niveles. Los monocitos en SP deben ser <1 x 10<sup>9</sup>/L.

<sup>2</sup>Gen *SF3B1* mutado.

### 1.3.3. Estimación del pronóstico

Como corresponde a un grupo heterogéneo de enfermedades, los SMD presentan gran variabilidad en el pronóstico, tanto en términos de supervivencia global (SG) como de riesgo de transformación a LMA (t-LMA). Ello, unido a la edad avanzada de la mayoría de los pacientes, a la presencia frecuente de comorbilidades significativas y a la elevada morbimortalidad de las alternativas terapéuticas con potencial curativo, dificulta notablemente la selección del tratamiento en un paciente concreto (Sanz *et al.*, 2012b). Así, establecer de forma precisa e individualizada el pronóstico de un paciente es esencial para adaptar la modalidad de tratamiento a emplear al riesgo estimado. Desde su publicación en 1997, el IPSS (*International Prognostic Scoring System*) ha sido empleado universalmente en la práctica clínica diaria con el fin de estimar el pronóstico de los SMD (Greenberg *et al.*, 1997).

El IPSS tomó como punto de partida dos índices pronósticos publicados previamente (Sanz *et al.*, 1989; Morel *et al.*, 1993) y una serie de 816 pacientes con SMD *de novo*, no tratados y diagnosticados en centros con reconocida experiencia en SMD. Como ya se había evidenciado en estudios previos, las tres variables que demostraron presentar un peso pronóstico independiente tanto para SG como para t-LMA fueron la proporción de blastos en MO, la presencia de determinadas alteraciones citogenéticas y el número de citopenias. Así el IPSS es capaz de estratificar los pacientes en 4 grupos de riesgo con diferencias estadísticamente significativas en SG y tasa de progresión a LMA: bajo riesgo (puntuación: 0; mediana de SG: 5,7 años), intermedio-1 (puntuación: 0,5-1; mediana de SG: 3,5 años), intermedio-2 (puntuación: 1,5-2; mediana de SG: 1,1 años) y alto riesgo (puntuación: 2,5-3,5; mediana de SG: 0,4 años).

El IPSS ha sido un estándar importante para evaluar el pronóstico de pacientes adultos con SMD primarios. Sin embargo desde su publicación, se sugirió la modificación de los parámetros existentes y la adición de nuevos factores pronósticos adicionales cuya inclusión proporcionaba diferencias significativas en el resultado clínico de los pacientes. El IPSS-R (*Revised International Prognostic Scoring System*; Greenberg *et al.*, 2012) siguió basándose en las variables ya presentes en el IPSS e incorporó otras nuevas como los niveles de hemoglobina y plaquetas, siendo el resultado final la estratificación de los pacientes en 5 grupos de riesgo con claras diferencias en SG y riesgo de t-LMA: muy bajo (puntuación: 0-1,5; mediana de SG: 8,8 años), bajo (puntuación: >1,5-3; mediana de SG: 5,3 años), intermedio (puntuación: >3-4,5; mediana de SG: 3 años), alto (puntuación: 4,5-6; mediana de SG: 1,6 años) y

muy alto (puntuación: >6; mediana de SG: 0,8 años) (**Tabla 5**). Además, el IPSS-R reconocía el papel de la edad en la SG así como su ausencia de influencia en la t-LMA.

**Tabla 5.** Índice Pronóstico Internacional Revisado (IPSS-R).

Variables pronósticas	0 puntos	0,5 puntos	1 punto	1,5 puntos	2 Puntos	3 puntos	4 puntos
<b>Riesgo citogenético*</b>	Muy bueno		Bueno		Intermedio	Pobre	Muy pobre
<b>Blastos MO (%)</b>	≤2		>2-<5		5-10	>10	
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	≥10		8-9,9	<8			
<b>Plaquetas (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	≥100	50-99	<50				
<b>PMN (<math>\times 10^9/L</math>)</b>	≥0,8	<0,8					

\* Riesgo citogenético:  
 - Muy bueno: -Y, del(11q) aisladas.  
 - Bueno: Normal, del(5q), del(12p) y del(20q) aisladas y anomalías dobles que incluyen del(5q).  
 - Intermedio: del(7q), +8, +19, i(17q) aislada y cualquier otra anomalía única o doble independiente.  
 - Pobre: -7, inv(3)/t(3q)/del(3q) aisladas, anomalías dobles que incluyen -7/del(7q) y 3 anomalías  
 - Muy pobre: > 3 anomalías.

MO: médula ósea; PMN: polimorfonucleares.

Fuente: modificado de Greenberg *et al.*, 2012.

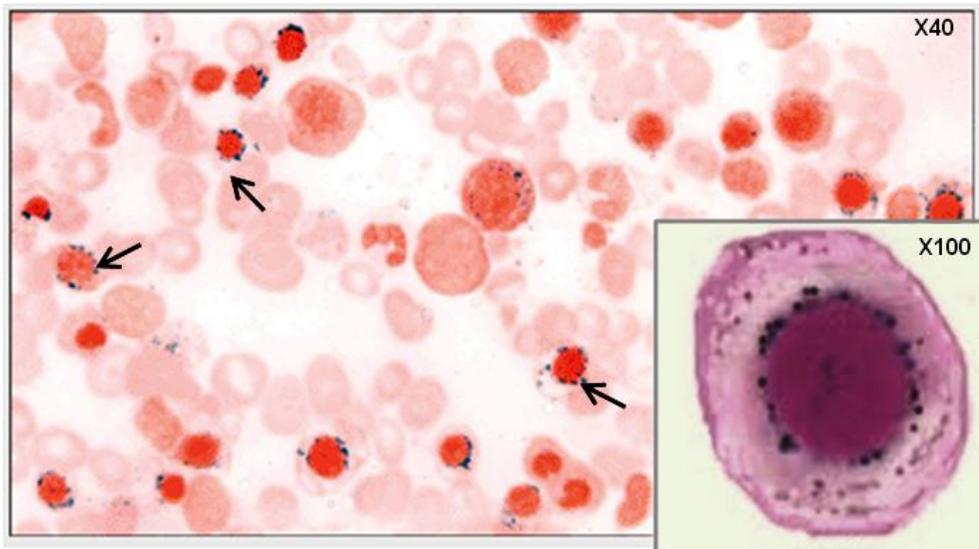
## 1.4. Síndromes mielodisplásicos con sideroblastos en anillo

### 1.4.1. Descripción, patogenia y opciones terapéuticas

Los síndromes mielodisplásicos con sideroblastos en anillo (SMD-SA) constituyen aproximadamente el 10-12% de todos los SMD. Son un trastorno hematológico de la serie mieloide que se caracterizan por presentar en SP menos del 1% de células blásticas y monocitosis inferior a  $1 \times 10^9/L$  mientras que en MO, además de mostrar menos del 5% de blastos, se encuentra su rasgo morfológico definitorio, la presencia de sideroblastos en anillo (SA) en porcentaje igual o superior al 5%.

Los SA son eritroblastos donde el hierro, en lugar de estar situado en el citoplasma como ferritina, se acumula en el interior de las mitocondrias como micelas ferruginosas que pueden ser vistas como anillos alrededor del núcleo. Estos depósitos anormales de hierro tienen su origen en un defecto de la cadena respiratoria

mitocondrial que provoca una menor reducción del hierro férrico a ferroso (Cazzola *et al.*, 2013a). La tinción de Perls o la tinción de Perls argéntica sobre aspirado medular son los métodos ideales para observarlos (**Figura 3**).



**Figura 3.** Aspecto morfológico de los sideroblastos en anillo a dos aumentos de microscopía.  
A) X40: Frotis de médula ósea en Perls de una anemia sideroblástica donde se observan abundantes sideroblastos en anillo (SA).  
B) X100: tinción de un sideroblasto en anillo en Giemsa con depósitos de hierro en disposición perinuclear.

En los SMD-SA, la morfología eritrocitaria en SP, denota una intensa anisocromía en la que coexisten hematíes normocrómicos, mayoritarios, con otros con insuficiente hemoglobinización que son minoritarios. La cifra de leucocitos y plaquetas, así como sus signos dismórficos son muy variables. Aproximadamente el 10% de los pacientes presentan incluso trombocitosis, leucocitosis y esplenomegalia (Woessner *et al.*, 2006). En este escenario conviene recordar que los pacientes con un recuento plaquetar mayor a  $450 \times 10^9/L$ , anemia,  $\geq 15\%$  SA en MO y megacariocitos con características similares a la mielofibrosis primaria o la trombocitemia esencial son clasificados en la última revisión de la OMS (Arber *et al.*, 2016) como una nueva entidad: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa con sideroblastos en anillo y trombocitosis (SMD/NMP-SA-T).

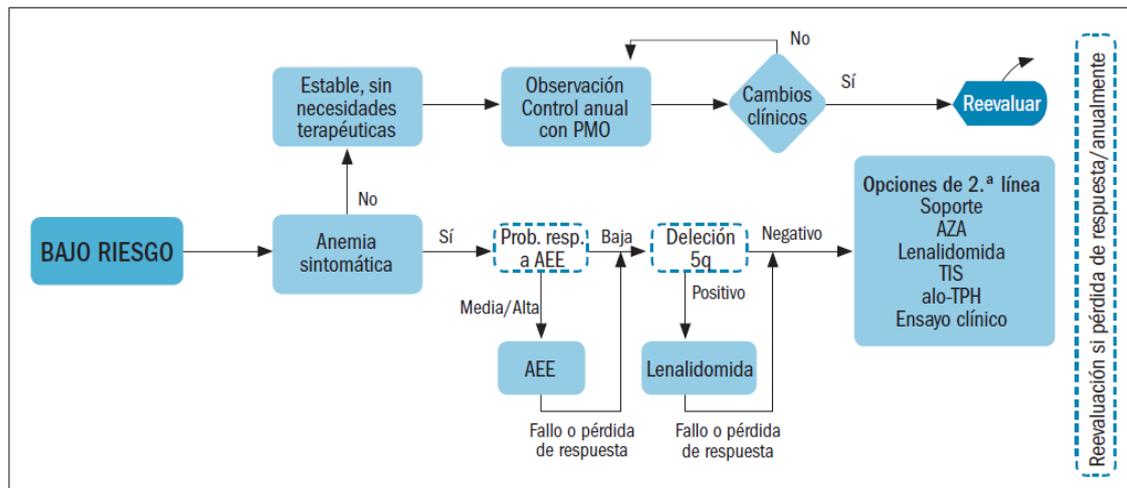
Los pacientes diagnosticados de SMD-SA presentan gran variabilidad en el pronóstico aunque en general se consideran de bajo riesgo: mediana esperada de SG superior a 30 meses y baja probabilidad de t-LMA (Valcárcel *et al.*, 2012).

Habitualmente, el objetivo terapéutico en los SMD de bajo riesgo es mejorar las citopenias y su sintomatología, en especial el síndrome anémico. Por ello, el tratamiento estándar en casos con hemoglobina inferior a 10 g/dl es la administración de eritropoyetina y en caso de fracaso, el soporte transfusional con concentrados de hematíes (CH). Cuatro serían los objetivos del soporte transfusional:

- a) evitar las manifestaciones agudas de hipoxia tisular.
- b) aumentar la reserva funcional para aumentar la calidad de vida.
- c) suprimir en la medida de lo posible la eritropoyesis ineficaz para evitar el estímulo inadecuado en la absorción de hierro.
- d) Reducir la mortalidad de origen cardiaco.

La trombocitopenia únicamente se trata en las formas más graves ( $<20-30 \times 10^9$  plaquetas/L) de forma profiláctica con transfusiones de concentrados de plaquetas pudiéndose recurrir además en caso de manifestaciones hemorrágicas a los agentes trombopoyéticos.

En el caso que los pacientes presenten complicaciones, pérdidas de respuesta o formas más agresivas de la enfermedad se reevaluarán para ver la necesidad de administrarles otras opciones terapéuticas disponibles (**Figura 4**): agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE), lenalidomida, inmunosupresores, agentes hipometilantes como azacitidina (Silverman *et al.*, 2002; García *et al.*, 2010), etc.



**Figura 4.** Algoritmo de tratamiento empleado en los SMD de bajo riesgo.

AEE: agentes estimulantes de eritropoyesis; alo-TPH: trasplante alogénico; AZA: azacitidina; PMO: punción de médula ósea; Prob. Resp.: probabilidad de respuesta; TIS: tratamiento inmunosupresor; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Fuente: Valcárcel *et al.*, 2012.

#### 1.4.2. Alteraciones moleculares

En la SMD-SA, al igual que en otros subtipos de SMD, el evento inicial que condiciona el inicio del trastorno es la ocurrencia de una o más mutaciones *driver* en las células madre hematopoyéticas. Estas mutaciones se presentan típicamente en genes que intervienen en el procesado (*splicing*) del ARN y/o en la metilación del ADN y proveen a las células de ventajas selectivas en la proliferación determinando su expansión clonal local (Cazzola *et al.*, 2013b). Las mutaciones más comunes que ocurren en el desarrollo inicial de la patología son las alteraciones del gen de *splicing SF3B1* (83%) (Yoshida *et al.*, 2011) y las alteraciones de genes reguladores epigenéticos como *TET2* (22%) y *DNMT3A* (6%) (Malcovati *et al.*, 2014). Las mutaciones de *TET2* y *DNMT3A* se presentan normalmente en pacientes *SF3B1* mutados y se ha demostrado una co-ocurrencia significativa entre *SF3B1* y *DNMT3A* que sugiere una sinergia mutacional entre ambas lesiones moleculares (Bejar *et al.*, 2012).

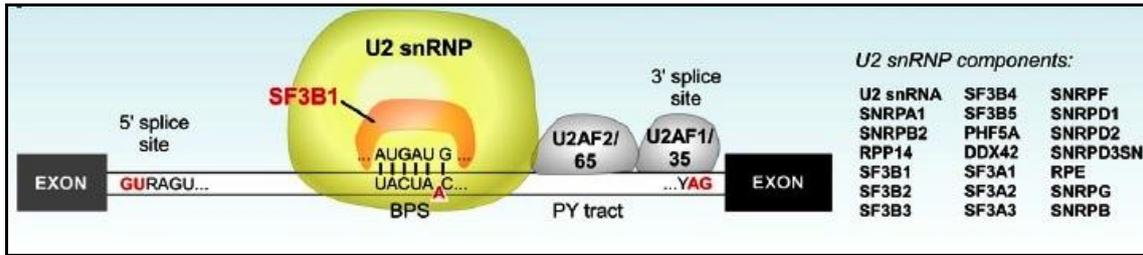
Las alteraciones en otros genes reguladores epigenéticos (*IDH1*, *IDH2*) o del espliceosoma (*SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) están presentes en un menor número de pacientes (0-6%) y suelen ser mutuamente excluyentes entre ellas (Yoshida *et al.*, 2011).

La presencia de estas mutaciones en las células madre hematopoyéticas determina una proliferación sesgada, una maduración defectuosa y en ocasiones un incremento de la apoptosis, lo que provoca la displasia y las citopenias típicas de la enfermedad.

Con el paso del tiempo el clon mutante inicial prolifera de forma gradual, acaba imponiéndose a los mecanismos de control del crecimiento celular e inicia su migración a otras localizaciones de la médula ósea. En estos nuevos emplazamientos va adquiriendo secuencialmente otras mutaciones formándose diversas poblaciones subclonales que presentan un deterioro aún mayor en su capacidad de diferenciación/maduración (Vogelstein *et al.*, 2013). En los SMD-SA estas mutaciones subclonales ocurren aproximadamente en el 13% de los pacientes en genes de modificación de la cromatina (*ASXL1*, *EZH2*), en torno al 10% en genes de regulación de la transcripción (*RUNX1*, *CEBPA*) y en cerca de un 20% en genes de transducción de señales (*JAK2*, *FLT3*, *CBL*) (Gelsi-Boyer *et al.*, 2012; Malcovati & Cazzola, 2013; Haferlach *et al.*, 2014; Malcovati *et al.*, 2014). El efecto final de la progresiva carga mutacional es el incremento de células blásticas que en último término puede desembocar en el desarrollo de una LMA (Cazzola *et al.*, 2013b).

#### **1.4.3. Gen *SF3B1***

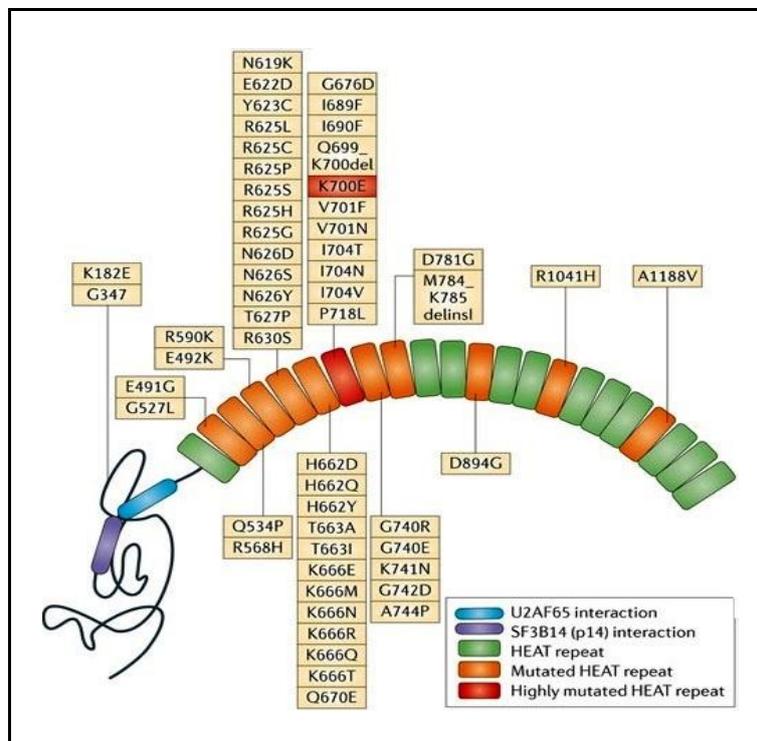
Diversos grupos de investigación encontraron en una alta proporción de pacientes con SMD-SA mutaciones somáticas recurrentes en el gen *SF3B1* (64-87%) (Yoshida *et al.*, 2011; Papaemmanuil *et al.*, 2011; Visconte *et al.*, 2012a; Malcovati *et al.*, 2015). El gen *SF3B1* se encuentra situado en el cromosoma 2 (2q33.1), consta de 25 exones y codifica la subunidad 1 de la partícula SF3B, una proteína que constituye una parte fundamental del espliceosoma, complejo a la vez formado por múltiples ribonucleoproteínas. Esta partícula se une a SF3A y a 12S RNA (*small nuclear ribonucleoprotein particles*) para formar la estructura multiproteica U2snRNP (**Figura 5**) que posee un importante papel en el *splicing* del ARN mensajero (ARNm) (Patnaik *et al.*, 2012a).



**Figura 5.** Componentes de U2snRNP donde se muestra la partícula SF3B1 en interacción directa con el ARNm.

Fuente: Wan *et al.*, 2013

Las mutaciones en el gen *SF3B1* encontradas en pacientes con SMD-SA pueden ocurrir en distintos puntos del gen y se presentan normalmente en heterocigosis (**Figura 6**). La mutación más frecuente se localiza en el codón 700 y supone el cambio de lisina por ácido glutámico (55%; K700E) pero se han descrito otras: codón 666 (11%; ej. K666R), codón 662 (10%; ej. H662Q), codón 622 (7%; ej. E622D), codón 625 (6%; ej. R625L) y otras minoritarias en diversos codones (8%; ej. E592K, A744P, D781G) (Malcovati *et al.*, 2011).

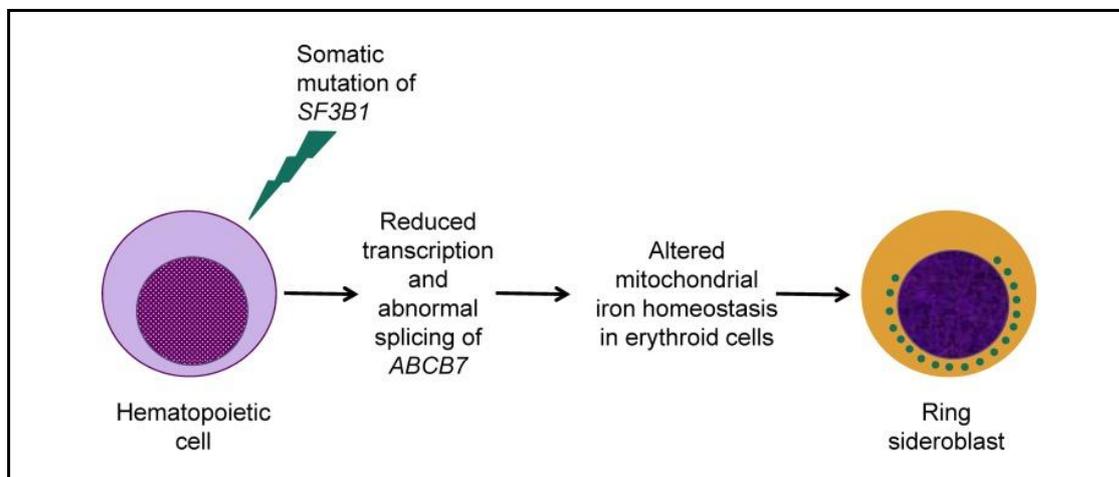


**Figura 6.** Organización en dominios funcionales de la subunidad 1 del factor de *splicing* SF3B. Respecto los SMD-SA, en naranja las mutaciones más comunes y en rojo la más frecuente.

Fuente: Bonnal *et al.*, 2012.

Dada la alta incidencia de mutaciones de *SF3B1* en los pacientes con SMD-SA y a la existencia en ellos de un fenotipo particular, los sideroblastos en anillo (SA), se pensó en la posible relación entre ambas características. Fueron los estudios de Visconte *et al.* (2012b) los que hallaron la primera evidencia experimental de asociación entre ambos fenómenos. Este grupo indujo la formación de SA en células sanas en cultivo mediante un inhibidor farmacológico de SF3B de nombre meayamicin.

Menos clara se presentaba, respecto a los modelos experimentales de laboratorio, la comprensión del mecanismo de formación de SA por haploinsuficiencia de *SF3B1* en pacientes con SMD-SA. Así, parece que existe un efecto directo del factor SF3B1 del espliceosoma sobre la expresión del gen *ABCB7* que codifica una proteína transportadora (*ATP-binding cassette transporter*) que interviene en la regulación homeostática del hierro mitocondrial (**Figura 7**). Como consecuencia, los pacientes con SMD-SA y mutación en el gen *SF3B1* presentarían una reducción de la transcripción y un *splicing* anormal de *ABCB7* que conduciría a la formación de depósitos anormales de hierro en forma de gránulos de hemosiderina alrededor del núcleo celular determinando la transformación del eritroblasto en un sideroblasto en anillo (Nickpour *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Representación del desarrollo de sideroblastos en anillo en los pacientes con SMD. Las mutaciones de *SF3B1* afectarían a la transcripción y al *splicing* del gen *ABCB7*, lo que comprometería la función de transporte del hierro mitocondrial en la proteína expresada. Fuente: Cazzola *et al.*, 2013a.

Las mutaciones de *SF3B1*, producen cambios de aminoácidos (no sinónimas) en la proteína final y como consecuencia alteraciones tanto en su estructura como en

su función. Ello es lo que, en última instancia, provoca variaciones en las interacciones del complejo U2snRNP con el resto de componentes del espliceosoma. En un primer momento se pensó que la existencia de mutaciones en *SF3B1* provocaría un *splicing* alternativo aberrante en distintas proteínas además de *ABCB7* que incrementaría su potencial oncogénico, y por tanto sería esperable un peor pronóstico de los pacientes *SF3B1* mutados (Gabut *et al.*, 2011; Chesnais *et al.*, 2012). Conforme fue creciendo el número de estudios del gen *SF3B1* en los SMD-SA se encontraron resultados contradictorios respecto al efecto de las mutaciones en el pronóstico de los pacientes, aunque con el tiempo se observó que eran más los que relacionaban los pacientes *SF3B1* mutados con una mayor supervivencia y con una menor probabilidad de t-LMA **(Tabla 6)**.

Las mutaciones de *SF3B1* en los SMD-SA ocurren en el progenitor hematológico lo que determina la expansión del clon heterocigoto dominante y su transmisión a la progenie mieloide. En el eritroblasto, tal como se ha visto anteriormente, producirían un *splicing* defectuoso de *ABCB7* que originaría un aumento del hierro mitocondrial en forma de multitud de depósitos de hemosiderina. Estos depósitos “aberrantes” se piensa que serían detectados por la célula, activándose los distintos mecanismos de apoptosis con el fin de paliar la displasia y ayudar al control de su progresión (Cazzola *et al.*, 2013a).

**Tabla 6.** Estudios que analizan la relevancia en el pronóstico de las mutaciones de *SF3B1* en pacientes con SMD.

Estudio	Pacientes	Mutaciones <i>SF3B1</i>	Correlación Clínica
Malcovati <i>et al.</i> (2011)	SMD (n=533)	150/533 (28%) SMD-SA (72%)	Las mutaciones se asociaron significativamente con mayor SG, mayor proporción de SA, mayor recuento plaquetar y menor riesgo de progresión a LMA.
Papaemmanuil <i>et al.</i> (2011)	SMD (n=354)	72/354 (20%) SMD-SA 53/82 (65%)	Las mutaciones se asociaron significativamente con mayor proporción de SA, mayor recuento plaquetar y menor riesgo de progresión a LMA.
Patnaik <i>et al.</i> (2012a)	SMD con SA (n=107)	53/107 (50%) SMD-SA-DU 35/48 (73%) SMD-SA-DM 16/43 (37%)	Las mutaciones se asociaron significativamente con mayor SG y menor riesgo de progresión a LMA.
Makishima <i>et al.</i> (2012)	SMD (n=88) y SMD/MPN (n=66)	SMD-SA 15/20 (75%)	Las mutaciones se asociaron significativamente con mayor SG.
Damm <i>et al.</i> (2012)	SMD y SMD/MPN (n=221)	SMD-SA (75%)	No diferencias significativas en SG entre los pacientes con la mutación y los pacientes sin ella.
Thol <i>et al.</i> (2012)	SMD (n=193)	37/221 (16.4%) SMD-SA 31/41 (84%)	Las mutaciones no representaron un factor pronóstico independiente.
Malcovati <i>et al.</i> (2015)	SMD (n=293)	150/243 (62%) SMD-SA (81%)	Las mutaciones se asociaron significativamente con mayor SG y menor riesgo de progresión a LMA.

SMD: síndromes mielodisplásicos; SA: sideroblastos en anillo; DU: displasia unilínea; DM: displasia multilínea.

Este efecto favorable en términos pronósticos de las mutaciones de *SF3B1* sorprende aún más si se compara con el efecto deletéreo que tienen las mutaciones de otros genes que componen el espliceosoma como *SRSF2*. El gen *SRSF2* codifica también para una proteína del complejo U2snRNA que ayuda a la interacción de los distintos componentes del espliceosoma con el pre-ARNm. En los SMD, las mutaciones de *SRSF2*, se han asociado con otras de mal pronóstico como *RUNX1* e *IDH1* y determinarían en los pacientes una menor supervivencia y un mayor riesgo de progresión a LMA (Thol *et al.*, 2012).

Por otro lado, también resulta sorprendente el efecto deletéreo que tienen las mutaciones de *SF3B1* en otras neoplasias hematológicas como la leucemia linfática crónica (LLC) (Wan *et al.*, 2013). Presentes en la LLC con una frecuencia importante (5-18%) se han asociado a menor supervivencia y a una mayor probabilidad de progresión de la enfermedad a estadios más agresivos. Su patogénesis en la LLC tampoco está del todo clara, aunque la idea más generalizada defiende que las mutaciones de *SF3B1* afectan a la estabilidad genómica y a modificaciones epigenéticas, cooperando con otras mutaciones que surgen más tempranamente (*TP53*, *ATM*, *MYD88*, etc.) en un peor desarrollo de la enfermedad. Lo cierto es que en los SMD-SA, las mutaciones de *SF3B1* se identifican tempranamente a nivel del progenitor mielóide, mientras que en la LLC, es un acontecimiento patogénico tardío que aparece durante la progresión clonal de la enfermedad, pudiendo contribuir al desarrollo de subclones más agresivos (Quesada *et al.*, 2012; Cazzola *et al.*, 2013a).

La caracterización del estado mutacional de *SF3B1* en neoplasias hematológicas ha tomado más valor aún si cabe debido a la demostración en modelos celulares y animales de la actividad antitumoral de ciertos moduladores de la actividad del espliceosoma como spliceostatín, pladienólido y meayamicin. Diversos estudios demuestran que la interacción de éstos moduladores con el factor de *splicing* 3B es crucial en el desarrollo de su actividad citotóxica (Webb *et al.*, 2012). Para estrategias terapéuticas futuras parece muy interesante explorar los efectos de éstos moduladores del factor 3B del *splicing* y analizar si podrían influir en el pronóstico de los pacientes de la misma manera positiva que las mutaciones de *SF3B1*.

### 1.5. Mutaciones genéticas y respuesta a azacitidina

Distintos estudios en los SMD han demostrado que la metilación aberrante del ADN influye en la regulación de distintos oncogenes promoviendo la displasia y la transformación leucémica en los SMD (Jiang *et al.*, 2009; Itzykson & Fenaux, 2014). Los fármacos hipometilantes azacitidina (AZA) y decitabina (DEC) son capaces de revertir estas alteraciones epigenéticas mostrándose como una opción terapéutica de segunda línea en los SMD de bajo riesgo. Son múltiples los estudios que han asociado la respuesta a AZA y DEC con la presencia de mutaciones genéticas (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Estudios más relevantes en pacientes tratados con agentes hipometilantes (HMA).

N	Patología	HMA	Gen	Resp.	SG	Referencia
213	SMD	AZA	TET2	↑	=	Bejar R. <i>Blood</i> , 2014c
			TP53	=	↓	
92	SMD	AZA	DNMT3A	↑	=	Traina F. <i>Leukemia</i> , 2014
			TET2	↑	=	
168	SMD	AZA/DEC	TP53	=	↓	Takahashi K. <i>Oncotarget</i> , 2016
134	SMD	AZA	ASXL1	=	↑	Tobiasson M. <i>Oncotarget</i> , 2016
			EZH2	=	↑	
107	SMD	AZA/DEC	U2AF1	↓	=	Jung S. <i>Oncotarget</i> , 2016
			SETBP1	↓	=	
96	LMA	AZA	TP53	↑	↑	Desoutter J. <i>Leukemia</i> , 2016
			DNMT3A	=	↓	
109	SMD	DEC	TP53	↑	=	Chang C. <i>Br J Haematol</i> , 2017

AZA: azacitidina; DEC: decitabina; Resp.: respuesta; SG: supervivencia global.

Esta heterogeneidad en los resultados obtenidos y la ausencia de reproducibilidad entre las distintas series, ha llevado a pensar que aunque es poco probable la identificación de un biomarcador de respuesta a AZA y/o DEC basado únicamente en las mutaciones genéticas, éstas sí que podrían influir en la respuesta y en la supervivencia de los pacientes tratados, siendo recomendable la realización de un completo estudio mutacional previo al tratamiento.

### 1.6. Secuenciación de última generación en oncohematología

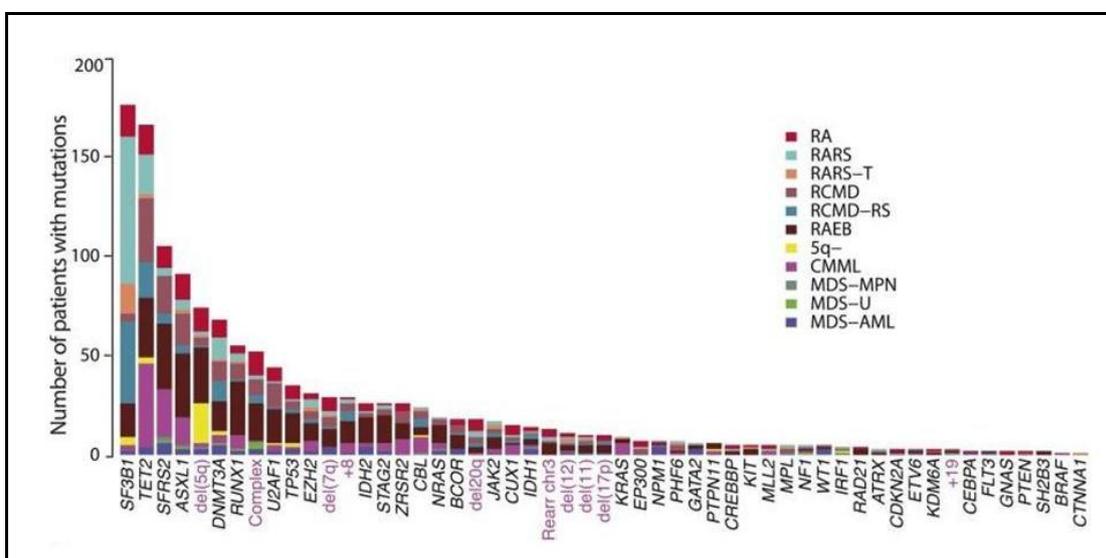
En la última década, la secuenciación del ADN ha revolucionado nuestro entendimiento de la patogénesis de las enfermedades con base genética como los SMD, estableciendo que estas enfermedades surgen tras la adquisición secuencial de mutaciones somáticas en genes implicados en diversas funciones y mecanismos. Esta presencia de mutaciones rige la enfermedad tanto en su inicio, caso de una

hematopoyesis clonal asintomática, como en su evolución a SMD y en su potencial progresión a LMA (Kennedy *et al.*, 2017).

Dos estudios fueron los pioneros en la caracterización molecular de los SMD utilizando plataformas de secuenciación masiva:

1.- Papaemmanuil *et al.*, 2013: secuenciación de 111 genes en 738 pacientes de SMD, LMMC y SMD/NMP (**Figura 8**).

2.- Haferlach *et al.*, 2014: secuenciación de 104 genes en 944 pacientes de SMD.



**Figura 8.** Frecuencia mutacional junto con las alteraciones citogenéticas más frecuentes identificadas en una cohorte de 738 pacientes con SMD.

Fuente: Papaemmanuil *et al.*, 2013.

Ambos estudios sentaron las bases del estudio genómico de los SMD. De hecho los estudios posteriores se han basado en sus hallazgos y en su modo de proceder para analizar el perfil mutacional de los diferentes subgrupos que incluyen los SMD. En el momento actual, se estima que la mayoría de los pacientes con SMD (80-90%) presentan al diagnóstico al menos una mutación en alguno de estos genes. Esta información es relevante ya que los marcadores moleculares pueden contribuir al diagnóstico de los pacientes (Arber *et al.*, 2016), a una mejor caracterización y estratificación de su riesgo (Haferlach *et al.*, 2014) e incluso actuar como biomarcadores de respuesta a determinados tratamientos (Bejar *et al.*, 2014a). Como

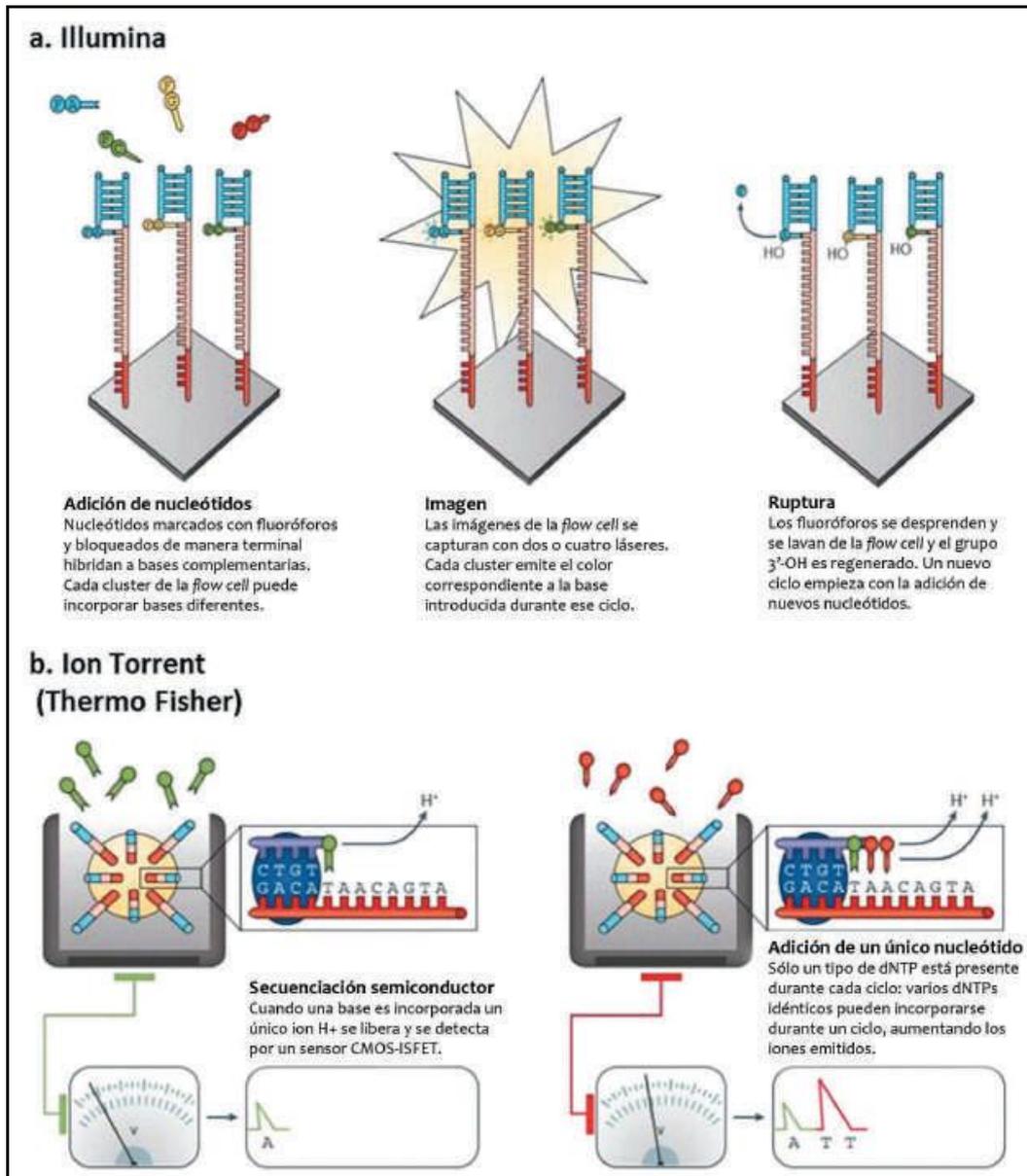
consecuencia de ello, muchos centros han introducido los estudios genómicos mediante secuenciación masiva en su práctica clínica diaria, en un esfuerzo por individualizar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes con SMD.

Existen diversas plataformas para realizar los estudios genómicos en oncohematología, aunque es recomendable la utilización de una u otra según los objetivos: ayuda en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes, caracterización molecular de una serie, descubrimiento de nuevos genes asociados a la enfermedad, etc. En general, podemos clasificar las plataformas de secuenciación en base a la longitud media de lectura (larga o corta); al modo de secuenciación (de extremo único o de ambos extremos); y a la tecnología de secuenciación empleada (secuenciación por ligación, hibridación o síntesis, principalmente). Debido a que la tecnología de secuenciación depende de la plataforma y del sistema elegido, el diseño de la prueba debe basarse en el tipo de alteración específica que se desea detectar. Además, a la hora de decidir en qué secuenciador realizar la caracterización molecular de los pacientes, el laboratorio debe considerar cuidadosamente el tamaño de la región secuenciada, la profundidad de cobertura deseada, el volumen de muestras previsto, los tiempos de proceso requeridos y los costes totales por muestra (Palomo *et al.*, 2017). Dos son las dos grandes plataformas de secuenciación masiva de lectura corta *gold-standard* en los laboratorios de diagnóstico clínico:

- Plataforma ILLUMINA: se basa en la secuenciación por síntesis mediante terminación reversible cíclica, es decir, emplea nucleótidos terminadores de cadena marcados con moléculas fluorescentes, al igual que en la secuenciación de Sanger, aunque difieren de ésta en que tras la obtención de la imagen se elimina el nucleótido fluorescente (**Figura 9a**).

- Plataforma ION TORRENT: se basa en la secuenciación por síntesis mediante adición de un solo tipo de nucleótido y registra los cambios en la concentración de protones producidos durante la incorporación de los nucleótidos (dNTPs) en la síntesis del ADN; esta señal de pH se transforma en digital mediante un chip semiconductor. El cambio de pH es detectado por un sensor micropHmetro; la intensidad de dicha señal es proporcional al número de nucleótidos incorporados (**Figura 9b**).

En la realización de este proyecto donde se requería la secuenciación de un amplio grupo de genes (secuenciación dirigida o *targeted sequencing*) en una amplia cohorte de pacientes, se optó por la plataforma Ion Torrent por reunir las características de robustez, rapidez y alto rendimiento adecuadas.



**Figura 9.** Secuenciación por síntesis con dos tecnologías (Modificada de Goodwin *et al.*, 2016).

**(a) Illumina.** Secuenciación mediante terminación reversible cíclica. Tras el enriquecimiento del ADN molde en fase sólida, la mezcla de cebadores específicos junto con la ADN polimerasa y los nucleótidos modificados se añaden a la *flow cell*.

**(b) Ion Torrent.** Secuenciación mediante adición de un solo tipo de nucleótido. Enriquecimiento del ADN molde basado en bolas (*beads*). A medida que se incorpora cada base, se genera un solo ion H<sup>+</sup> que da lugar a un cambio en el pH, detectado por un semiconductor.

## **2.HIPÓTESIS**



La patogenia de los síndromes mielodisplásicos con sideroblastos en anillo (SMD-SA) implica la adquisición secuencial de varias lesiones moleculares. El conocimiento sobre la patogenia de estas entidades ha mejorado notablemente gracias a la reciente descripción y caracterización de buena parte de estas alteraciones. Sin embargo, su potencial valor diagnóstico, pronóstico o terapéutico y, sobre todo, cuáles de ellas tienen un carácter causal son todavía en gran parte desconocidos. Por todo ello, aumentar el conocimiento de las alteraciones moleculares en paralelo con el comportamiento clínico podría contribuir no sólo a un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en esta enfermedad, sino también a un más apropiado manejo terapéutico.



### **3. OBJETIVOS**



El objetivo principal de este trabajo es evaluar la frecuencia y el valor pronóstico de las mutaciones en 40 genes que han sido relacionados con los SMD en una serie de 122 pacientes con SMD-SA.

Este objetivo general puede desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

1. Describir la serie a estudio a través de la recogida de los datos clínicos y la caracterización de las muestras obtenidas de cada paciente, mediante una combinación apropiada de citomorfología, citogenética convencional, FISH, así como del estudio molecular de 40 genes.
2. Correlacionar por medio de un análisis estadístico las alteraciones génicas con las características clínico-biológicas de los pacientes y con los rasgos distintivos de la enfermedad.
3. Estudiar la relevancia en el pronóstico de las alteraciones moleculares encontradas, y compararla con la obtenida al emplear los índices pronósticos IPSS e IPSS-R.
4. Identificar los pacientes de la serie que recibieron tratamiento con azacitidina para analizar la posible influencia de las alteraciones moleculares y de las variables clínicas en la respuesta al fármaco y a la supervivencia.
5. Establecer el valor de la secuenciación de nueva generación en el diagnóstico y pronóstico de los SMD.



## **4. PACIENTES Y MÉTODOS**



## 4.1. Pacientes

Se realizó un estudio de carácter retrospectivo que incluyó una cohorte de 122 pacientes diagnosticados de SMD-SA entre 1998 y 2015 según el criterio de clasificación de la OMS 2016 (Arber *et al.*, 2016). De los 122 pacientes estudiados, 82 fueron diagnosticados en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, 34 en el Hospital de La Ribera y 6 en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

El criterio limitante para la inclusión en el estudio fue la disponibilidad de ADN en el momento del diagnóstico, obtenido a partir de células de médula ósea extraídas mediante punción esternal o en cresta ilíaca postero-superior. La obtención de las células se realizó de acuerdo con la práctica clínica habitual en el proceso diagnóstico de la enfermedad, para el que se firma un consentimiento asistencial específico y, en ningún caso, supuso una intervención adicional para el paciente. Todas las muestras fueron proporcionadas por el Biobanco del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y cumplieron los requisitos de la legislación vigente (Ley 14/2007, de 3 de julio de Investigación Biomédica). La información clínica al momento del diagnóstico de todos los casos fue obtenida del Registro Español de Síndromes Mielodisplásicos (RESMD).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado en concordancia con las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales.

## 4.2. Estudio citogenético

El análisis citogenético convencional consistió en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células leucémicas obtenidas tras el cultivo *in vitro*.

### 4.2.1. Cultivo

A partir de muestras de aspirado de médula ósea se practicaron cultivos de 24 horas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos (100 U/ml Penicilina y 100 µg/ml Estreptomina). Los cultivos se

prepararon en cámara de flujo laminar y posteriormente se incubaron a 37°C durante toda la noche en un incubador con 5% de presión de CO<sub>2</sub> y una humedad del 90%.

#### **4.2.2. Sacrificio del cultivo**

Para impedir la formación del huso acromático y que, por tanto, los cromosomas se dirijan a los polos de la célula, se añadieron 100 µL de colchicina al día siguiente, dejándolo actuar 30 minutos a 37°C. Para la captación de los cromosomas en metafase se transfirió el cultivo a un tubo cónico y se centrifugó durante 5 minutos a 1.500 rpm, decantándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento posteriormente. Se añadieron 10 mL de CLK (atemperado a 37°C) y se incubó durante 30 minutos a 37°C para permitir su entrada en las células y que éstas aumentaran de volumen. Posteriormente, se vertió gota a gota el fijador Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) completando hasta 5 mL, se centrifugó, decantó y resuspendió el botón celular. La fijación con solución de Carnoy se repitió hasta tres veces para la obtención de un botón celular limpio.

#### **4.2.3. Preparación de extensiones**

Para la elaboración de las preparaciones se vertió una gota de suspensión celular sobre un portaobjetos desengrasado previamente en metanol frío. La extensión se secó al aire y en llama. Los portaobjetos con metafases aptas se dejaron envejecer toda la noche en horno a 60°C.

#### **4.2.4. Tinción de bandas G**

Los cromosomas se identificaron mediante el método de bandas G con tripsina-Giemsa (Seabright *et al.*, 1971). Las extensiones se sometieron a una digestión enzimática con tripsina y se tiñeron con una solución de Giemsa (47,5 mL fosfato monopotásico + 47,5 mL fosfato bisódico + 5 mL de Giemsa) durante 5 minutos. Por último se lavaron y se dejaron secar toda la noche.

#### **4.2.5. Análisis del cariotipo**

Para la aceptación de un cariotipo se analizaron al menos 20 metafases por muestra. Las metafases fueron analizadas usando el programa Ikaros (Metasystems

Inc., Alemania). Las anomalías cromosómicas fueron descritas de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica (ISCN) (Shaffer *et al.*, 2013).

### 4.3. Estudio de las alteraciones moleculares

A partir del material genético de cada paciente se estudiaron mediante un panel de secuenciación de última generación (*next generation sequencing*, NGS) sus alteraciones moleculares, analizándose posteriormente de manera individual con el fin de determinar su potencial patogenicidad.

#### 4.3.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial QIAAmp® DNA Mini kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN se determinó mediante espectrofotometría (Nanodrop), medida como absorbancia a una longitud de onda entre 260 nm y 280 nm, determina pureza de la extracción, y entre 260 nm y 230 nm, detecta restos de compuestos orgánicos. También se comprobó la integridad del ADN mediante la migración en gel de agarosa al 1%, tinción en GelRed (Biotium) y observación del nivel de degradación.

Se seleccionaron las muestras no degradadas, con concentraciones superiores a 25 ng/ $\mu$ L y que presentaran ratios Abs260/280 de alrededor de 1,8 y Abs260/280 en torno 1,5-2,2. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

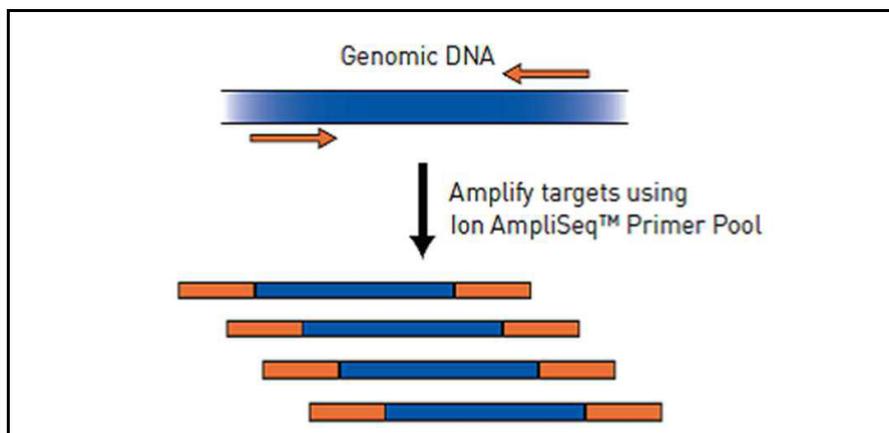
#### 4.3.2. Caracterización molecular de los pacientes

Estudio de las alteraciones moleculares encontradas en cada paciente de la serie mediante un panel NGS.

##### 4.3.2.1 Diseño de cebadores del panel NGS

Se diseñó con tecnología *Ion AmpliSeq™* (Thermo Fisher;

**Tabla 8)** un panel de secuenciación NGS personalizado, con 39 genes cuyas mutaciones se presentaban por la bibliografía asociadas al diagnóstico y/o pronóstico de los SMD (**Figura 10**). El panel constaba de 659 amplicones y permitía una tasa de detección del 98% para una variante al 5% de frecuencia alélica y una cobertura de secuenciación entre 1000X y 5000X. Los cebadores se diseñaron para generar amplicones con una longitud promedio de 200 pares de bases (pb), proporcionando una cobertura mínima del 90% de la secuencia. Estos cebadores se sintetizaron y se agruparon en 2 reacciones multiplex basadas en la compatibilidad de las 2 PCR, minimizando la probabilidad de interacciones cebador-cebador.



**Figura 10.** Los paneles NGS de amplicones se basan en la amplificación por PCR de las regiones de interés mediante la unión de cebadores específicos.

Tabla 8. Genes incluidos en el panel.

Gen	Id. Gen Ensembl	Id. transcrito	Exones
<i>ASXL1</i>	ENSG00000171456	NM_015338.5	8-11
<i>BCOR</i>	ENSG00000183337	NM_001123385.1	Todos
<i>BRAF</i>	ENSG00000157764	NM_004333.4	Todos
<i>CBL</i>	ENSG00000110395	NM_005188.3	8,9
<i>CDKN2A</i>	ENSG00000147889	NM_000077.4	Todos
<i>CEBPA</i>	ENSG00000245848	NM_004364.4	Todos
<i>DNMT3A</i>	ENSG00000119772	NM_022552.4	Todos
<i>ETV6</i>	ENSG00000139083	NM_001987.4	Todos
<i>EZH2</i>	ENSG00000106462	NM_004456.4	Todos
<i>FLT3</i>	ENSG00000122025	NM_004119.2	13-15, 20
<i>GNAS</i>	ENSG00000087460	NM_080425.2	Todos
<i>IDH1</i>	ENSG00000138413	NM_005896.3	3,4
<i>IDH2</i>	ENSG00000182054	NM_002168.2	4
<i>JAK2</i>	ENSG00000096968	NM_004972.3	11-15
<i>KIT</i>	ENSG00000157404	NM_000222.2	2, 8-12, 17
<i>KRAS</i>	ENSG00000133703	NM_033360.3	2-4
<i>LUC7L2</i>	ENSG00000146963	NM_001244585.1	Todos
<i>MPL</i>	ENSG00000117400	NM_005373	10
<i>NF1</i>	ENSG00000196712	NM_001042492.2	Todos
<i>NPM1</i>	ENSG00000181163	NM_002520.6	10
<i>NRAS</i>	ENSG00000213281	NM_002524.4	1-4
<i>PHF6</i>	ENSG00000156531	NM_032458.2	Todos
<i>PTPN11</i>	ENSG00000179295	NM_002834.3	Todos
<i>RAD21</i>	ENSG00000164754	NM_006265.2	Todos
<i>RPS14</i>	ENSG00000164587	NM_001025070.1	2-5
<i>RUNX1</i>	ENSG00000159216	NM_001754.4	Todos
<i>SETBP1</i>	ENSG00000152217	NM_015559.2	4
<i>SF1</i>	ENSG00000168066	NM_001178030.1	Todos
<i>SF3A1</i>	ENSG00000099995	NM_005877.4	Todos
<i>SF3B1</i>	ENSG00000115524	NM_012433.2	10-16
<i>SMC3</i>	ENSG00000108055	NM_005445.3	Todos
<i>SPARC</i>	ENSG00000113140	NM_003118.3	Todos
<i>SRSF2</i>	ENSG00000161547	NM_003016.4	1
<i>STAG2</i>	ENSG00000101972	NM_001042749.2	Todos
<i>TET2</i>	ENSG00000168769	NM_001127208.2	Todos
<i>TP53</i>	ENSG00000141510	NM_001276760.1	3-11
<i>U2AF1</i>	ENSG00000160201	NM_006758	1-6
<i>WT1</i>	ENSG00000184937	NM_024426.4	6-10
<i>ZRSR2</i>	ENSG00000169249	NM_005089.3	Todos

#### 4.3.2.2 Elaboración de librerías y secuenciación NGS

Definimos las “librerías” como los fragmentos de interés del ADN de una muestra a secuenciar, que en sus extremos contienen índices y adaptadores, los cuales identifican inequívocamente las muestras. Para la preparación de las librerías, se amplificaron 10 ng de ADN de cada muestra utilizando el panel de cebadores diseñado y la mezcla para PCR *AmpliSeq HiFi* (Thermo Fisher) en un termociclador *Veriti® Thermal Cycler* con 17 ciclos de amplificación. Se obtuvieron 2 grupos de amplicones por muestra y posteriormente se sometieron los extremos de los cebadores a una digestión parcial con la enzima *FuPa* (Thermo Fisher). Se agruparon los amplicones y se ligaron luego con adaptadores universales e identificadores (*Ion Xpress Barcodes™*) diferentes para cada muestra. Después de una primera purificación con *Agencourt® AMPure® XP Kit* (Beckman Coulter), las librerías se amplificaron con *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity y Library Amplification Primer Mix* (Thermo Fisher). Después de una segunda purificación con *Agencourt® AMPure® XP Kit* (Beckman Coulter), las librerías se cuantificaron utilizando un fluorómetro *Qubit® 2.0* con el kit *Qubit® dsDNA HS* y luego se normalizaron a 100 pmol/l. Las librerías normalizadas se agruparon en igual proporción para realizar una PCR en emulsión (ePCR) en un sistema *Ion OneTouch*. La función de esta PCR en emulsión era realizar en “perlas” individuales una micro-PCR de cada amplicón lo que permitía su amplificación de forma específica y homogénea. Luego, los amplicones finales obtenidos de cada muestra se cargaron en un chip *Ion V3* y se secuenciaron en el equipo *Ion Proton* (**Figura 11**). Los análisis se ejecutaron con los software *Torrent Suite* e *Ion Reporter* (Thermo Fisher) que proporcionaron las lecturas de secuencia así como las variantes obtenidas de cada muestra en archivos exportables con formatos BAM, VCF y Excel.



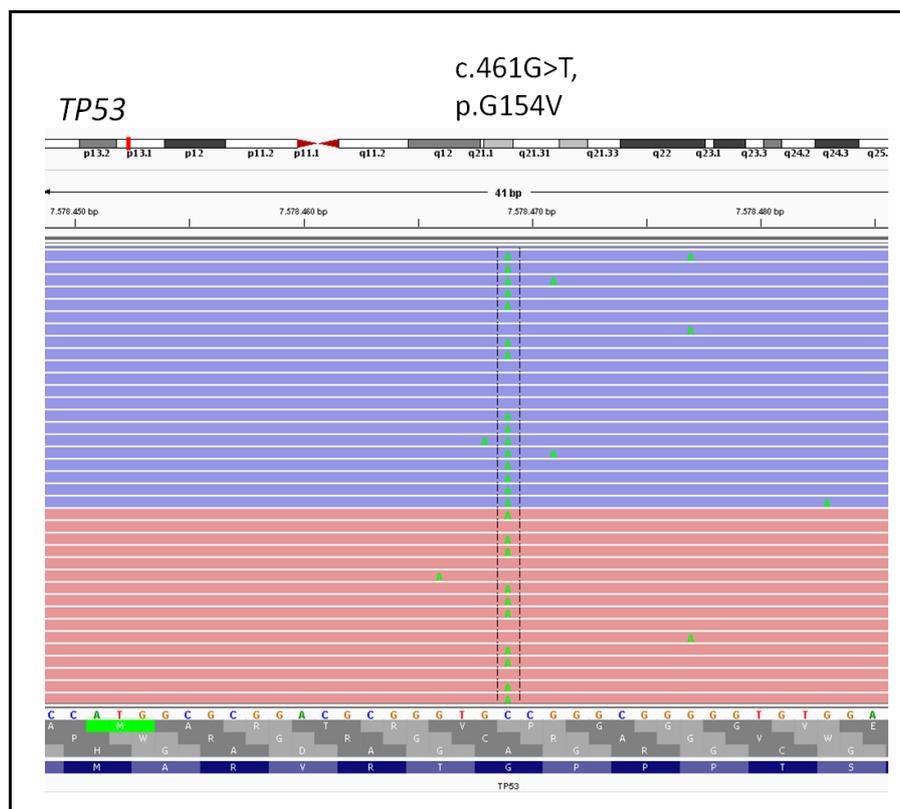
**Figura 11.** Esquema del proceso de preparación de las librerías y su secuenciación.

### 4.3.2.3 Secuenciación del gen *CALR*

El gen *CALR*, no incluido en el panel NGS original por la dificultad de diseñar cebadores adecuados para detectar las variantes de naturaleza *indel* descritas, fue analizado mediante secuenciación Sanger según metodología descrita previamente (Klampfl *et al.*, 2013).

### 4.3.2.4 Análisis de variantes

Todas las variantes listadas se revisaron visualmente con el software *Integrative Genomics Viewer* (IGV; Broad Institute; **Figura 12**). La revisión de variantes en el IGV (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013) permitió descartar del análisis los falsos positivos que resultaron de artefactos en la secuenciación, de errores en algunas regiones de homopolímeros así como a artefactos minoritarios asociados a *strand-bias*, es decir, variantes sólo presentes en una de las direcciones de lectura (directa o reversa).



**Figura 12.** Imagen del software IGV que muestra la detección de una variante en el gen *TP53*. Se observa que la variante (C>A) está presente en las dos direcciones de lectura: directa (rojo) y reversa (azul).

Se eliminaron también del análisis los polimorfismos (*single nucleotide polymorphism*, SNP), es decir, aquellas variantes con una frecuencia poblacional mayor del 1%. Se recomienda no categorizar estas variables, pues resulta difícil su interpretación y en base al conocimiento actual, no presentan utilidad clínica. Algunas de las bases de datos utilizadas para realizar esta tarea fueron: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) y ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>).

Una vez seleccionadas las variantes a analizar, la literatura (PubMed; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y las bases de datos *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), *Leiden Open Variation Database* (LOVD; [www.lovd.nl](http://www.lovd.nl)) y *Human Gene Mutation Database* (HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) se emplearon para explorar su impacto. La patogenicidad potencial de las mutaciones *de novo* se evaluó utilizando los algoritmos *in silico* SIFT (<http://provean.jcvi.org>), *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) y *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org>) (Grimm *et al.*, 2015). Para variantes localizadas en sitios de *splicing*, se utilizaron los algoritmos *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF3>), *NNSplice* ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) y *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org>) para predecir su potencial patogenicidad (Jian *et al.*, 2014). Finalmente, las herramientas del *cBioPortal* (<https://www.cbioportal.org>) (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013) se aplicaron para construir el mapa mutacional del gen *DNMT3A* así como la estructura 3D de su proteína.

#### 4.4. Definiciones

- Amplicón: segmento de ADN o ARN que resulta de la amplificación (producción de múltiples copias) de una secuencia de interés.
- Riesgo de transformación a leucemia mieloide aguda (t-LMA): Representa la probabilidad que la enfermedad progrese en un momento determinado a LMA. Se calcula desde la fecha de diagnóstico del SMD-SA hasta la fecha de transformación de la patología en LMA.
- *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP): variante que difiere en un nucleótido respecto al genoma de referencia (SNV) y que está presente en  $\geq 1\%$  de la población (polimorfismo).
- *Splicing*: proceso co-transcripcional conocido como “corte y empalme”. Es el proceso mediante el cual se eliminan los intrones de la molécula de ARNm, dejando solo los

exones para formar una cadena de ARNm maduro que, posteriormente, se transportará al citoplasma para su traducción.

- Supervivencia global (SG): Hace referencia a la probabilidad de estar vivo en un determinado momento. Se calcula desde la fecha de diagnóstico de la enfermedad hasta la fecha de la última visita o la muerte del paciente, sea ésta por la causa que sea y con independencia del estado de la enfermedad.
- *Variant allele frequency (VAF)*: frecuencia alélica de una variante. En secuenciación, hace referencia a la proporción de lecturas de la región de interés que contienen la secuencia alternativa (variante) respecto de las lecturas que contienen la secuencia de referencia.
- Variante *missense*: tipo de variante donde el cambio de un solo nucleótido resulta en el cambio de un codón que produce un aminoácido diferente.
- Variante *nonsense*: tipo de variante en un solo nucleótido que resulta en un codón de *stop* prematuro o en un codón que después de la traducción genera una proteína no funcional.
- Variante *frameshift*: tipo de variante que genera un desplazamiento o cambio en el marco de lectura. Ocurre por una inserción o deleción de un número de nucleótidos que no es múltiplo de tres en una secuencia de ADN.

#### 4.5. Respuesta a azacitidina

Conforme al criterio del *International Working Group (IWG)* 2006 de los SMD se consideró que los pacientes respondieron positivamente a la AZA cuando presentaron remisión completa de la enfermedad, remisión completa en médula ósea, remisión parcial o bien estabilización de la enfermedad con mejoría hematológica (Cheson *et al.*, 2010). En los supuestos distintos a los anteriores se consideró que el paciente no mostró respuesta positiva al tratamiento.

#### 4.6. Análisis estadístico

Para caracterizar de forma general la serie de pacientes estudiados se realizó un análisis descriptivo que incluyó un estudio de frecuencias de las distintas variables, el análisis de las diferencias y la definición, en el caso de variables cuantitativas continuas, de su distribución según la normalidad. En el caso de variables continuas

se analizaron las diferencias entre grupos mediante la  $t$  de Student para variables con una distribución normal o la U de Mann-Whitney para las variables que no seguían dicha distribución. La comparación entre variables categóricas se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado.

La estimación de la SG y t-LMA se realizó mediante el método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1989). Las diferencias en dichas estimaciones de acuerdo a las distintas variables de agrupación se calcularon con el test de *log-rank* (Mantel, 1966).

Los análisis de supervivencia y t-LMA se completaron con dos análisis multivariantes independientes mediante el modelo de regresión de Cox (Cox, 1972). Todas las variables con un valor de  $P$  inferior a 0,1 en el análisis univariante fueron trasladadas al análisis multivariante, junto con aquellas que sin tener dicho valor de  $P$  habían sido descritas previamente como potenciales variables de valor pronóstico en los SMD. Las variables en las que el número de casos perdidos era mayor al 10% fueron excluidas del estudio multivariante.

En todos los casos el nivel de significación estadística se estableció con un valor de  $P$  inferior a 0,05. Todos los estudios estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS en su versión 20.0.

## **5.RESULTADOS**

### 5.1. Características de los pacientes

Se analizaron 122 pacientes diagnosticados de SMD-SA según la OMS 2016. De todos ellos, 80 pacientes (66%) habían sido diagnosticados por morfología de SMD-SA con displasia unilínea (SMD-SA-DU) y 42 pacientes (34%) correspondían a SMD-SA con displasia multilínea (SMD-SA-DM). La mediana de edad fue de 75 años (extremos: 31 - 90 años), siendo el 89% de los pacientes mayores de 60 años. Sesenta y ocho pacientes (56%) eran hombres y 54 (44%) mujeres. La mayor parte de los pacientes presentaron un IPSS (86%) y un IPSS-R (93%) con riesgo bajo. Las principales características clínicas y biológicas de los pacientes incluidos en el estudio se detallan en la **Tabla 9**.

El cariotipo fue normal en 102 pacientes (84%), mientras que 20 pacientes (16%) mostraron anomalías cromosómicas clonales. De acuerdo a la categorización de riesgo citogenético del IPSS-R, 7 pacientes (6%) mostraron un cariotipo de muy buen pronóstico [del(11q), n=1; -Y, n=6], 105 pacientes (86%) mostraron un cariotipo de buen pronóstico [normal, n=102; del(20q), n=3], 8 pacientes (6%) de pronóstico intermedio [+8, n=2; +19, n=1; +21, n=1; del(1q), n=1; del(4q), n=1; del(6q), n=1; del(13q), n=1], y finalmente 2 pacientes (2%) de pronóstico muy pobre (cariotipo complejo).

Veintiséis pacientes (21%) recibieron agentes estimulantes de la eritropoyesis (AEE), 46 pacientes (38%) AEE y transfusiones de hematíes mientras que 28 pacientes (23%) sólo recibieron transfusiones de hematíes. Dieciocho pacientes (15%) sin o pérdida de respuesta a los AEE recibieron azacitidina (n=17) o lenalidomida (n=1). La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 35 meses (IC 95%, 6 a 204 meses). Cinco pacientes de la serie (4%) progresaron a LMA.

**Tabla 9.** Características principales de la serie global de pacientes con SMD-SA.

Características	Serie global (%)	SMD-SA-DU (%)	SMD-SA-DM (%)
<b>Nº pacientes (SMD-SA)</b>	122 (100)	80 (66)	42 (34)
<b>Edad, años (rango)</b>	75 (31 - 90)	74 (31 - 87)	76 (47 - 90)
≥60	108 (89)	72 (90)	36 (86)
<60	14 (11)	8 (10)	6 (14)
<b>Sexo</b>			
Hombre	68 (56)	42 (53)	26 (62)
Mujer	54 (44)	38 (47)	16 (38)
<b>Leucocitos (<math>\times 10^9/L</math>)</b>			
Mediana	6	6	5
Rango	2 - 16	2 - 14	2 - 16
<b>PMN (<math>\times 10^9/L</math>)</b>			
Mediana	58	58	57
Rango	14 - 82	14 - 79	20 - 82
<b>Linfocitos (<math>\times 10^9/L</math>)</b>			
Mediana	30	30	29
Rango	13 - 63	13 - 63	17 - 63
<b>Plaquetas (<math>\times 10^9/L</math>)</b>			
Mediana	253	262	236
Rango	18 - 486	35 - 486	18 - 468
<b>Sideroblastos anillo MO</b>			
Mediana	40	39	40
Rango	15 - 95	15 - 81	16 - 95
<b>Blastos MO</b>			
Mediana	1	1	2
Rango	0 - 4	0 - 4	0 - 4

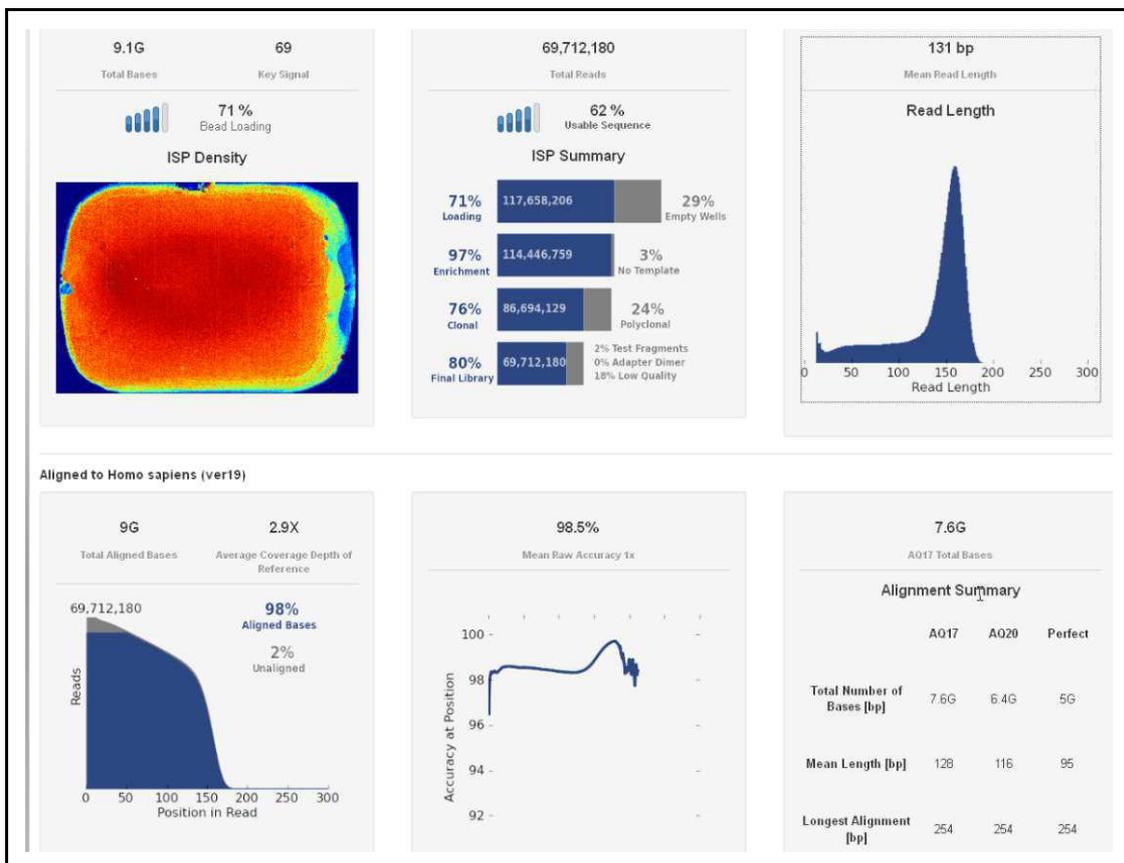
## Resultados

<b>Ferritina</b>			
Mediana	432	399	482
Rango	18 - 4819	18 - 4819	83 - 4734
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>			
Mediana	9,9	9,8	10,1
Rango	4,8 - 13,8	4,8 - 12,7	5,9 - 13,8
<b>Cariotipo</b>			
Normal	102 (84)	67 (84)	35 (83)
Con anomalías	20 (16)	13 (16)	7 (17)
<b>Dependencia transfusional</b>			
Dependiente	74 (61)	46 (58)	28 (67)
No dependiente	48 (39)	34 (42)	14 (33)
<b>Eritropoyetina</b>			
Administrada	72 (59)	46 (58)	26 (62)
No administrada	50 (41)	34 (42)	16 (38)
<b>Azacitidina</b>			
Administrada	17 (14)	7 (9)	10 (24)
No administrada	105 (86)	73 (91)	32 (76)
<b>IPSS</b>			
Bajo	105 (86)	72 (90)	33 (79)
Intermedio-1	17 (14)	8 (10)	9 (21)
<b>IPSS-R</b>			
Muy bajo	53 (43)	41 (51)	12 (29)
Bajo	60 (50)	37 (46)	23 (55)
Intermedio	8 (6)	2 (3)	6 (14)
Alto	1 (1)	0 (0)	1 (2)
<b>Estatus</b>			
Vivo	71 (58)	47 (59)	24 (57)
Muerto	51 (42)	33 (41)	18 (43)

MO: médula ósea.

## 5.1 Análisis de calidad de la secuenciación

Conforme al método expuesto previamente, se prepararon las librerías NGS a partir de las muestras de ADN de los 122 pacientes que integraban el estudio. Según la capacidad del chip Ion V3 utilizado y los criterios de calidad establecidos para una secuenciación óptima (Escala de calidad *Phred*,  $Q=30$ ), se estableció un número máximo de 53 muestras por carrera que permitió obtener una cobertura mínima de 2000X por muestra. Al concluir cada carrera se analizaron sus métricas para poder confirmar la correcta secuenciación de las muestras (**Figura 13**).



**Figura 13.** Informe de calidad obtenido tras secuenciar 53 muestras en la primera carrera NGS. Se alcanzaron cerca de 70 millones de lecturas con amplicones entre 150-200 pb y con un alineamiento óptimo del 98%.

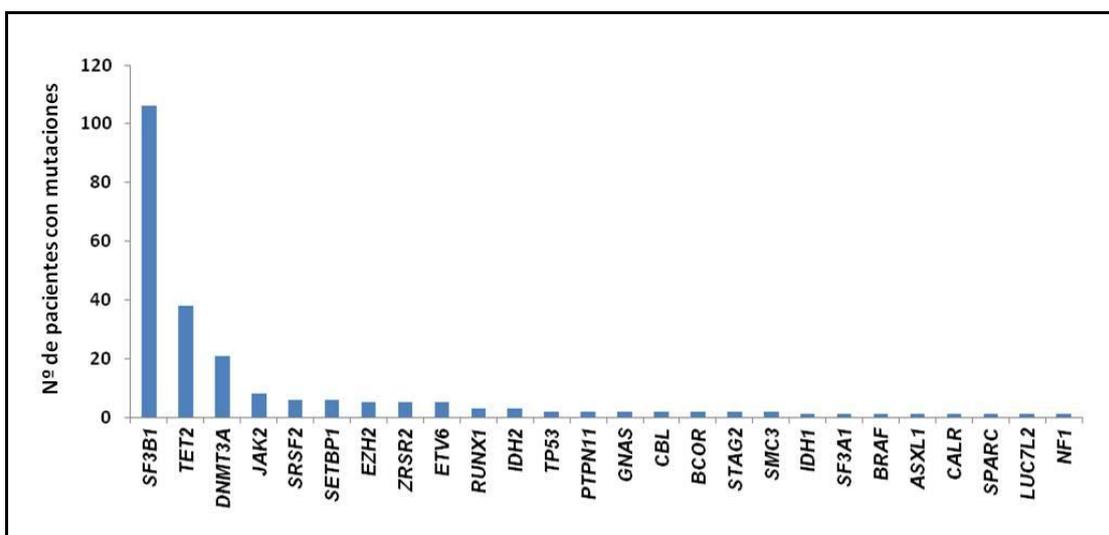
Una vez comprobados los parámetros de calidad de la carrera se analizaron las coberturas de cada muestra para confirmar primero que el porcentaje mapeado *on-target* fuera superior al 90% y segundo que las lecturas fueran uniformes tanto entre los distintos amplicones como en los dos sentidos de lectura, directo y reverso. Se

detectaron un total de 734 variantes exónicas y se descartaron 17 variantes (tasa error=2,3%) que resultaron falsos positivos recurrentes tras su análisis en el IGV.

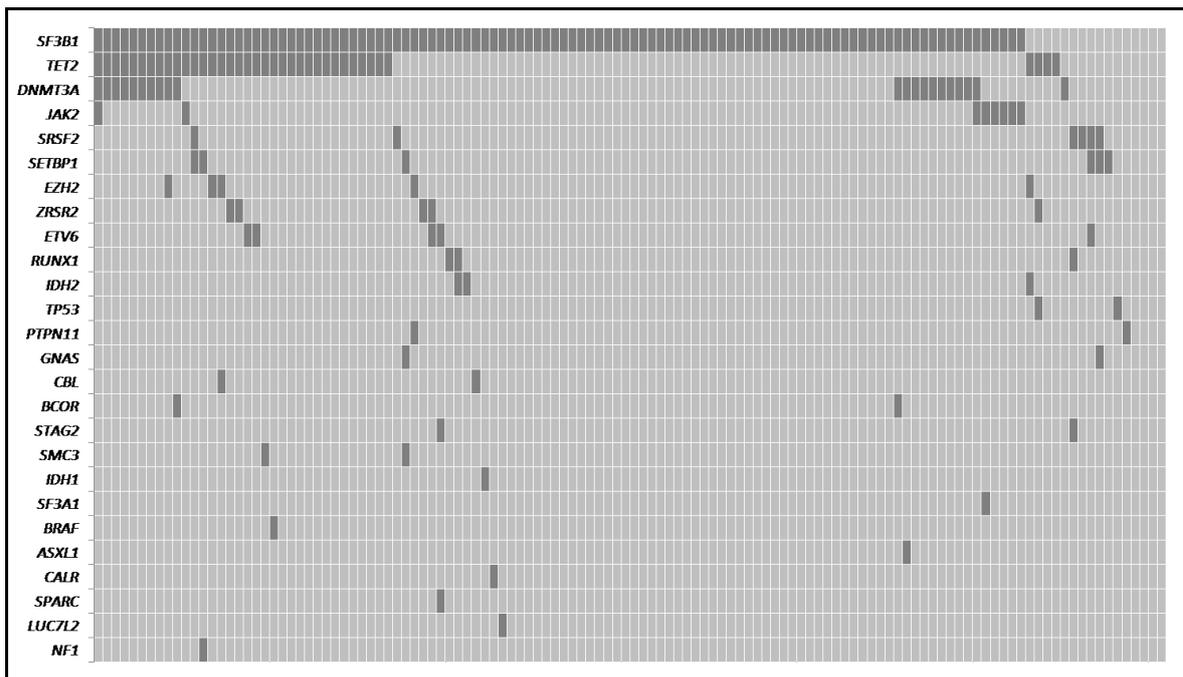
## 5.2. Frecuencia de las mutaciones en la serie global

Con el estudio molecular realizado, se encontraron mutaciones somáticas en el 97% (118 de 122) de los pacientes estudiados (**Tabla 10; Tabla 11**). Solo 4 pacientes no mostraron evidencia alguna de alteraciones genéticas o citogenéticas, de los cuales 3 fueron SMD-SA-DM y uno 1 fue un SMD-SA-DU. La mediana del número de mutaciones por paciente fue de 2, variando de 0 a 5. Se observó una diferencia significativa en la prevalencia de mutaciones entre las categorías de la OMS 2016, con un mayor número de mutaciones por paciente en los SMD-SA-DM respecto los SMD-SA-DU (2 vs. 1, rango 0-5,  $P=0,003$ ).

Según las categorías funcionales de los genes estudiados, las mutaciones en factores de *splicing* fueron las más frecuentes (111/122, 91%), seguidas de los componentes que participan en la metilación del ADN (52/122, 43%), los transductores de señales (16/122, 13%), los modificadores de la cromatina (11/122, 9%), los factores de transcripción (9/122, 7%) y los supresores tumorales (3/122, 3%). Como se esperaba, la mayoría de los casos presentaron mutaciones en el gen *SF3B1* (106/122, 87%), pero también se detectaron mutaciones en otros genes en un número destacable de pacientes: *TET2* (38/122, 31%), *DNMT3A* (21/122, 17%), *JAK2* (8/122, 7%), *SRSF2* (6/122, 5%), *SETBP1* (6/122, 5%), *EZH2* (5/122, 4%) y *ETV6* (5/122, 4%) (**Figura 15; Figura 15**).



**Figura 14.** Número de mutaciones encontradas en los pacientes de la serie con SMD-SA.



**Figura 15.** Distribución de mutaciones obtenida en los 122 pacientes de la serie con SMD-SA. Cada columna representa una muestra. Las celdas en gris oscuro indican una mutación del gen de localizado en esa fila.

Tabla 10. Mutaciones *missense*, *frameshift* y *nonsense* en la serie analizada.

Paciente	Gen	Proteína	Cambio	SIFT	POLYPHEN	MUTATION TASTER	COSMIC	Anotación
SMD-SA_1	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	SF3B1	p.Lys666Arg	c.1997A>G	0	1	deletérea	131553	Patogénica
SMD-SA_2	SF3B1	p.Asn626Asp	c.1876A>G	0	1	deletérea	131555	Patogénica
	TET2	p.Lys1173fs	c.3516_3523del			deletérea		Patogénica
	TET2	p.Cys1273Phe	c.3818G>T	0	1	deletérea	87135	Patogénica
	EZH2	p.Lys740Ter	c.2218A>T			deletérea		Patogénica
SMD-SA_3	SF3B1	p.Gly742Asp	c.2225G>A	0.08	0.966	deletérea	145923	Patogénica
SMD-SA_4	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	DNMT3A	p.Tyr735Cys	c.2204A>G	0	1	deletérea	133126	Patogénica
SMD-SA_5	SF3B1	p.Gly742Asp	c.2225G>A	0.08	0.966	deletérea	145923	Patogénica
	SRSF2	p.Pro95Arg	c.284C>G	0.05	0.134	deletérea	211661	Patogénica
	TET2	p.Asp1427Val	c.4280A>T	0	1	deletérea		Patogénica
	SETBP1	p.His1100Arg	c.3299A>G	0	0.998	deletérea		Patogénica
SMD-SA_6	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_7	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_8	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>A	0	1	deletérea	130416	Patogénica
	JAK2	p.Val617Phe	c.1849G>T	0	0.996	deletérea	12600	Patogénica
	SF3A1	p.Arg587Cys	c.1759C>T	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_9	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_10	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_11	SF3B1	p.Lys666Thr	c.1997A>C	0	1	deletérea	131556	Patogénica
	JAK2	p.Val617Phe	c.1849G>T	0	0.996	deletérea	12600	Patogénica
SMD-SA_12	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_13	DNMT3A	p.Arg882His	c.2645G>A	0	1	deletérea	52944	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Phe1285del	c.3852_3854del			deletérea	211724	Patogénica
SMD-SA_14	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_15	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>C	0	1	deletérea	132938	Patogénica
SMD-SA_16	TP53	p.Arg209Gln	c.626G>A	0	0.998	deletérea		Patogénica
SMD-SA_17	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Thr246fs	c.737_737del			deletérea		Patogénica
	BRAF	p.Ile710fs	c.2127_2128ins			deletérea		Patogénica
SMD-SA_18	DNMT3A	p.Met548Thr	c.1643T>C	0	1	deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	SF3B1	p.His662Tyr	c.1984C>T	0	1	deletérea	131560	Patogénica
	TET2	p.Met1729fs	c.5170_5171ins			deletérea		Patogénica
	EZH2	p.Asn673Ile	c.2018A>T	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_19	DNMT3A	p.Arg882Cys	c.2644C>T	0	1	deletérea	53042	Patogénica
	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>G	0	1	deletérea	130416	Patogénica
	JAK2	p.Val617Phe	c.1849G>T	0	0.996	deletérea	12600	Patogénica
SMD-SA_20	PTPN11	p.Gln587Glu	c.1759C>G	0.57	0.064	deletérea		Posible patogénica
SMD-SA_21	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Gly1288Ser	c.3862G>A	0	1	deletérea	110780	Patogénica
SMD-SA_22								
SMD-SA_23	DNMT3A	p.Arg771Ter	c.2311C>T			deletérea	231563	Patogénica
	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>A	0	1	deletérea	130416	Patogénica
	TET2	p.Arg1202Ile	c.3605G>T	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_24	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_25	SF3B1	p.Arg625Gly	c.1873C>G	0	1	deletérea	1169490	Patogénica
SMD-SA_26	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Tyr867His	c.2599T>C	0	0.999	deletérea	327337	Patogénica
SMD-SA_27								

Paciente	Gen	Proteína	Cambio	SIFT	POLYPHEN	MUTATION TASTER	COSMIC	Anotación
SMD-SA_28	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>T	0	1	deletérea	132938	Patogénica
	EZH2	p.Tyr133Asp	c.397T>G	0	0.068	deletérea	144172	Patogénica
	PTPN11	p.Gly503Ala	c.1508G>C	0	0.998	deletérea	13027	Patogénica
SMD-SA_29	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_30	SF3B1	p.Lys666Gln	c.1996A>C	0	1	deletérea	132950	Patogénica
SMD-SA_31	DNMT3A	p.Trp327fs	c.979_979del			deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	ASXL1	p.Gln283His	c.849G>C	0.02	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_32	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>T	0	1	deletérea	132938	Patogénica
SMD-SA_33	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	LUC7L2	p.Glu111Asp	c.333G>C	0.03	0.565	deletérea		Posible patogénica
	TET2	p.Gln1541Ter	c.4621C>T			deletérea		Patogénica
SMD-SA_34	DNMT3A	p.Gly10fs	c.27_28ins			deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_35	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	ZRSR2	p.Gln32Ter	c.94C>T			deletérea		Patogénica
	ZRSR2	p.Cys312Tyr	c.935G>A	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_36	DNMT3A	p.Arg736His	c.2207G>A	0.39	0.997	deletérea	133737	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	SF3B1	p.His662Asp	c.1984C>G	0	1	deletérea	131560	Patogénica
	TET2	p.Gln80Ter	c.238C>T			deletérea	43428	Patogénica
	TET2	p.Gln969Ter	c.2905C>T			deletérea		Patogénica
SMD-SA_37	SRSF2	p.Pro95His	c.284C>A	0	1	deletérea	211504	Patogénica
	SETBP1	p.Asp868Asn	c.2602G>A	0	1	deletérea	1318400	Patogénica
	GNAS	p.Arg844Cys	c.2530C>T	0	1	deletérea	1566192	Patogénica
SMD-SA_38								
SMD-SA_39	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_40	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_41	SF3B1	p.Gly742Asp	c.2225G>A	0	1	deletérea	145923	Patogénica
	SF3B1	p.Arg625Gly	c.1873C>G	0	1	deletérea	1169490	Patogénica
SMD-SA_42	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>A	0	1	deletérea	130416	Patogénica
	JAK2	p.Val617Phe	c.1849G>T	0	0.996	deletérea	12600	Patogénica
SMD-SA_43	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_44	SF3B1	p.Lys666Asn	c.1998G>C	0	1	deletérea	131557	Patogénica
	SRSF2	p.Pro95His	c.284C>A	0	0.065	deletérea	211504	Patogénica
SMD-SA_45	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_46	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_47	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_48	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	CBL	p.Arg462Ter	c.1384C>T			deletérea	34079	Patogénica
SMD-SA_49	DNMT3A	p.Arg882Cys	c.2644C>T	0	1	deletérea	53042	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_50	DNMT3A	p.Arg882His	c.2645G>A	0	1	deletérea	452944	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_51	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.His1219Tyr	c.3655C>T	0	1	deletérea		Patogénica
	DNMT3A	p.Arg882Cys	c.2644C>T	0	1	deletérea	53042	Patogénica
SMD-SA_52	DNMT3A	p.Gly685Arg	c.2053G>A	0.01	1	deletérea	1235163	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Leu699Ter	c.2096T>A			deletérea		Patogénica
	JAK2	p.Val617Phe	c.1849G>T	0	0.996	deletérea	12600	Patogénica
SMD-SA_53	DNMT3A	p.Asn403fs	c.1208_1208del			deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Arg625Leu	c.1874G>T	0	1	deletérea	110695	Patogénica
SMD-SA_54	DNMT3A	p.Ile369fs	c.1105_1117del			deletérea	144493	Patogénica
	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>T	0	1	deletérea	132938	Patogénica
	TET2	p.Thr1884Ala	c.5650A>G	0	1	deletérea		Patogénica
	BCOR	p.Ala970Glu	c.2909C>A	0	1	deletérea		Patogénica

Resultados

Paciente	Gen	Proteína	Cambio	SIFT	POLYPHEN	MUTATION TASTER	COSMIC	Anotación
SMD-SA_55	DNMT3A	p.Asp702fs	c.2104_2104del			deletérea		Patogénica
	DNMT3A	p.Gly10fs	c.27_28ins			deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Lys666Thr	c.1997A>C	0	1	deletérea	131556	Patogénica
SMD-SA_56								
SMD-SA_57	SF3B1	p.Lys666Gln	c.1996A>C	0	1	deletérea	132950	Patogénica
	TET2	p.Glu28fs	c.81_82del			deletérea	1426202	Patogénica
	TET2	p.Cys677fs	c.2027_2030del			deletérea	43519	Patogénica
SMD-SA_58	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>A	0	1	deletérea	130416	Patogénica
	TET2	p.Gln1030Ter	c.3088C>T			deletérea	96929	Patogénica
	TET2	p.His1219Asn	c.3655C>A	0	1	deletérea		Patogénica
	TET2	p.Arg1891Gly	c.5671A>G	0	1	deletérea		Patogénica
	ZRSR2	p.Trp111Ter	c.333G>A			deletérea		Patogénica
SMD-SA_59	DNMT3A	p.Arg882Cys	c.2644C>T	0	1	deletérea	53042	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	BCOR	p.Val598fs	c.1791_1792ins			deletérea		Patogénica
SMD-SA_60	SF3B1	p.Lys666Arg	c.1997A>G	0	1	deletérea	131553	Patogénica
	RUNX1	p.Arg169fs	c.506_507ins			deletérea	1318812	Patogénica
SMD-SA_61	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	CALR	p.Glu380Gly	c.1139A>G	0.4	0	deletérea		Patogénica
SMD-SA_62	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	SPARC	p.Arg268His	c.803G>A	0.06	1	deletérea		Patogénica
	ETV6	p.Met389Val	c.1165A>G	0	1	deletérea		Patogénica
	STAG2	p.Arg1012Gln	c.3035G>A	0.15	0.971	deletérea	1465378	Patogénica
SMD-SA_63	SF3B1	p.Lys666Arg	c.1997A>G	0	1	deletérea	131553	Patogénica
SMD-SA_64	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>C	0	1	deletérea	132938	Patogénica
SMD-SA_65	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>G	0	1	deletérea	130416	Patogénica
	TET2	p.Gly1152Glu	c.3455G>A	0	1	deletérea	53268	Patogénica
SMD-SA_66	SF3B1	p.Asn626Asp	c.1876A>G	0	1	deletérea	131555	Patogénica
	TET2	p.Gln866fs	c.2593_2597del			deletérea		Patogénica
SMD-SA_67	DNMT3A	p.Arg320Ter	c.958C>T			deletérea	133721	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Phe1309Leu	c.3927T>A	0	0.999	deletérea		Patogénica
SMD-SA_68	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Pro1419Arg	c.4256C>G	0	1	deletérea	100055	Patogénica
	JAK2	p.Val617Phe	c.1849G>T	0	0.996	deletérea	12600	Patogénica
SMD-SA_69	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_70	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Gln1034Ter	c.3100C>T			deletérea		Patogénica
SMD-SA_71	SETBP1	p.Asp868Asn	c.2602G>A	0	1	deletérea	1318400	Patogénica
	SETBP1	p.Gly870Ser	c.2608G>A	0	1	deletérea	1234973	Patogénica
SMD-SA_72	SF3B1	p.Arg625Leu	c.1874G>T	0	1	deletérea	110695	Patogénica
SMD-SA_73	TET2	p.Gln591Ter	c.1771C>T			deletérea		Patogénica
	TET2	p.His1416Asp	c.4246C>G	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_74	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Leu1212fs	c.3633_3633del			deletérea	87124	Patogénica
SMD-SA_75	ETV6	p.Tyr346Cys	c.1037A>G	0	1	deletérea		Patogénica
	SRSF2	p.Pro95_Arg102del	c.284_307del			deletérea	146289	Patogénica
	SETBP1	p.Asp868Asn	c.2602G>A	0	1	deletérea	1318400	Patogénica
	SETBP1	p.Asp874Asn	c.2620G>A	0	1	deletérea	1717365	Patogénica
SMD-SA_76	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	ETV6	p.Leu201Pro	c.602T>C	0.01	0.641	deletérea	546746	Patogénica
	TET2	p.Glu783Ter	c.2347G>T			deletérea		Patogénica
SMD-SA_77	DNMT3A	p.Gln692Ter	c.2074C>T			deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Thr663Ile	c.1988C>T	0	1	deletérea	145921	Patogénica
	TET2	p.Gln1084Pro	c.3251A>C	0	0.325	deletérea		Patogénica
SMD-SA_78	TET2	p.Glu783Ter	c.2347G>T			deletérea		Patogénica
	ETV6	p.Leu201Pro	c.602T>C	0.01	0.641	deletérea	546746	Patogénica

Paciente	Gen	Proteína	Cambio	SIFT	POLYPHEN	MUTATION TASTER	COSMIC	Anotación
SMD-SA_79	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Cys1289Tyr	c.3866G>A	0	1	deletérea	87136	Patogénica
SMD-SA_80	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Gln769fs	c.2305_2305del			deletérea	87100	Patogénica
SMD-SA_81	SRSF2	p.Pro95_Arg102del	c.284_307del			deletérea	146289	Patogénica
	STAG2	p.Glu1023Val	c.3068A>T	0	0.974	deletérea		Patogénica
SMD-SA_82	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_83	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_84	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_85	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_86	TET2	p.Gln876Ter	c.2626C>T			deletérea	211613	Patogénica
	TP53	p.Cys176Trp	c.528C>G	0	1	deletérea	1268357	Patogénica
	ZRSR2	p.Tyr292Asn	c.874T>A	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_87	SF3B1	p.Lys666Arg	c.1997A>G	0	1	deletérea	131553	Patogénica
SMD-SA_88	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Asn1805fs	c.5413_5413del			deletérea		Patogénica
	NF1	p.Thr1730Ser	c.5189C>G	0.01	1	deletérea		Patogénica
	SETBP1	p.Arg1321His	c.3962G>A	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_89	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>T	0	1	deletérea	132938	Patogénica
	IDH2	p.Arg140Gln	c.419G>A	0	1	deletérea	41590	Patogénica
SMD-SA_90	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>G	0	1	deletérea	130416	Patogénica
SMD-SA_91	SF3B1	p.His662Asp	c.1984C>G	0	1	deletérea	131560	Patogénica
	ETV6	p.Leu201Pro	c.602T>C	0.01	0.641	deletérea	546746	Patogénica
	ZRSR2	p.Lys90Met	c.269A>T	0	0.998	deletérea		Patogénica
SMD-SA_92	SF3B1	p.Lys666Thr	c.1997A>C	0	1	deletérea	131556	Patogénica
	TET2	p.Leu878fs	c.2632_2632del			deletérea		Patogénica
	SMC3	p.Tyr1140Asn	c.3418T>A	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_93	IDH1	p.Phe32Val	c.94T>G	0.02	0.303	deletérea	1581043	Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_94	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_95	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	SETBP1	p.Arg627Cys	c.1879C>T	0	1	deletérea	1236142	Patogénica
	GNAS	p.Arg844His	c.2531G>A	0	1	deletérea	94388	Patogénica
SMD-SA_96	SF3B1	p.Arg625Cys	c.1873C>T	0	1	deletérea	110696	Patogénica
SMD-SA_97	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_98	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_99	DNMT3A	p.Cys559Tyr	c.1676G>A	0	1	deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Gln341Ter	c.1021C>T	0	1	deletérea		Patogénica
SMD-SA_100	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	JAK2	p.Pro708Ser	c.2122C>T	1	0.999	deletérea		Patogénica
SMD-SA_101	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_102	SF3B1	p.Lys666Arg	c.1997A>G	0	1	deletérea	131553	Patogénica
SMD-SA_103	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_104	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Trp564Ter	c.1691G>A			deletérea	1716596	Patogénica
	TET2	p.Ser714Ter	c.2141C>G			deletérea		Patogénica
SMD-SA_105	TET2	p.Leu500fs	c.1494_1495ins			deletérea	211641	Patogénica
	EZH2	p.Asp657Tyr	c.1969G>T	0	1	deletérea	1000720	Patogénica
	IDH2	p.Arg140Gln	c.419G>A	0	1	deletérea	41590	Patogénica
SMD-SA_106	SRSF2	p.Pro95Arg	c.284C>G	0.05	0.134	deletérea	211661	Patogénica
SMD-SA_107	SF3B1	p.Lys666Asn	c.1998G>T	0	1	deletérea	131557	Patogénica
SMD-SA_108	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_109	TET2	p.Gln684fs	c.2046_2046del			deletérea	211686	Patogénica
SMD-SA_110	SF3B1	p.Trp658Arg	c.1972T>A	0	1	deletérea		Patogénica
	TET2	p.Arg1404Ter	c.4210C>T			deletérea		Patogénica
	CBL	p.Arg420Gln	c.1259G>A	0	1	deletérea	34077	Patogénica

## Resultados

Paciente	Gen	Proteína	Cambio	SIFT	POLYPHEN	MUTATION TASTER	COSMIC	Anotación
SMD-SA_111	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Lys1339fs	c.4011_4012ins			deletérea	87145	Patogénica
SMD-SA_112	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Ser657Ter	c.1970C>G			deletérea		Patogénica
	TET2	p.Gln1084Pro	c.3251A>C	0	0.325	deletérea		Patogénica
SMD-SA_113	SF3B1	p.Asp584Glu	c.1752T>A	0.03	1	deletérea		Patogénica
	IDH2	p.Arg140Gln	c.419G>A	0	1	deletérea	41590	Patogénica
	RUNX1	p.Asn96Ser	c.287A>G	0.08	0.988	deletérea		Patogénica
SMD-SA_114	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
	TET2	p.Cys1271fs	c.3811_3812ins			deletérea	87134	Patogénica
SMD-SA_115	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_116	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>C	0	1	deletérea	132938	Patogénica
SMD-SA_117	DNMT3A	p.Trp327Ter	c.981G>A			deletérea		Patogénica
	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_118	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_119	SF3B1	p.His662Gln	c.1986C>A	0	1	deletérea	130416	Patogénica
	JAK2	p.Val617Phe	c.1849G>T	0	0.996	deletérea	12600	Patogénica
SMD-SA_120	SF3B1	p.Lys700Glu	c.2098A>G	0	1	deletérea	84677	Patogénica
SMD-SA_121	DNMT3A	p.Tyr436Ter	c.1308C>A			deletérea		Patogénica
SMD-SA_122	SF3B1	p.Glu622Asp	c.1866G>T	0	1	deletérea	132938	Patogénica

SIFT <0,05 y Polyphen >0,6: mutación probablemente patogénica.

**Tabla 11.** Mutaciones en regiones de *splicing* en la serie analizada.

Paciente	Cambio	Gen	Región	NNSPLICE	HSF	NETGENE	MUTATION TASTER	Anotación
SMD-SA_55	chr2:25458695, C>T	DNMT3A	splice_5	deletérea	deletérea	neutral	deletérea	Posible patogénica
SMD-SA_79	chrX:15836766, G>A	ZRSR2	splice_3	deletérea	deletérea	deletérea	deletérea	Posible patogénica
SMD-SA_81	chr21:36259138, A>G	RUNX1	splice_3	deletérea	deletérea	deletérea	deletérea	Posible patogénica
SMD-SA_95	chr10:112342401, G>A	SMC3	splice_3	deletérea	neutral	deletérea	deletérea	Posible patogénica
SMD-SA_110	chr7:148543690, T>TT	EZH2	splice_5	neutral	deletérea	neutral	deletérea	Posible patogénica

### 5.3. Mutaciones en genes de *splicing*

Las mutaciones encontradas con mayor frecuencia en el gen *SF3B1* se localizaron en los codones K700 (n=66, 60%), K666 (n=12, 11%) y H662 (n=10, 10%; **Tabla 12**). Todas las mutaciones de *SF3B1* fueron heterocigotas y de naturaleza *missense*. Cuatro casos positivos en *SF3B1* (4/106, 4%) presentaron mutaciones con frecuencias alélicas entre el 3-8% que no habían sido detectadas previamente por secuenciación Sanger. En 4 pacientes se hallaron dos mutaciones de *SF3B1*, aunque este hecho no se correlacionó con un mayor porcentaje de sideroblastos en anillo (SA) u otras diferencias clínicas respecto a los pacientes con una sola mutación. Sin embargo, los pacientes con la mutación K700E mostraron un nivel significativamente mayor de SA que los pacientes con otras mutaciones de *SF3B1* (mediana, 44% vs. 27% SA,  $P=0,012$ ). Respecto a la asociación de las mutaciones de *SF3B1* con las características clínico-biológicas de los pacientes, los pacientes *SF3B1* mutados mostraron un recuento plaquetario significativamente mayor (mediana,  $267 \times 10^9$  plaquetas/L vs.  $146 \times 10^9$  plaquetas/L,  $P<0,001$ ) y una menor proporción de alteraciones cromosómicas de mal pronóstico (6% vs. 31%,  $P=0,038$ ) en comparación con los pacientes *SF3B1* no mutados. No se encontraron diferencias significativas en la edad, hemoglobina, recuento de glóbulos blancos o porcentaje de blastos en médula ósea en base al estado mutacional de *SF3B1*.

El gen *SRSF2* fue el segundo gen de *splicing* mutado con mayor frecuencia en la serie, encontrándose mutaciones en 6 de los 122 pacientes (5%) analizados. Cuatro pacientes mostraron mutaciones en el hotspot P95 (n=2, P95H; n=2, P95R) mientras que 2 pacientes presentaron la delección P95\_R102del. Las mutaciones de *SRSF2* fueron más frecuentes en los pacientes *SF3B1* no mutados que en los *SF3B1* mutados (25% vs. 2%,  $P=0,001$ ). Respecto a su asociación con las variables clínico-biológicas, los pacientes *SRSF2* mutados, mostraron un recuento plaquetario significativamente más bajo (mediana,  $93 \times 10^9$  plaquetas/L vs.  $262 \times 10^9$  plaquetas/L,  $P<0,001$ ) y una mayor dependencia transfusional al momento del diagnóstico (100% vs. 59%,  $P=0,046$ ) que los pacientes *SRSF2* no mutados. La mayoría de los pacientes *SRSF2* mutados (83%) se agrupaban en categorías de bajo riesgo del IPSS-R.

Finalmente, 5 pacientes (4%) mostraron mutaciones en *ZRSR2*, gen de *splicing* localizado en el cromosoma X. Cuatro de estos 5 pacientes (80%) eran hombres. Además, el 80% de los pacientes *ZRSR2* mutados mostró dependencia transfusional y fue tratado con AEE.

**Tabla 12.** Tipos y frecuencias de las mutaciones de *SF3B1* encontradas en la serie.

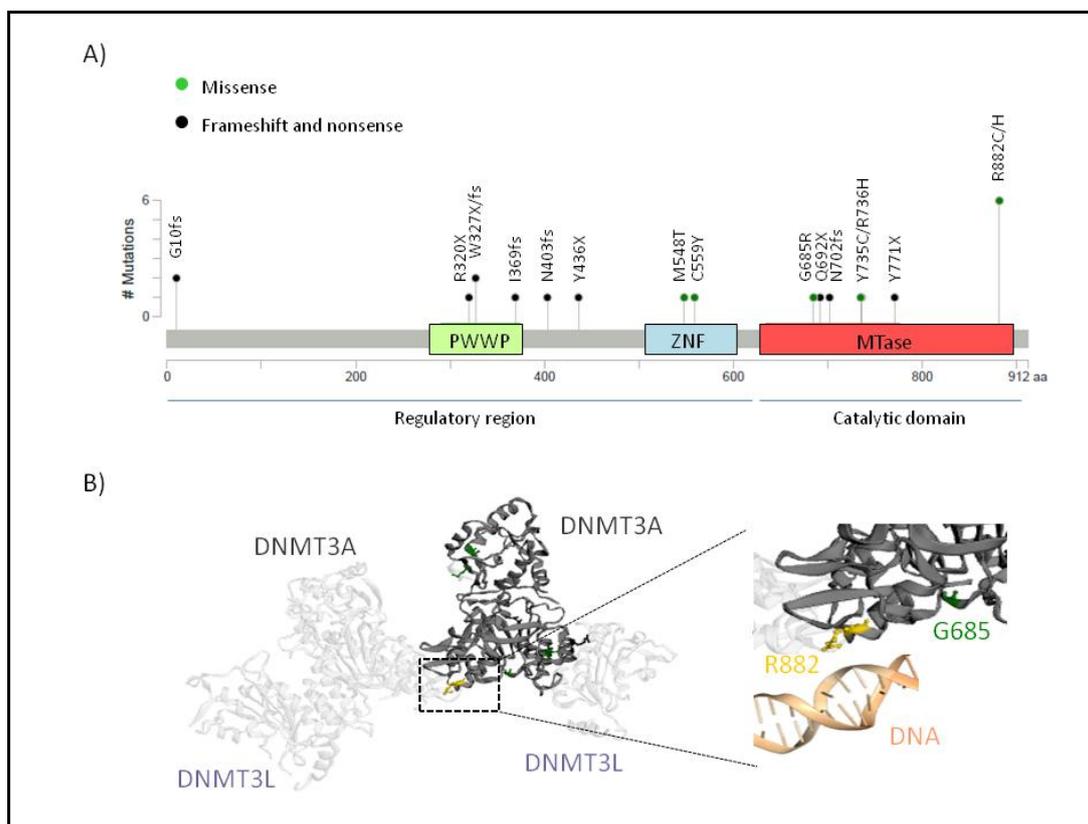
Mutaciones <i>SF3B1</i>	Número de casos	Porcentaje respecto al total de mutaciones
K700E	66	
Codón 700	66	60
K666R	5	
K666T	3	
K666N	2	
K666Q	2	
Codón 666	12	10,9
H662Q	8	
H662D	2	
H662Y	1	
Codón 662	11	10
E622D	8	
Codón 622	8	7,3
R625L	2	
R625G	2	
R625C	1	
Codón 625	5	4,6
G742D	3	
Codón 742	3	2,7
N626D	2	
Codón 626	2	1,8
T663I	1	
Codón 663	1	0,9
W658R	1	
Codón 658	1	0,9
D584E	1	
Codón 584	1	0,9

#### 5.4. Mutaciones en genes de metilación

Se detectaron mutaciones de *TET2* en 38 pacientes (31%). Estos pacientes mostraron una (n=31), dos (n=6) o incluso tres mutaciones (n=1) en *TET2* y además de naturaleza muy variable: *missense*, *nonsense* y *frameshift*. Los pacientes *TET2* mutados mostraron una mediana de mutaciones mayor que los pacientes *TET2* no

mutados (3 vs. 1, rango 0-5;  $P < 0,001$ ). Además, las mutaciones de *TET2* se encontraron con mayor frecuencia en el subgrupo SMD-SA-DM que en el subgrupo SMD-SA-DU (43% vs. 24%,  $P = 0,025$ ).

Respecto al gen *DNMT3A*, se detectaron mutaciones en 21 de los 122 pacientes de la serie (17%). Nueve pacientes (43%) portaron mutaciones de *DNMT3A* en su dominio regulador (RG, exones 1-15) y la mayoría de estas alteraciones (80%) fueron de naturaleza *nonsense* y *frameshift*. Doce pacientes (57%) portaron mutaciones de *DNMT3A* en su dominio metiltransferasa (MT, exones 16-23) y, de manera inversa, en esta región del gen, predominaron las mutaciones *missense* (75%; **Figura 16A**). Las mutaciones de *DNMT3A* ocurrieron con mayor frecuencia en el *hotspot* R882 (exón 23): 4/21 pacientes (19%) portaban la mutación R882C y 2/21 pacientes (10%) la mutación R882H (**Figura 16B**).



**Figura 16.** Localización de las mutaciones en el gen *DNMT3A* y estructura de su proteína.

**A)** Número de mutaciones encontradas y su localización con respecto al dominio funcional de la proteína: PWWP, segmentación de cromatina; ZNF, dedo de zinc; MTasa: metiltransferasa.

**B)** Interacción de dos proteínas DNMT3L y dos proteínas DNMT3A para formar un tetrámero que actúa directamente en la metilación del ADN. El residuo R882 (en color amarillo) es crítico en la unión correcta de la proteína DNMT3A con la molécula de ADN (Yan XJ *et al.*, 2011).

Diecinueve de los 21 pacientes con mutaciones en *DNMT3A* (91%) tenían un cariotipo normal y 20 de ellos (95%) eran pacientes de bajo riesgo según los índices IPSS (categoría de bajo riesgo) e IPSS-R (categorías de muy bajo y bajo riesgo). A pesar de este perfil aparentemente favorable, los pacientes con mutaciones en *DNMT3A* mostraron una mayor dependencia transfusional en el momento del diagnóstico respecto los pacientes *DNMT3A* no mutados (81% vs. 56%,  $P=0,029$ ). Además, el porcentaje de pacientes con mutaciones de *DNMT3A* en el dominio MT y con dependencia transfusional resultó muy elevado en comparación con el resto de la serie (92% vs. 57%,  $P=0,017$ ).

Solo 4 pacientes (3%) de la serie presentaron mutaciones en los genes *IDH*: un paciente portó una mutación en el gen *IDH1* (n=1, F32V) mientras que tres pacientes portaron una mutación en el *hotspot* R140 del gen *IDH2* (n=3, R140Q). No hubo diferencias significativas en dependencia transfusional, recuento leucocitario o porcentaje de blastos en médula ósea según el estado de mutacional de *IDH1* o *IDH2*.

### 5.5. Otras mutaciones genéticas

Un menor número de mutaciones (2-7%) involucraron a transductores de señales como *JAK2* (n=8, 7%) y *CBL* (n=2, 2%), a factores de transcripción como *SETBP1* (n=6, 5%), *ETV6* (n=5, 4%) y *RUNX1* (n=3, 3%), a modificadores de la cromatina como *EZH2* (n=5, 4%) y a supresores tumorales como *TP53* (n=2, 2%).

Los pacientes portadores de mutaciones en *JAK2*, todos co-mutados para *SF3B1* y con un cariotipo normal, mostraron un recuento plaquetario significativamente mayor en comparación con los casos *JAK2* no mutados (mediana,  $446 \times 10^9$  plaquetas/L vs.  $248 \times 10^9$  plaquetas/L,  $P=0,010$ ; **Tabla 13**).

**Tabla 13.** Características de los pacientes con mutaciones en *JAK2*.

Paciente	Edad, años	SA (%)	PLQ ( $\times 10^9/L$ )	IPSS-R	Cariotipo	<i>SF3B1</i> (VAF, %)	<i>JAK2</i> (VAF, %)	Otras mutaciones (VAF, %)
SMD-SA_8	72	36	388	Muy bajo	46,XY	H662Q (49)	V617F (35)	<i>SF3A1</i> (46)
SMD-SA_11	53	24	457	Muy bajo	46,XY	H662Q (46)	V617F (31)	
SMD-SA_19	72	30	468	Muy bajo	46,XX	H662Q (48)	V617F (6)	<i>DNMT3A</i> (46)
SMD-SA_42	65	30	424	Muy bajo	46,XY	H662Q (35)	V617F (7)	
SMD-SA_52	58	50	322	Bajo	46,XY	K700E (46)	V617F (4)	<i>TET2</i> (46), <i>DNMT3A</i> (5)
SMD-SA_68	88	41	478	Bajo	46,XX	K700E (41)	V617F (12)	<i>TET2</i> (9)
SMD-SA_100	77	16	236	Muy bajo	46,XY	K700E (28)	P708S (47)	
SMD-SA_119	68	63	486	Muy bajo	46,XX	H662Q (35)	V617F (31)	

SA: sideroblastos en anillo; PLQ: plaquetas. VAF: *variant allele frequency*.

De manera inversa, los pacientes con mutaciones en *SETBP1* mostraron un recuento plaquetario significativamente más bajo que los pacientes con *SETBP1* no mutado (mediana,  $132 \times 10^9$  plaquetas/L vs.  $262 \times 10^9$  plaquetas/L,  $P=0,005$ ). Las mutaciones de *SETBP1* mostraron una co-ocurrencia positiva con las mutaciones de *SRSF2* y *GNAS* ( $P<0,002$ ) y, en contraste, tuvieron una co-ocurrencia negativa con las mutaciones de *SF3B1* ( $P=0,029$ ).

En un único paciente de la serie se encontró mutado el gen *CALR* (E480G). Este paciente era *SF3B1* mutado (K700E) y presentaba  $118 \times 10^9$  plaquetas/L.

Los pacientes con mutaciones en el gen *ETV6* mostraron significativamente una edad más avanzada (mediana, 84,7 años) respecto al resto de la serie (100% *ETV6*<sup>mut</sup> vs. 47% *ETV6*<sup>wt</sup>,  $>75$  años,  $P=0,026$ ) y el 80% de ellos presentaban monocitosis. Además las frecuencias alélicas de las mutaciones en *ETV6* fueron menores respecto a las otras mutaciones que presentaban los pacientes.

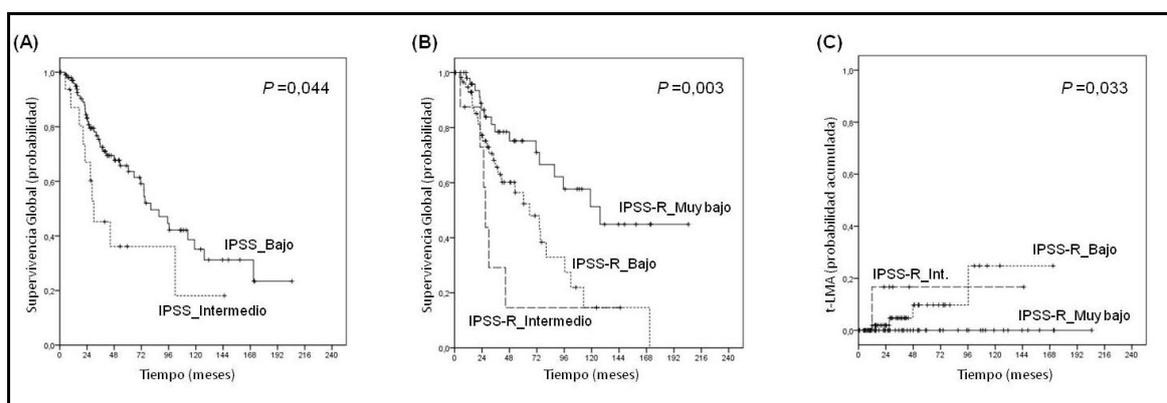
Por otro lado, aunque todos los pacientes con el gen *EZH2* mutado se agrupaban en categorías de bajo riesgo del IPSS e IPSS-R, mostraron una fuerte tendencia hacia una mayor dependencia transfusional respecto los pacientes *EZH2* no mutados (100% vs. 59%,  $P=0,07$ ).

Finalmente, la mayor parte de los genes mutados de forma minoritaria (<2%), como *BCOR*, *SMC3* y *SPARC*, se encontraban en pacientes *SF3B1* mutados y mostraron generalmente un frecuencia alélica menor respecto a la mutación *SF3B1*.

## 5.6. Impacto de las variables clínicas y de las mutaciones en el pronóstico de los pacientes

En el análisis univariante inicial se estudiaron todas las variables con una potencial influencia en el pronóstico de la enfermedad: índices IPSS e IPSS-R, displasia (unilínea vs. multilínea), tratamiento con AEE, dependencia transfusional y los 9 genes que habían sido encontrados mutados en  $\geq 5$  pacientes (*SF3B1*, *TET2*, *DNMT3A*, *JAK2*, *SRSF2*, *SETBP1*, *EZH2*, *ZRSR2* y *ETV6*).

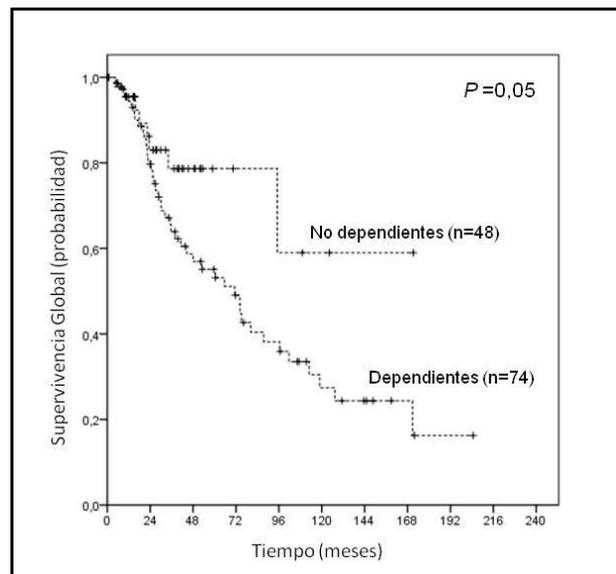
En primer lugar se estudió la supervivencia global (SG) y el riesgo de transformación a LMA (t-LMA) según los índices IPSS e IPSS-R ya que integran gran parte de las variables clínicas con un peso específico en la supervivencia de los pacientes. De acuerdo al IPSS se observó una menor SG de los pacientes con riesgo intermedio-1 respecto a los pacientes de bajo riesgo (mediana, 30 vs. 80 meses,  $P=0,044$ ; **Figura 17A**). De manera similar, según el IPSS-R se obtuvieron también diferencias significativas para los 3 subgrupos de riesgo: intermedio, bajo y muy bajo (mediana, 27 vs. 66 vs. 127 meses,  $P=0,003$ ; **Figura 17B**). Respecto al riesgo de t-LMA, no se observaron diferencias con el IPSS ( $P=0,42$ ) y los 5 pacientes que progresaron se encontraban incluidos en la categoría de bajo riesgo. Por el contrario, el IPSS-R sí que parecía identificar con más éxito a los pacientes con un mayor riesgo de t-LMA a los 5 años según los 3 subgrupos de riesgo: muy bajo, bajo e intermedio (0% vs. 5% vs. 11%,  $P=0,033$ ; **Figura 17C**). Sin embargo, cabe señalar que 4 de los 5 pacientes que progresaron a LMA se encontraban en la categoría de bajo riesgo del IPSS-R.



**Figura 17.** Curvas para la supervivencia global según los índices pronósticos calculados.

Las gráficas A y B muestran la supervivencia global según IPSS e IPSS-R respectivamente. La gráfica C muestra el riesgo de transformación leucémica según el IPSS-R.

Al margen de la variables clínicas recogidas por el IPSS e IPSS-R se analizó la SG y el riesgo de t-LMA según el tipo de displasia (unilínea vs. multilínea), el tratamiento con AEE y la dependencia transfusional. Se observó que únicamente la dependencia transfusional podría influir en la SG de los pacientes (mediana, 72 vs. 106 meses, para dependientes y no dependientes respectivamente;  $P=0,05$ ; **Figura 18**). No se observó asociación de ninguna de las 3 variables con el riesgo de t-LMA.



**Figura 18.** Curva de supervivencia global según la dependencia transfusional de los pacientes. Se observa en el límite de la significación estadística una menor supervivencia de los pacientes con dependencia transfusional.

Respecto las alteraciones moleculares, en el análisis univariante de los 9 genes mutados en  $\geq 5$  pacientes, la presencia de mutaciones en 4 genes, *SF3B1*, *SRSF2*, *EZH2* y *DNMT3A*, mostró una asociación significativa con la SG mientras que únicamente la existencia de las mutaciones en 2 genes, *EZH2* y *DNMT3A*, se asoció con el riesgo t-LMA (**Tabla 14**).

**Tabla 14.** Características de los pacientes con progresión a LMA.

Paciente	Edad, años	Displasia	IPSS	IPSS-R	Cariotipo	SF3B1	DNMT3A	Otras mutaciones	Años para LMA	Supervivencia en años, estatus
SMD-SA_7	80	DM	Bajo	Bajo	46,XX	K700E	No	No	7,8	8,0 (m)
SMD-SA_13	65	DU	Bajo	Bajo	46,XY	K700E	R882H	TET2 (F1285del)	3,9	4,8 (m)
SMD-SA_74	76	DM	Bajo	Int.	46,XY, del(1)(?q23)	K700E	No	TET2 (L1212fs)	0,9	2,1 (m)
SMD-SA_59	64	DM	Bajo	Bajo	46,XY	K700E	R882C	BCOR (V598fs)	0,9	1,7 (m)
SMD-SA_105	75	DU	Bajo	Bajo	46,XY	No	No	EZH2 (D657Y), IDH2 (R140Q)	2,3	2,5 (m)

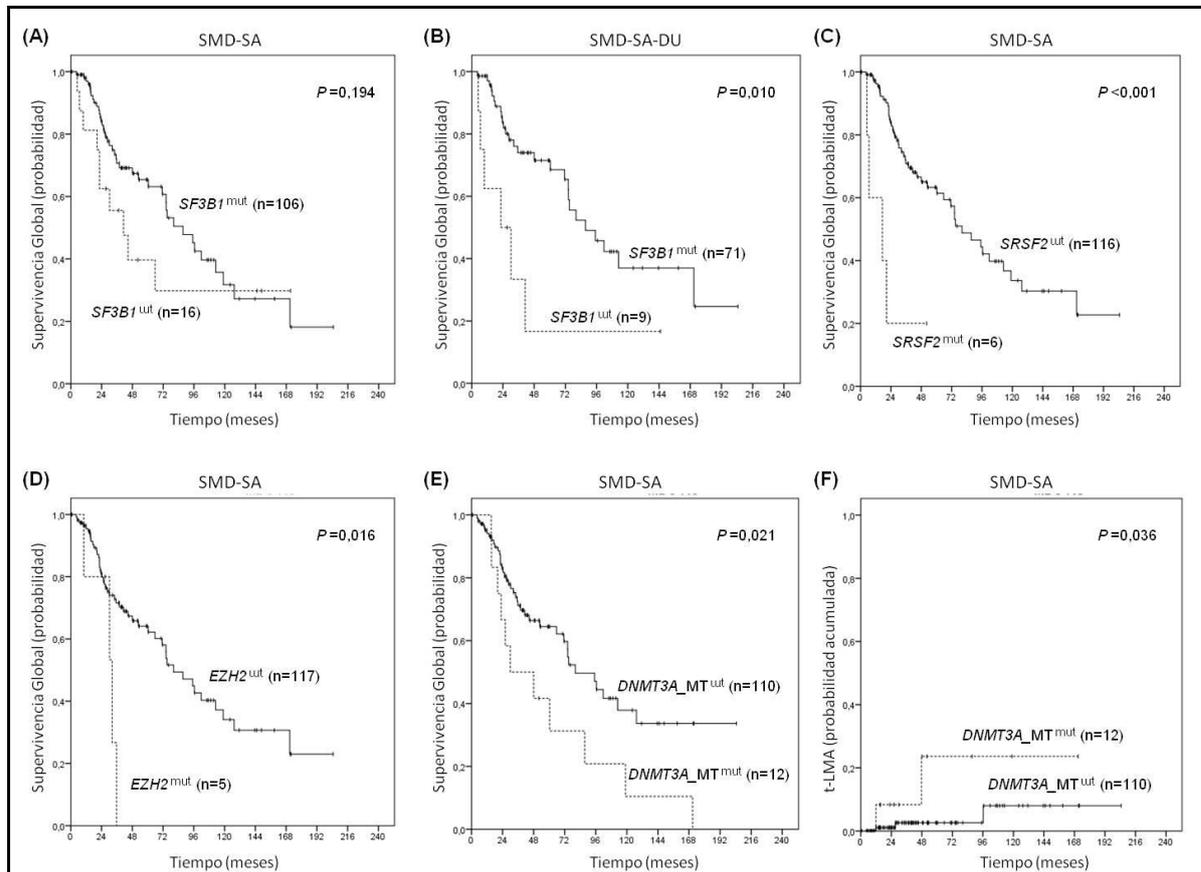
DM: displasia multilínea. DU: displasia unilínea. int: intermedio; estatus, m: muerto; v: vivo.

En la serie global, los pacientes con mutaciones en *SF3B1* no mostraron una SG significativamente mayor (mediana, 87 vs. 41 meses,  $P=0,19$ ; **Figura 19A**) o un menor riesgo de t-LMA (3% vs. 11%,  $P=0,61$ ) respecto a los pacientes *SF3B1* no mutados. Sin embargo, cuando el análisis de SG se estratificó de acuerdo a los dos subgrupos establecidos por la clasificación de la OMS 2016, SMD-SA-DU ( $n=80$ ) y SMD-SA-DM ( $n=42$ ), los pacientes *SF3B1* mutados sí que tuvieron una mayor SG respecto los pacientes *SF3B1* no mutados en el subgrupo SMD-SA-DU (mediana, 88 vs. 22 meses,  $P=0,010$ ; **Figura 19B**). En contraste, en el subgrupo SMD-SA-DM, la presencia de mutaciones en *SF3B1* no influyó de manera significativa en la SG (mediana, 66 vs. 53 meses,  $P=0,35$ ).

Los pacientes con el gen *EZH2* mutado mostraron una SG más baja y un mayor riesgo de t-LMA a los 5 años en comparación con los pacientes con *EZH2* no mutado (SG, mediana, 30 vs. 88 meses,  $P=0,003$ ; riesgo de t-LMA a los 5 años, 25% vs. 4%,  $P=0,004$ ). De manera similar, se observó que los pacientes con mutaciones en *SRSF2* mostraron una SG más baja que los pacientes sin mutaciones en este gen (mediana, 17 vs. 87 meses,  $P<0,001$ ). Sin embargo, las mutaciones de *SRSF2* no se asociaron con el riesgo de transformación leucémica (**Figura 19C**; **Figura 19D**).

Por otro lado, considerando las mutaciones de *DNMT3A* en conjunto, los pacientes con *DNMT3A* mutado no mostraron diferencias significativas en la SG o en el riesgo de t-LMA respecto a los pacientes con *DNMT3A* no mutado (SG, mediana, 71 vs. 95 meses,  $P=0,22$ ; riesgo de t-LMA a los 5 años, 14% vs. 3%,  $P=0,28$ ). Sin embargo, al considerar las mutaciones de *DNMT3A* de acuerdo al dominio de la proteína afectado, regulador (RG) o metiltransferasa (MT), se observó una SG más baja y un mayor riesgo de t-LMA en los pacientes con mutaciones de *DNMT3A* en el

dominio MT respecto a los pacientes con *DNMT3A* no mutado en este dominio (SG, mediana, 30 vs. 95 meses,  $P=0,021$ ; riesgo t-LMA a los 5 años, 23% vs. 2%,  $P=0,036$ ; **Figura 19E; Figura 19F**). Los pacientes con mutaciones de *DNMT3A* en el dominio RG no mostraron diferencias en la SG o en el riesgo de t-LMA.



**Figura 19.** Curvas de supervivencia de los pacientes con SMD-SA según sus mutaciones.

Las gráficas A y B muestran la supervivencia global (SG) según el estado mutacional de *SF3B1* en toda la cohorte y en el subgrupo SMD-SA-DU respectivamente. Los gráficos C y D muestran la SG según el estado mutacional de *SRSF2* y *EZH2* respectivamente. Las gráficas E y F muestran la SG y el riesgo de transformación leucémica (t-LMA) respectivamente, asociada a la existencia de mutaciones de *DNMT3A* en el dominio de metiltransferasa (MT).

Se realizaron finalmente análisis multivariantes para la SG y para el riesgo de t-LMA, incluyendo los 9 genes mutados en  $\geq 5$  pacientes, la edad (inferior vs. superior a la mediana), el sexo, los grupos de riesgo del IPSS y la dependencia transfusional. Además de la edad y los grupos de riesgo del IPSS, se encontró que las mutaciones en *EZH2*, *SRSF2* y *DNMT3A\_MT* fueron factores pronósticos independientes

desfavorables para la SG. En un modelo similar considerando las categorías de riesgo del IPSS-R, las mutaciones en *EZH2*, *SRSF2* y *DNMT3A*\_MT permanecieron como predictores de una SG más corta (**Tabla 15**).

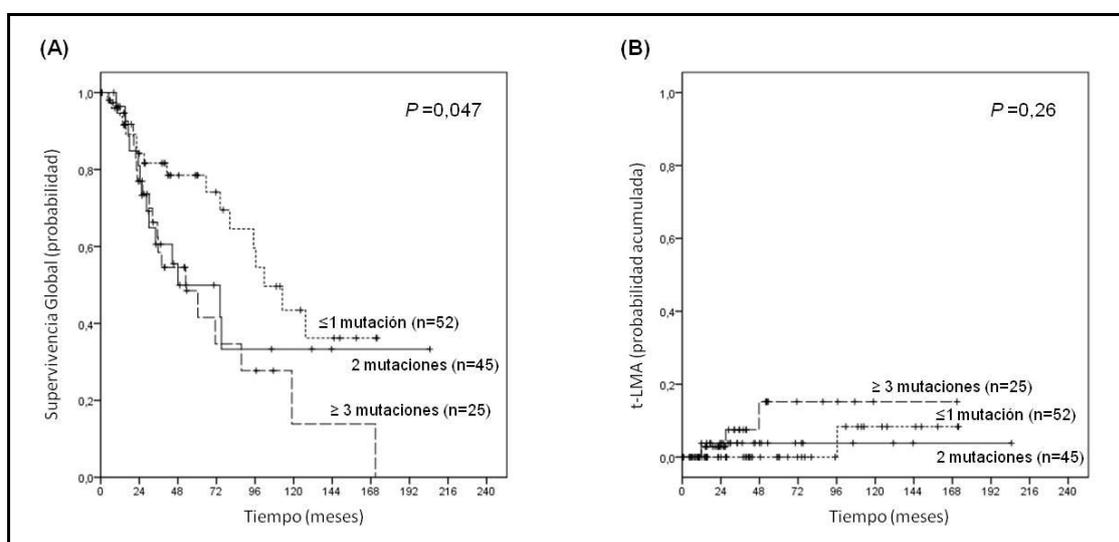
En los dos modelos multivariantes construidos para analizar el riesgo de t-LMA y ajustados por el IPSS (modelo I) o el IPSS-R (modelo II), sólo las mutaciones de *DNMT3A* en el dominio MT permanecieron significativamente como predictores de t-LMA (**Tabla 15**).

**Tabla 15.** Análisis multivariantes para la supervivencia y para el riesgo de transformación leucémica.

Variable	Supervivencia Global			Riesgo transformación LMA		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
<b>Modelo I</b>						
Clasificación riesgo IPSS Intermedio-1 vs. <i>Bajo</i>	2,28	1,01 a 5,17	<b>0,048</b>	0,00		0,99
Edad, $\geq 75$ vs. $< 75$ años	4,47	2,13 a 9,39	<b>&lt;0,001</b>	7,54	0,70 a 31,12	0,97
Sexo	0,62	0,29 a 1,29	0,20	0,18	0,02 a 2,80	0,22
Dependencia transfusional	1,38	0,59 a 3,26	0,46	1,23	0,41 a 3,60	0,76
<i>ETV6</i> <sup>mut</sup> vs. <i>ETV6</i> <sup>wt</sup>	0,62	0,08 a 4,98	0,65	0,19		0,99
<i>EZH2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>EZH2</i> <sup>wt</sup>	6,86	1,79 a 21,32	<b>0,005</b>	13,86	0,22 a 36,28	0,39
<i>JAK2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>JAK2</i> <sup>wt</sup>	0,25	0,05 a 1,21	0,09	0,00		0,99
<i>DNMT3A_MT</i> <sup>mut</sup> vs. <i>DNMT3A_MT</i> <sup>wt</sup>	5,01	2,17 a 11,60	<b>&lt;0,001</b>	7,92	1,22 a 24,86	<b>0,041</b>
<i>DNMT3A_RG</i> <sup>mut</sup> vs. <i>DNMT3A_RG</i> <sup>wt</sup>	1,16	0,32 a 4,29	0,82	0,00		0,99
<i>TET2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>TET2</i> <sup>wt</sup>	0,96	0,48 a 1,94	0,91	1,52	0,19 a 13,85	0,69
<i>SF3B1</i> <sup>mut</sup> vs. <i>SF3B1</i> <sup>wt</sup>	1,29	0,49 a 3,34	0,60	1,26	0,03 a 28,23	0,91
<i>SRSF2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>SRSF2</i> <sup>wt</sup>	8,66	1,87 a 24,56	<b>0,006</b>	1,87		0,99
<i>SETBP1</i> <sup>mut</sup> vs. <i>SETBP1</i> <sup>wt</sup>	1,82	0,38 a 8,73	0,46	0,00		0,99
<i>ZRSR2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>ZRSR2</i> <sup>wt</sup>	2,16	0,57 a 8,22	0,26	0,00		0,99
<b>Modelo II</b>						
Clasificación riesgo IPSS-R Intermedio vs. Muy bajo	1,90	1,16 a 3,12	<b>0,011</b>	12,06	1,28 a 21,16	0,43
Intermedio vs. Bajo	1,36	0,84 a 4,23	0,18	14,59	1,28 a 26,15	0,09
Edad, $\geq 75$ vs. $< 75$ años	3,67	1,76 a 7,62	<b>0,001</b>	6,22	0,39 a 33,16	0,19
Sexo	0,61	0,29 a 1,25	0,18	0,21	0,02 a 3,76	0,10
Dependencia transfusional	1,41	0,61 a 3,26	0,42	1,42	0,72 a 4,12	0,84
<i>ETV6</i> <sup>mut</sup> vs. <i>ETV6</i> <sup>wt</sup>	0,59	0,07 a 4,98	0,63	12,87		0,99
<i>EZH2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>EZH2</i> <sup>wt</sup>	7,06	1,87 a 22,42	<b>0,004</b>	16,23	0,77 a 40,25	0,12
<i>JAK2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>JAK2</i> <sup>wt</sup>	0,23	0,05 a 1,14	0,07	0,00		0,98
<i>DNMT3A_MT</i> <sup>mut</sup> vs. <i>DNMT3A_MT</i> <sup>wt</sup>	4,99	2,17 a 11,53	<b>&lt;0,001</b>	9,84	1,13 a 27,73	<b>0,047</b>
<i>DNMT3A_RG</i> <sup>mut</sup> vs. <i>DNMT3A_RG</i> <sup>wt</sup>	0,90	0,25 a 3,29	0,88	0,00		0,99
<i>TET2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>TET2</i> <sup>wt</sup>	0,82	0,40 a 1,66	0,58	2,71	0,16 a 21,83	0,54
<i>SF3B1</i> <sup>mut</sup> vs. <i>SF3B1</i> <sup>wt</sup>	1,65	0,63 a 4,30	0,30	7,48	0,14 a 26,15	0,29
<i>SRSF2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>SRSF2</i> <sup>wt</sup>	10,89	2,80 a 27,42	<b>0,001</b>	0,00		0,99
<i>SETBP1</i> <sup>mut</sup> vs. <i>SETBP1</i> <sup>wt</sup>	1,74	0,33 a 9,12	0,51	0,00		0,99
<i>ZRSR2</i> <sup>mut</sup> vs. <i>ZRSR2</i> <sup>wt</sup>	1,93	0,50 a 7,37	0,34	0,00		0,99

Se realizaron dos análisis multivariantes independientes mediante el modelo de regresión de Cox para la supervivencia y para el riesgo de transformación a LMA. Estos modelos se ajustaron según el IPSS (Modelo I) o el IPSS-R (Modelo II). Las mutaciones genéticas ( $\geq 5$  pacientes) se evaluaron junto con la edad, el sexo, la dependencia transfusional y el IPSS o IPSS-R. Abreviatura: HR, *hazard ratio*, cociente de riesgo.

Por último, se estudió el efecto del incremento del número de mutaciones en la SG y en la t-LMA. Se establecieron 3 rangos para realizar los análisis: 0-1 mutación, 2 mutaciones y  $\geq 3$  mutaciones. Se obtuvo una menor supervivencia en los 2 grupos con mayor número de mutaciones, si bien entre ambos no existieron diferencias en su mediana de supervivencia (mediana, 113 vs. 53 vs. 48 meses, para 0-1 mutación, 2 mutaciones y  $\geq 3$  mutaciones respectivamente,  $P=0,047$ ; **Figura 20A**). Por otro lado, en el análisis del riesgo de t-LMA según el número de mutaciones, no se obtuvieron diferencias significativas (riesgo de t-LMA a 5 años, 0% vs. 3% vs. 8%, para 0-1 mutación, 2 mutaciones y  $\geq 3$  mutaciones respectivamente;  $P=0,26$ ; **Figura 20B**).



**Figura 20.** Curvas de supervivencia global según el número de mutaciones por paciente.

La gráfica A muestra una mayor supervivencia de los pacientes con  $\leq 1$  mutación respecto los pacientes con  $\geq 2$  mutaciones. Las gráfica B muestra un mayor riesgo de transformación leucémica en los pacientes con  $\geq 3$  mutaciones aunque no resulta significativo.

## 5.7. Impacto de las variables clínicas y de las mutaciones en la respuesta a azacitidina

Se suministro el fármaco hipometilante azacitidina a 17 pacientes (14%) de la serie por pérdida de respuesta a los AEE o por evolución de la enfermedad a estadios más agresivos (**Tabla 16**). Ocho pacientes (57%) respondieron positivamente al fármaco en base a los criterios del *IWG* 2006: 2 pacientes (25%) con remisión completa, 4 pacientes (50%) con remisión parcial y 2 pacientes (25%) con estabilización de la enfermedad y mejoría hematológica.

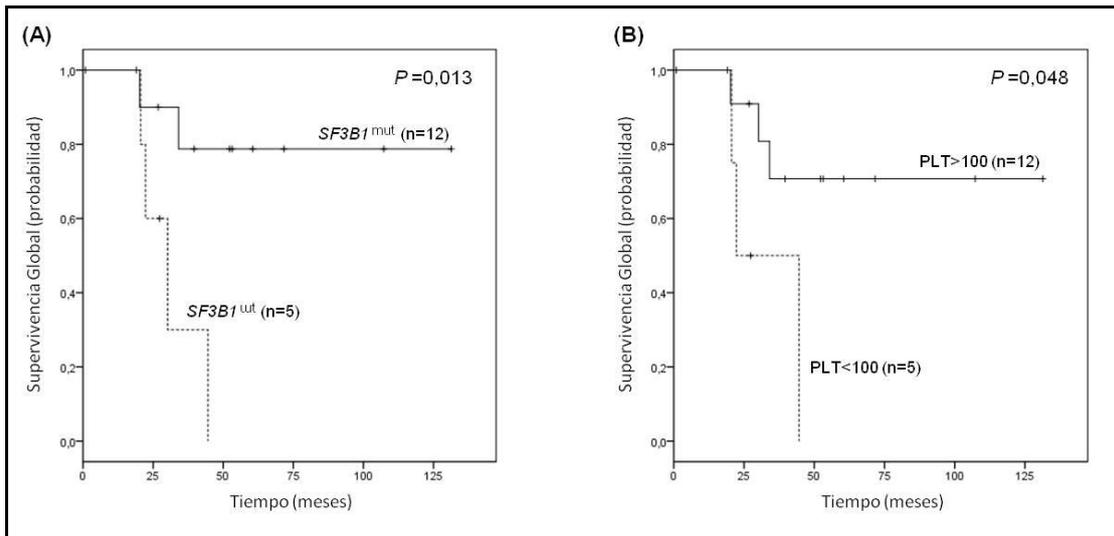
**Tabla 16.** Características de los pacientes tratados con azacitidina.

Paciente	Edad, años	SA (%)	IPSS	IPSS-R	Cariotipo	Mutaciones	Respuesta AZA	t-LMA
SMD-SA_6	38	53	Bajo	Muy bajo	46,XY	<i>SF3B1</i>	No	No
SMD-SA_8	72	36	Bajo	Muy bajo	46,XY	<i>SF3B1, JAK2, SF3A1</i>	Si	No
SMD-SA_42	65	30	Bajo	Muy bajo	46,XY	<i>SF3B1, JAK2</i>	Si	No
SMD-SA_57	75	23	Int-1	Muy bajo	45, X,-Y	<i>SF3B1, TET2</i>	Si	No
SMD-SA_58	82	16	Bajo	Bajo	46,XY	<i>SF3B1, TET2, ZRSR2</i>	Si	No
SMD-SA_59	64	62	Bajo	Bajo	46,XY	<i>SF3B1, DNMT3A, BCOR</i>	No	Si
SMD-SA_61	59	33	Bajo	Bajo	46,XY	<i>SF3B1, CALR</i>	Si	No
SMD-SA_69	68	41	Bajo	Bajo	46,XY	<i>SF3B1</i>	No	No
SMD-SA_71	65	80	Int-1	Int.	46,XX,del(20)	<i>SETBP1</i>	No	No
SMD-SA_81	83	33	Int-1	Bajo	46,XX	<i>SRSF2, STAG2, RUNX1</i>	No	No
SMD-SA_86	73	95	Int-1	Alto	Complejo	<i>TET2, TP53, ZRSR2</i>	No	No
SMD-SA_99	73	33	Bajo	Bajo	46,XX	<i>SF3B1, DNMT3A, TET2</i>	Si	No
SMD-SA_105	75	35	Bajo	Bajo	46,XY	<i>EZH2, TET2, IDH2</i>	No	Si
SMD-SA_109	66	18	Int-1	Bajo	46XY	<i>TET2</i>	Si	No
SMD-SA_110	73	20	Bajo	Bajo	46,XY	<i>SF3B1, TET2, CBL, EZH2</i>	No	No
SMD-SA_116	62	40	Int-1	Int.	46XY	<i>SF3B1</i>	Si	No
SMD-SA_117	55	95	Int-1	Bajo	47,XX,+8	<i>SF3B1, DNMT3A</i>	No	No

SA: sideroblastos en anillo. AZA: azacitidina.

La única variable que se relacionó con la respuesta de los pacientes a la AZA fue el porcentaje de sideroblastos en anillo (SA): los pacientes con menor porcentaje de SA mostraron significativamente una mejor respuesta al fármaco respecto a los pacientes con mayor porcentaje de SA (73% respuestas,  $\leq 40\%$  SA vs. 0% respuestas,  $>40\%$  SA;  $P=0,007$ ). No se asoció ningún perfil mutacional a una mejor o peor respuesta a AZA.

Por otro lado, la existencia de mutaciones en *SF3B1* determinó en los pacientes tratados una mayor SG respecto a los pacientes *SF3B1* no mutados (mediana, 109 vs. 30 meses,  $P=0,013$ ; **Figura 21A**). Respecto a las variables clínicas, los pacientes con un recuento plaquetario más bajo mostraron una menor SG respecto a los pacientes con un nivel normal de plaquetas (mediana, 22 vs. 46 meses,  $P=0,048$ ; **Figura 21B**).



**Figura 21.** Curvas de supervivencia global para los pacientes tratados con azacitidina.

La gráfica A muestra una mayor supervivencia de los pacientes con *SF3B1* mutado respecto los pacientes con *SF3B1* no mutado. La gráfica B muestra una menor supervivencia de los pacientes con un bajo nivel de plaquetas respecto a los pacientes con un nivel de plaquetas normal.

## **6.DISCUSIÓN**



En el presente proyecto de Tesis Doctoral se ha analizado la frecuencia mutacional de 40 genes potencialmente involucrados en la patogénesis de los síndromes mielodisplásicos con sideroblastos en anillo (SMD-SA). Además, se ha analizado la relación de las mutaciones con las características clínico-biológicas, sus implicaciones en el diagnóstico y el pronóstico, así como su posible papel en la respuesta al fármaco hipometilante azacitidina en los pacientes que fueron tratados. Aunque varios estudios habían abordado anteriormente esta patología dentro de grupos más grandes de pacientes con SMD, no había sido lo común hasta el momento centrarse específicamente en este subgrupo de SMD, hecho que ha permitido obtener conclusiones importantes que ayudarán en el futuro al diagnóstico y a su estratificación del pronóstico.

Actualmente la estratificación del pronóstico de los pacientes con SMD se basa en índices como el IPSS-R que únicamente tienen en cuenta las variables clínicas, morfológicas y citogenéticas de los pacientes (Greenberg *et al.*, 2012). En función de ello, muchos de los pacientes con SMD, alrededor del 70%, son considerados de bajo riesgo y reciben terapias más conservadoras como soporte transfusional, AEE, etc. (Bejar *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha observado que un porcentaje de ellos se comportan de forma similar a pacientes con IPSS-R de riesgo medio o alto: presentan menor SG de la esperada o evolucionan con una mayor probabilidad a formas más agresivas de la enfermedad como LMA. Aunque el pronóstico de los pacientes de la serie analizada se ajustó en gran medida a lo determinado por los índices IPSS e IPSS-R, especialmente a éste último pues predijo también al riesgo de t-LMA, hubo un gran número de pacientes que mostraron una SG más corta y un riesgo de t-LMA superior a lo esperado.

A la vista de estos hallazgos y la clara implicación en el pronóstico de determinadas alteraciones moleculares en las distintas patologías hematológicas, se está investigando la posibilidad de implementar en la práctica clínica nuevos índices pronósticos que integren las características moleculares con el fin de determinar de forma más exacta el pronóstico de los pacientes en beneficio de terapias más eficaces y tempranas. Las mutaciones genéticas en las células madre hematopoyéticas alteran su biología de forma que en determinadas ocasiones no se ve reflejada en los parámetros clínicos. Por ello, la determinación del estatus mutacional de genes específicos de la enfermedad sería muy importante para la evaluación y tratamiento de los SMD de bajo riesgo como los SMD-SA.

El proyecto ha sido realizado en una amplia y homogénea cohorte de SMD-SA, representativa de la variabilidad inherente a cualquier patología hematológica. Como la mayoría de los estudios de la literatura, fue retrospectivo y basado en pacientes que fueron tratados con un objetivo común, mejorar las citopenias y la sintomatología, especialmente la anemia, pero con algunas variantes a lo largo del periodo de estudio, como por ejemplo la posibilidad desde 2004 de utilizar azacitidina como opción terapéutica de segunda línea. Quizás la limitación más notable de este proyecto haya sido, tal como sí han realizado estudios más recientes (Patnaik & Tefferi, 2017; Mangaonkar *et al.*, 2018), la no inclusión de casos que presentaran entre el 5-15% de SA conforme a lo indicado por la última clasificación de la OMS de 2016 (Arber *et al.*, 2016). La anterioridad respecto a esta fecha tanto del diseño de la serie como de la realización de su parte experimental justificaría este hecho. Además, aunque estos estudios más recientes sí han incluido a pacientes con este menor rango de sideroblastos, tampoco han obtenido asociado a él ningún perfil mutacional específico. La segunda limitación del presente trabajo reside en el bajo número de eventos de transformación a LMA en la serie que podría limitar el alcance de la asociación de determinadas variables con el riesgo de progresión de la enfermedad. Hay que indicar que el trabajo está centrado en un subgrupo de SMD considerado de bajo riesgo donde de por sí la probabilidad de progresión a LMA es baja (Sanz *et al.*, 1998). De manera similar, los estudios de la literatura que se centran en SMD de bajo riesgo suelen mostrar también un bajo número de transformaciones (Patnaik *et al.*, 2012b; Mangaonkar *et al.*, 2018).

En relación con las características clínicas de la serie, destaca en primer lugar la edad avanzada de la mayoría de los pacientes. Como es sabido los SMD son unas de las neoplasias hematológicas más frecuentes en personas de edad avanzada con una mediana de presentación generalmente superior a los 70 años (Germing *et al.*, 2004). En estos pacientes, la presencia de comorbilidades es muy frecuente, presentando prácticamente la mitad de ellos alguna comorbilidad (Goldberg *et al.*, 2010). De este modo, al analizar las historias clínicas de los pacientes de la serie era común observar previamente al diagnóstico de la enfermedad hematológica la existencia de problemas respiratorios o cardíacos. Otra característica relevante de la serie es la predominancia de una citogenética de buen pronóstico. Así, la gran mayoría de los pacientes integrantes de este estudio presentaban un cariotipo normal o con alguna alteración de buen pronóstico, algo común en esta patología (Cazzola & Invernizzi, 2011). Por último, cabe señalar la alta dependencia transfusional en gran

parte de la serie, debida fundamentalmente a la anemia originada por la eritropoyesis ineficaz inherente a la patología (Malcovati & Cazzola, 2013).

Respecto al proceso técnico de secuenciación de las muestras que componían la serie, la tasa de error fue baja y similar a la de otras plataformas de NGS (Loman *et al.*, 2012). Cabe señalar, que al ser una plataforma basada en la adición individual de los nucleótidos, los errores de secuenciación se concentraron mayoritariamente en la lectura de inserciones y deleciones. Sin embargo, el análisis exhaustivo de todas las variantes en el IGV permitió identificar fácilmente estos errores de secuenciación, eliminar estas variantes del análisis y obtener un informe final de variantes con una calidad óptima.

En el estudio llevado a cabo se encontraron mutaciones somáticas en el 97% de los pacientes. De este modo, excluido en todos los casos el origen secundario de la displasia, las mutaciones junto con las alteraciones citogenéticas explicaron la existencia de hematopoyesis clonal en prácticamente la totalidad de la serie.

Al igual que en estudios previos de la misma patología, las mutaciones en factores de *splicing*, en primer lugar, y en componentes que participan en la metilación, en segundo lugar, fueron las predominantes (Malcovati *et al.*, 2015). El resto de alteraciones genéticas que afectaban a factores transcripción, transductores de señales y supresores tumorales también se encontraban en proporciones similares respecto a anteriores trabajos (Haferlach *et al.*, 2014).

La incidencia de mutaciones de *SF3B1* en nuestra cohorte fue mayor que en otros análisis realizados por NGS (Malcovati *et al.*, 2014; Malcovati *et al.*, 2015). Esto podría deberse a la gran profundidad de secuenciación lograda en algunas regiones del gen *SF3B1* (hasta 5000X), que permitió la detección de variantes incluso a frecuencias alélicas del 3%. Al igual que en otros estudios, los pacientes con mutaciones en *SF3B1* tuvieron un mayor recuento plaquetario que los pacientes *SF3B1* no mutados (Visconte *et al.*, 2012a; Patnaik *et al.*, 2012a; Cazzola *et al.*, 2013a), pero a diferencia de otros trabajos no mostraron un mayor recuento de neutrófilos (Malcovati *et al.*, 2015) o un nivel más bajo de hemoglobina (Damm *et al.*, 2012). Además, los pacientes con *SF3B1* mutado tuvieron una menor frecuencia de anomalías citogenéticas de mal pronóstico respecto los pacientes con *SF3B1* no mutado, hallazgo que es consistente con un comportamiento clínico más benigno de la enfermedad. La presencia de la mutación de *SF3B1* K700E se relacionó con un mayor nivel de sideroblastos en anillo en comparación con otras mutaciones de *SF3B1*. Las mutaciones de *SF3B1* afectan a la expresión del gen *ABCB7* el cual codifica para una

proteína de transporte de hierro mitocondrial (Nickpour *et al.*, 2013). Es probable que las diferentes mutaciones de *SF3B1* afecten en distinto grado a la expresión de *ABCB7* y, por lo tanto, generen un fenotipo con más o menos sideroblastos en anillo. En línea con esto, diversos estudios han demostrado que las distintas mutaciones de *SF3B1* modifican en puntos diferentes las interacciones del factor SF3B1 con el componente del espliceosoma U2AF65, factor crucial en la estructura terciaria del complejo, afectando en diferente medida a la estabilización del espliceosoma y en consecuencia al grado de *splicing* defectuoso (Cretu *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016). Finalmente, en los análisis de supervivencia, las mutaciones de *SF3B1* solo influyeron favorablemente en la SG de los pacientes con displasia unilínea. Aunque en gran parte de los estudios previos, los casos de SMD-SA que portan mutaciones de *SF3B1* parecen tener un pronóstico más favorable respecto a aquellos sin mutaciones de éste gen, el papel de la displasia multilínea en los pacientes *SF3B1* mutados sigue siendo controvertido (Patnaik *et al.*, 2012a; Malcovati *et al.*, 2015). De hecho, hubo una correlación positiva entre los SMD-SA-DM y la presencia de un mayor número de mutaciones, hallazgo que contrarrestaría el posible efecto benigno de la mutación de *SF3B1* e influiría negativamente en el pronóstico del paciente (Bejar, 2013).

La frecuencia en la cohorte estudiada de las mutaciones en otros genes de *splicing*, como *SRSF2* y *ZRSR2* fue similar a la de estudios anteriores (Bejar *et al.*, 2012; Papaemmanuil *et al.*, 2013). Las mutaciones de *SRSF2* se encontraron predominantemente en pacientes *SF3B1* no mutados, hecho que sugeriría su posible papel redundante en la patogénesis de la enfermedad (Kennedy & Ebert, 2017). La presencia de mutaciones en *SRSF2* confirió un pronóstico más adverso: alta dependencia transfusional, recuento plaquetario bajo y supervivencia más corta. Es de destacar que la mediana de SG de los pacientes con *SRSF2* mutado fue de 17 meses, muy cercana a la SG observada en pacientes con IPSS-R de alto riesgo (Greenberg *et al.*, 2012). Diversos estudios han observado una relación directa de las mutaciones de *SRSF2* con el *splicing* aberrante de *EZH2* (Kim *et al.*, 2015; Shiozawa *et al.*, 2018), gen cuyas alteraciones se han asociado en neoplasias mieloides a mal pronóstico (Ernst *et al.*, 2010; Bejar *et al.*, 2012). Respecto a *ZRSR2*, gen localizado en el cromosoma X, en consonancia con la bibliografía, las mutaciones fueron más frecuentes en hombres que en mujeres y además en 3 de ellos, por truncar prematuramente la proteína, ocasionarían la pérdida completa de su función por no tener otra copia con el alelo salvaje (Bejar *et al.*, 2016).

Por otro lado, es necesario destacar el alto porcentaje en la serie de mutaciones en genes de metilación: *TET2*, *DNMT3A* e *IDH1/2*. Gran parte de los

estudios en SMD-SA muestran que, en aproximadamente un tercio de los pacientes, las mutaciones de *SF3B1* coexisten con mutaciones en genes de metilación, fundamentalmente *TET2* y *DNMT3A* (Cazzola *et al.*, 2013b; Papaemmanuil *et al.*, 2013; Malcovati *et al.*, 2015). Estas mutaciones en factores epigenéticos se piensa que contribuirían a conferir una ventaja proliferativa a la célula *SF3B1* mutada que favorecerían su expansión clonal (Malcovati & Cazzola, 2013).

Las mutaciones de *TET2* no influyeron significativamente en la SG o en la probabilidad de t-AML, apoyando las observaciones realizadas en estudios previos (Langemeijer *et al.*, 2009; Bejar *et al.*, 2011). Sin embargo, sí que resultó relevante que los pacientes con mutaciones en *TET2* mostraran significativamente un mayor número de otras mutaciones respecto a los pacientes *TET2* no mutados. Actualmente las mutaciones de *TET2* son consideradas como impulsoras de “hematopoyesis clonal de potencial indeterminado” (CHIP) y se piensa que facilitan un entorno permisivo para posteriores alteraciones genéticas (Smith *et al.*, 2010; Genovese *et al.*, 2014; Steensma *et al.*, 2015).

El otro gen de metilación del ADN que fue detectado mutado en la serie con alta frecuencia fue *DNMT3A*. La mayoría de alteraciones encontradas en este gen habían sido descritas como recurrentes en los SMD y la LMA (Ley *et al.*, 2010; Thol *et al.*, 2011a; Thol *et al.*, 2011b; Hou *et al.*, 2012; Renneville *et al.*, 2012). Los pacientes con mutaciones en *DNMT3A* mostraron una peor evolución clínica con una mayor dependencia transfusional respecto a los pacientes *DNMT3A* no mutados. Además, cuando se consideraron las mutaciones de *DNMT3A* según el dominio funcional de la proteína donde se localizaban, se observaron diferencias importantes. En el dominio regulador, se produjeron predominantemente mutaciones *frameshift* y *nonsense* que provocarían pérdida de función en la proteína, no exhibiendo cambios significativos en la metilación del ADN (Walter *et al.*, 2011). Así, estas mutaciones del dominio regulador no influyeron en la SG o en la t-LMA. De manera opuesta, en el dominio metiltransferasa del gen, se encontraron especialmente mutaciones de naturaleza *missense* que implicaban a residuos altamente conservados, sugiriendo, conforme a estudios previos, que no corresponderían a simples mutaciones de pérdida de función sino que podrían conferir una función proteica distinta (Im *et al.*, 2014). Diversos trabajos, basados especialmente en las mutaciones *hotspot* del codón R882, han demostrado profundas pérdidas de la actividad metiltransferasa *de novo* de *DNMT3A* como resultado de los efectos negativos dominantes de las alteraciones *missense*. La proteína mutada *DNMT3A* interaccionaría con las proteínas no mutadas *DNMT3A* y *DNMT3L* para formar complejos más deficientes funcionalmente que cambiarían los

patrones de metilación normales de la célula (Yan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Russler-Germain *et al.*, 2014). La presencia de mutaciones en el dominio funcional de *DNMT3A* determinó tanto en el análisis univariante como en el multivariante, un resultado clínico más adverso con una SG más corta y un mayor riesgo de t-LMA. En consecuencia, parece que estas mutaciones del dominio funcional estarían involucradas en la progresión de la enfermedad, confiriendo a los clones portadores ventajas en su proliferación y diferenciación sobre otros clones (Thol *et al.*, 2011b; Walter *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Murati *et al.*, 2012).

Respecto a los genes mutados con menor frecuencia, es necesario comentar en primer lugar las mutaciones de *JAK2* por sus posibles implicaciones diagnósticas. En 2016, la última revisión de la OMS de las neoplasias hematológicas, estableció como entidad definitiva los síndromes mielodisplásicos/neoplasias mieloproliferativas con sideroblastos en anillo y trombocitosis (SMD/NMP-SA-T). Los criterios que definen esta entidad incluyen la existencia de trombocitosis ( $>450 \times 10^9$  plaquetas/L) asociada con anemia refractaria,  $>15\%$  de sideroblastos en anillo y megacariocitos de características similares a los de la mielofibrosis primaria o trombocitemia esencial (Arber *et al.*, 2016). Además, se observó que los genes más frecuentemente mutados en esta entidad eran *SF3B1* y *JAK2*, asociados al fenotipo característico de sideroblastos en anillo y trombocitosis respectivamente (Jeromin *et al.*, 2015; Patnaik *et al.*, 2016; Patnaik *et al.*, 2017). En base a estos precedentes, se observa en nuestra serie que 8 pacientes estaban mutados para *SF3B1* y *JAK2*, tenían un nivel de SA  $>15\%$ , megacariocitos similares a los de las NMP pero el nivel de plaquetas solo era superior al establecido por la OMS para definir los SMD/NMP-SA-T en 4 de ellos. Por tanto, de manera estricta solo estos 4 pacientes podrían ser considerados como SMD/NMP-SA-T. Al igual que en su momento se disminuyó el recuento mínimo plaquetario que definía la trombocitosis, de 600 a  $450 \times 10^9$  plaquetas/L (Swerdlow *et al.*, 2008; Malcovati *et al.*, 2009; Arber *et al.*, 2016), este trabajo plantearía el debate acerca de la posibilidad de disminuir nuevamente este mínimo, quizás a  $400 \times 10^9$  plaquetas/L, para poder incluir en esta entidad un mayor número de casos con características más próximas a ella que a los SMD-SA, aspecto que sería muy relevante para la prevención del riesgo trombótico. También se observó en estos pacientes que la frecuencia alélica de la mutación *JAK2* era, excepto en un caso sin trombocitosis y con una mutación *JAK2* atípica, inferior a la frecuencia alélica de *SF3B1*. Este hecho reforzaría la idea que los los SMD/NMP-SA-T se desarrollarían a partir de un SMD-SA mutado para *SF3B1* tras la adquisición a nivel subclonal de

mutaciones en *JAK2* y con menor frecuencia de *CALR* y *MPL* (Malcovati & Cazzola, 2013; Broséus *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2014).

Otros genes con menor frecuencia pero con importancia en las características clínicas de los pacientes fueron *SETBP1*, *ETV6* y *EZH2*. El gen *SETBP1* desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación celular y, como en anteriores estudios de neoplasias mieloides, sus mutaciones se asociaron a un perfil clínico más adverso con un menor recuento plaquetario (Meggendorfer *et al.*, 2013). El gen *ETV6* es un factor de transcripción crítico para el mantenimiento de los progenitores hematológicos cuyas mutaciones mostraron frecuencias bajas (origen subclonal) y se asociaron a monocitosis y a una edad más avanzada al igual que en trabajos previos (Padrón *et al.*, 2014; Hock & Shimamura, 2017). Las mutaciones del gen *EZH2*, componente clave del complejo *Polycomb* que actúa en la metilación de histonas e interviene en la diferenciación celular, determinaron como en otros análisis un resultado clínico más adverso (Bejar *et al.*, 2012). Todos los pacientes con mutaciones en *EZH2* tuvieron dependencia transfusional y mostraron una mediana de SG de 30 meses, cercana a la SG observada en pacientes de riesgo intermedio del IPSS-R (Greenberg *et al.*, 2012).

Por último, respecto al resto de genes mutados de forma minoritaria, la mayoría correspondían a genes de señalización celular. Estas mutaciones presentaron en general frecuencias menores a las de *SF3B1* y serían la consecuencia de la emergencia de subclones minoritarios que influirían en la progresión de la enfermedad a estadios probablemente más displásicos e incluso cooperando con el tiempo a su evolución leucémica (Stosch *et al.*, 2018).

Además del impacto pronóstico individual de cada gen, se estudió también el efecto pronóstico en función del número de genes mutados. De manera similar al incremento de alteraciones citogenéticas, el incremento en mutaciones somáticas determinó como en otros trabajos una supervivencia más corta (Papaemmanuil *et al.*, 2013; Bejar *et al.*, 2014b). No se obtuvo sin embargo una asociación entre la carga mutacional y el riesgo de t-LMA, probablemente por el bajo número de transformaciones al centrarse el estudio en un subgrupo de SMD definido como de bajo riesgo.

Finalmente se analizó la respuesta a la AZA en los pacientes de la serie que fueron tratados. Aproximadamente la mitad de los pacientes respondieron positivamente al fármaco, valor similar al descrito en la bibliografía (Fenaux *et al.*, 2009; Shapiro & Lazo-Langner, 2018). La única variable que se relacionó con la

respuesta de los pacientes a la AZA fue el nivel de sideroblastos en anillo (SA), presentando los pacientes con menor porcentaje de SA una mejor respuesta al fármaco. La presencia de un mayor porcentaje de SA sería indicativa de una mayor displasia en la serie roja y en consecuencia de un estadio más avanzado de la enfermedad. De esta manera la AZA sería más eficaz en estadios más precoces de la patología.

No se observó ningún perfil mutacional asociado a una mejor respuesta a la AZA. Siete pacientes tratados con AZA presentaban mutaciones en *TET2*, gen asociado con mayor evidencia a una mejor respuesta al fármaco (Itzikson *et al.*, 2011; Bejar *et al.*, 2014b; Traina *et al.*, 2014). La co-ocurrencia en algunos pacientes de las mutaciones en *TET2* con otras de pronóstico adverso como *EZH2* y *TP53* podría explicar esta falta de respuesta. Además, estudios más recientes han demostrado la invariabilidad de los clones *TET2* después del tratamiento con agentes hipometilantes, incluso tras de dos años de terapia continuada (Merlevede *et al.*, 2016; Unnikrishnan *et al.*, 2017).

Las dos variables que influyeron positivamente en la supervivencia de los pacientes tratados con AZA fueron la presencia de mutaciones en *SF3B1* y un nivel mayor de plaquetas previo al tratamiento. El efecto positivo de las mutaciones de *SF3B1* reforzaría su valor benigno en la enfermedad y sería consistente con el resultado obtenido para estas mutaciones en algunos estudios con pacientes tratados con agentes hipometilantes (Montalban-Bravo *et al.*, 2018). Respecto al valor de plaquetas, existe bastante evidencia que sostiene la duplicación del nivel plaquetas tras tratamiento de AZA o DEC como un indicativo de respuesta positiva al fármaco (van der Helm *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2015). Aunque no ha podido estudiarse la dinámica plaquetar tras tratamiento con AZA por ser muestras históricas y carecer en gran parte de ellas de datos de seguimiento, es probable que la respuesta plaquetar tras AZA fuera mayor en los pacientes con valores no comprometidos de plaquetas y de ahí el efecto positivo en su supervivencia.

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva están permitiendo estudiar el genoma completo de los pacientes, ampliando, rápidamente, los conocimientos moleculares de los SMD. Aunque la identificación de nuevas alteraciones moleculares es de importancia clínica y biológica, el auténtico reto es integrar este conocimiento en la práctica clínica diaria. La secuenciación del genoma completo, pasará a formar parte de la evaluación diagnóstica estándar en los próximos años, sin embargo, en la actualidad, es necesario que en los laboratorios de diagnóstico, se desarrollen

estrategias que permitan aplicar estos conocimientos, disminuyendo los costes y el tiempo necesario para obtener un resultado, sin perder sensibilidad ni especificidad. Como consecuencia, en la presente Tesis Doctoral, hemos demostrado que la aplicación en el momento del diagnóstico de un SMD de un panel NGS con un número razonable de genes, es de gran utilidad en su diagnóstico y en la estimación de su pronóstico.

La estratificación del riesgo sigue siendo el paso esencial antes de tomar decisiones sobre el tratamiento de un SMD. Sin embargo, los comportamientos clínicos difieren en ocasiones de los esperados según los índices IPSS e IPSS-R. En particular, las mutaciones somáticas en genes como *SF3B1*, *SRSF2*, *EZH2* y *DNMT3A* en su dominio funcional, pueden predecir la supervivencia global y la progresión de los SMD-SA independientemente de los índices pronósticos. De este modo, nuestros hallazgos refuerzan el valor de los datos genéticos en el pronóstico e incluso en la respuesta a los tratamientos de los pacientes con SMD-SA, pudiendo en el futuro complementar a las variables clínicas en el desarrollo de nuevos índices que se aproximen en mayor medida al pronóstico real de los pacientes.



## **7.CONCLUSIONES**



1. Los genes más frecuentemente mutados en la serie de SMD-SA estudiada fueron: *SF3B1* (87%), *TET2* (31%), *DNMT3A* (17%), *JAK2* (7%), *SRSF2* (5%) y *SETBP1* (5%).
2. Las mutaciones en *SF3B1* se asociaron con cariotipos más benignos y, junto las mutaciones de *JAK2*, determinaron un mayor recuento plaquetario. Por el contrario, las mutaciones de *SRSF2* y *SETBP1* mostraron una co-ocurrencia negativa respecto las mutaciones de *SF3B1* y se asociaron con un menor nivel de plaquetas.
3. Las mutaciones en *SRSF2* y *DNMT3A* se asociaron con una mayor dependencia transfusional al momento del diagnóstico.
4. Las mutaciones en *TET2* fueron más frecuentes en los SMD-SA-DM que en los SMD-SA-DU, y además los pacientes *TET2* mutados mostraron un mayor número de mutaciones que los no mutados.
5. Las mutaciones en *SF3B1* determinaron mayor SG en los pacientes con displasia unilínea, mientras que las mutaciones de *SRSF2*, *EZH2* y *DNMT3A\_MT* tuvieron un impacto pronóstico negativo en la SG y además las mutaciones *DNMT3A\_MT* se asociaron con una mayor probabilidad de t-LMA.
6. Gran parte de las mutaciones que se asociaron con mal pronóstico se presentaron en pacientes con IPSS e IPSS-R de riesgo bajo. Es necesario el desarrollo de nuevos índices pronósticos que integren el perfil mutacional con el fin de aproximarse en mayor medida al pronóstico real de los pacientes.
7. La única variable asociada con una mejor respuesta a la AZA fue la presencia de un menor porcentaje de SA. Las mutaciones de *SF3B1* y un mayor nivel de plaquetas previo al tratamiento se asociaron con una mayor SG de los pacientes tratados.
8. Las técnicas NGS son de gran utilidad en el diagnóstico y en la estimación del pronóstico de los SMD. El uso de un panel de genes como el de este proyecto aportaría una importante información sobre la evolución esperada de la enfermedad.
9. Como cualquier tecnología, la NGS tiene algunos inconvenientes, como la obtención en un bajo porcentaje de falsos positivos. Es necesario el análisis de los resultados obtenidos por NGS por personal especializado y correctamente formado que sea capaz de emitir informes veraces y de fácil interpretación con alta utilidad clínica.



## **8.BIBLIOGRAFÍA**



**A**

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127:2391-2405.

**B**

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.

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; 30:3376-3382.

Bejar R. Prognostic models in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013; 2013:504-510.

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*. 2014a; 32:2691-2698.

Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2014b; 99:956-964.

Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014c; 124:2705-2712.

Bejar R. Splicing Factor Mutations in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 907:215-228.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982; 51:189-199.

Bonnal S, Vignani L, Valcárcel J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11:847-859.

Broséus J, Lippert E, Harutyunyan AS, Jeromin S, Zipperer E, Florensa L, et al. Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2014; 28:1374-1376.

**C**

Cazzola M, Invernizzi R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. *Haematologica*. 2011; 96:789-792.

Cazzola M, Rossi M, Malcovati L; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013a; 121:260-269.

Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 2013b; 122:4021-4034.

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012; 2:401-404.

Chang CK, Zhao YS, Xu F, Guo J, Zhang Z, He Q, et al. TP53 mutations predict decitabine-induced complete responses in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2017; 176:600-608.

Chesnais V, Kosmider O, Damm F, Itzykson R, Bernard OA, Solary E, et al. Spliceosome mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget*. 2012; 3:1284-1293.

Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006; 108:419-425.

Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc B* 1972; 34:187-220

---

Cretu C, Schmitzová J, Ponce-Salvatierra A, Dybkov O, De Laurentiis EI, Sharma K, et al. Molecular Architecture of SF3b and Structural Consequences of Its Cancer-Related Mutations. *Mol Cell*. 2016; 64:307-319.

**D**

Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 119:3211-3218.

Desoutter J, Gay J, Berthon C, Ades L, Gruson B, Geffroy S, et al. Molecular prognostic factors in acute myeloid leukemia receiving first-line therapy with azacitidine. *Leukemia*. 2016; 30:1416-1418.

**E**

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; 42:722-726.

**F**

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009; 10:223-232.

**G**

Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, Slobodeniuc V, O'Hanlon D, Sung HK, et al. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell*. 2011; 147:132-146.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013; 6:p11.

- García R, de Miguel D, Bargay J. Effectiveness of various dosage regimens of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes: Safety and efficacy final data from the Spanish azacitidine compassionate use registry. *ASH Annual Meeting Abstracts. Blood.* 2010; 116:1853.
- Gelsi-Boyer V, Cervera N, Bertucci F, Brecqueville M, Finetti P, Murati A, et al. Molecular similarity between myelodysplastic form of chronic myelomonocytic leukemia and refractory anemia with ring sideroblasts. *Haematologica.* 2013; 98:576-583.
- Genovese G, Köhler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl Med.* 2014; 371:2477–2487.
- Germing U, Strupp C, Kündgen A, Bowen D, Aul C, Haas R, Gattermann N. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2004; 89:905-910.
- Goldberg SL, Chen E, Corral M, Guo A, Mody-Patel N, Pecora AL, et al. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol.* 2010; 28:2847-2852.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016; 17:333-351.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997; 89:2079-2088.
- Greenberg P, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012; 120:2454-2465.
- Grimm DG, Azencott CA, Aicheler F, Gieraths U, MacArthur DG, Samocha KE, et al. The evaluation of tools used to predict the impact of missense variants is hindered by two types of circularity. *Hum Mutat.* 2015; 36:513-523.

---

**H**

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.

Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, et al. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia*. 2009; 23:1605-1613.

Hock H, Shimamura A. ETV6 in hematopoiesis and leukemia predisposition. *Semin Hematol*. 2017; 54:98-104.

Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Chou WC, Lee MC, Chen CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012; 119:559-568.

Hou HA, Kuo YY, Chou WC, Chen PH, Tien HF. Calreticulin mutation was rarely detected in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2014; 28:1555-1557.

**I**

Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, Boyiadzis M. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia*. 2014; 28:1774-1783.

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; 25:1147-1152.

Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014; 28:497-506.

**J**

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press; Lyon, France; 2001.

Jeromin S, Haferlach T, Weissmann S, Meggendorfer M, Eder C, Nadarajah N, et al. Refractory anemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis cases harbor mutations in SF3B1 or other spliceosome genes accompanied by JAK2V617F and ASXL1 mutations. *Haematologica*. 2015; 100:e125-e127.

Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users. *Genet Med*. 2014; 16:497-503.

Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009; 113:1315-1325.

Jung SH, Kim YJ, Yim SH, Kim HJ, Kwon YR, Hur EH, et al. Somatic mutations predict outcomes of hypomethylating therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*. 2016; 7:55264-55275.

Jung HA, Maeng CH, Kim M, Kim S, Jung CW, Jang JH. Platelet response during the second cycle of decitabine treatment predicts response and survival for myelodysplastic syndrome patients. *Oncotarget*. 2015; 6:16653-16662.

**K**

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958; 53:457-481.

Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E. *Williams Hematology*. China: The McGraw-Hill Companies, 2010.

Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017; 35:968-974.

Kim SJ, Zhao H, Hardikar S, Singh AK, Goodell MA, Chen T. A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. *Blood*. 2013; 122:4086-4089.

Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC, Ramakrishnan A, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*. 2015; 27:617-630.

Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013; 369:2379-2390.

## L

Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009; 41:838-842.

Lee WM and Dang CV. Control of cell division. In *Hematology: basic principles and practice*. Philadelphia: Elsevier, 2008.

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; 363:2424-2433.

Lin J, Yao DM, Qian J, Chen Q, Qian W, Li Y, et al. Recurrent DNMT3A R882 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *PLoS One*. 2011; 6:e26906.

Loman NJ, Misra R V, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012; 30:434-439.

## M

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; 119:3203-3210.

- Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Gallì A, et al. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood*. 2009; 114:3538-3545.
- Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulton J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011; 118:6239-6246.
- Malcovati L, Cazzola M. Refractory anemia with ring sideroblasts. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013; 26:377-385.
- Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Gallì A, Della Porta MG, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood*. 2014; 124:1513-1521.
- 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; 126:233-241.
- Mangaonkar AA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Al-Kali A, Elliott MA, et al. Prognostic interaction between bone marrow morphology and SF3B1 and ASXL1 mutations in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Blood Cancer J*. 2018; 8:18.
- Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*. 1966; 50:163-170.
- Meggendorfer M, Bacher U, Alpermann T, Haferlach C, Kern W, Gambacorti-Passerini C, et al. SETBP1 mutations occur in 9% of MDS/MPN and in 4% of MPN cases and are strongly associated with atypical CML, monosomy 7, isochromosome i(17)(q10), ASXL1 and CBL mutations. *Leukemia*. 2013; 27:1852-1860.
- Merlevede J, Droin N, Qin T, Meldi K, Yoshida K, Morabito M, et al. Mutation allele burden remains unchanged in chronic myelomonocytic leukaemia responding to hypomethylating agents. *Nat Commun*. 2016; 7:10767.

- Metcalf D. On hematopoietic stem cell fate. *Immunity*. 2007; 26:669-673.
- Montalban-Bravo G, Takahashi K, Patel K, Wang F, Xingzhi S, Nogueras GM, et al. Impact of the number of mutations in survival and response outcomes to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget*. 2018; 9:9714-9727.
- Morel P, Hebbbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, et al. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*. 1993; 7:1315-1323.
- Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer*. 2012; 12:304.

**N**

- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013; 369:2391-2405.
- Nicpon E. *Human anatomy & physiology*. Serie: Pearson Education Book. EEUU, San Francisco: Benjamin Cummings, 2001.
- Nikpour M, Scharenberg C, Liu A, Conte S, Karimi M, Mortera-Blanco T, et al. The transporter ABCB7 is a mediator of the phenotype of acquired refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2013; 27:889-896.

**P**

- Palomo L, Ibáñez M, Tazón-Vega B, Vázquez I, Benito R, Rapado I, et al. Plataformas y criterios mínimos. En: *Guía de aplicación clínica de la secuenciación masiva en los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica*. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos. España, Marketing Farmacéutico & Investigación Clínica, 2017.

- Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011; 365:1384-1495.
- 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; 123:3675-3677.
- 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; 122:3616-3627.
- 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*. 2012a; 119:569-572.
- Patnaik MM, Hanson CA, Sulai NH, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, et al. Prognostic irrelevance of ring sideroblast percentage in World Health Organization-defined myelodysplastic syndromes without excess blasts. *Blood*. 2012b; 119:5674-5677.
- Patnaik MM, Belachew A, Finke C, Lasho TL, Hanson CA, Tefferi A. CALR mutations are infrequent in WHO-defined refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2014; 28:1370-1371.
- Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, King RL, Ketterling RP, et al. Predictors of survival in refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T) and the role of next-generation sequencing. *Am J Hematol*. 2016; 91:492-498.
- Patnaik MM, Tefferi A. Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) and RARS with thrombocytosis (RARS-T): 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017; 92:297-310.
- Perkins SL. Examination of the Blood and Bone Marrow. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

**Q**

Quesada V, Ramsay AJ, Lopez-Otin C. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *N Engl J Med.* 2012; 366:2530.

**R**

Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, et al. The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer Cell.* 2014; 25:442-454.

Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia.* 2012; 26:1247-1254.

**S**

Sanz GF, Sanz MA, Greenberg PL. Prognostic factors and scoring systems in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 1998; 83:358-368.

Sanz G, Florensa L, Bonanad S, Valcárcel D, Xicoy B, Solé F, et al. Grupo Español Síndromes Mielodisplásicos. Guía española de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. *Haematologica.* 2012; 97:11-14.

Sanz G, Solé F, Vallespí T, Benavente C, Cervera J, Díez-Campelo M, et al. Estratificación pronóstica de los síndromes mielodisplásicos. En: Guía española de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. *Haematologica.* 2012b; 97:11-14.

Schoemans H and Verfaillie C. Cellular biology of Hematopoiesis. In *Hematology: basic principles and practice.* Filadelfia: Elsevier, 2008.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971; 2:971-972.

Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, editors. *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013).* Karger Publishers. 2013.

- Shapiro RM, Lazo-Langner A. Systematic review of azacitidine regimens in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *BMC Hematol.* 2018; 18:3.
- Shiozawa Y, Malcovati L, Gallì A, Sato-Otsubo A, Kataoka K, Sato Y, et al. Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia. *Nat Commun.* 2018; 9:3649.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002; 20:2429-2440.
- Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood.* 2010; 116:3923-3932.
- Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015; 126:9-16.
- Stosch JM, Heumüller A, Niemöller C, Bleul S, Rothenberg-Thurley M, Riba J, et al. Gene mutations and clonal architecture in myelodysplastic syndromes and changes upon progression to acute myeloid leukaemia and under treatment. *Br J Haematol.* 2018; 182:830-842.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.

## T

- Tang Q, Rodriguez-Santiago S, Wang J, Pu J, Yuste A, Gupta V, et al. SF3B1/Hsh155 HEAT motif mutations affect interaction with the spliceosomal ATPase Prp5, resulting in altered branch site selectivity in pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 2016; 30:2710-2723.

- Takahashi K, Patel K, Bueso-Ramos C, Zhang J, Gumbs C, Jabbour E, et al. Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget*. 2016; 7:14172-14187.
- Thol F, Damm F, Lüdeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, et al. Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2011a; 29:2889-2896.
- Thol F, Winschel C, Lüdeking A, Yun H, Friesen I, Damm F, et al. Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2011b; 96:1870-1873.
- Thol F, Kade S, Schlarman 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; 119:3578-3584.
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013; 14:178-192.
- Tobiasson M, McLornan DP, Karimi M, Dimitriou M, Jansson M, Ben Azenkoud A, et al. Mutations in histone modulators are associated with prolonged survival during azacitidine therapy. *Oncotarget*. 2016; 7:22103-22115.
- Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarroki 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.

**U**

- Unnikrishnan A, Papaemmanuil E, Beck D, Deshpande NP, Verma A, Kumari A, et al. Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes. *Cell Rep*. 2017; 20:572-585.

**V**

- Valcárcel D, Bonanad S, García R, Remacha A, Bernal T, Arrizabalaga B, et al. Tratamiento de los síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo. En: Guía española de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. *Haematologica*. 2012; 97:27-32.
- Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. 2007; 31:727-736.
- van der Helm LH, Alhan C, Wijermans PW, van Marwijk Kooy M, Schaafsma R, Biemond BJ, et al. Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) and acute myeloid leukaemia (AML) patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. *Br J Haematol*. 2011; 155:599-606.
- Visconte V, Makishima H, Jankowska A, Szpurka H, Traina F, Jerez A, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2012a; 26:542-555.
- Visconte V, Rogers HJ, Singh J, Barnard J, Bupathi M, Traina F, et al. SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012b; 120:3173-3186.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339:1546-1558.

**W**

- Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011; 25:1153-1158.
- Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013; 121:4627-4634.

Webb TR, Joyner AS, Potter PM. The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer. *Drug Discov Today*. 2013; 18:43-49.

Woessner S y Florensa L. *La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. Madrid: Acción Médica. 2006.

## Y

Yan XJ, Xu J, Gu Z.H, Pan CM, Lu G, Shen Y, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nature Genetics*. 2011; 43:309-315.

Yoshida K, Sanada M, Shiraishi, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011; 478:64-69.



## **9.PROYECCIÓN CIENTÍFICA**



## Comunicaciones a Congresos:

- Parte de los resultados de este trabajo fueron aceptados para su comunicación oral en el LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia celebrado en Madrid del 6 al 8 de Noviembre de 2014.



Certificamos que la comunicación titulada

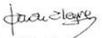
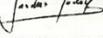
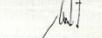
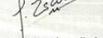
**Incidencia y valor pronóstico de las mutaciones en los genes SF3B1, DNMT3A y CALR en la anemia refractaria con sideroblastos anillados (ARSA).**

ha sido aceptada como **ORAL** por los autores:

MARTIN IVAN; GIMENEZ ANGEL; VICENTE ANA; SUCH ESPERANZA; LOPEZ-PAVIA MARIA; LUNA IRENE; IBAÑEZ MARIAM; VILLAMÓN EVA; GOMEZ-SEGUI INES; ALONSO CARMEN MARIA; PICARD AMPARO; COMPANY DESIRE; OLTRA JUAN SILVESTRE; SENENT LEONOR; ANDREU RAFAEL; SANZ MIGUEL ANGEL; CERVERA JOSE; SANZ GUILLERMO

en el transcurso del **LVI Congreso Nacional de la SEHH – XXX Congreso Nacional de la SETH** celebrado en el Palacio Municipal de Congresos del 6 al 8 de noviembre de 2014

Madrid, 8 de Noviembre de 2014

 <b>Dr. Adrián Alegre Amor</b> <small>Presidente del Comité Organizador LVI Congreso Nacional de la SEHH y XXX Congreso Nacional de la SETH</small>	 <b>Dra. Pilar Llamas Sillero</b> <small>Vicepresidenta del Comité Organizador LVI Congreso Nacional de la SEHH y XXX Congreso Nacional de la SETH</small>	 <b>Dr. Pedro Sánchez Godoy</b> <small>Vicepresidente del Comité Organizador LVI Congreso Nacional SEHH y XXX Congreso Nacional SETH</small>	 <b>Dr. Carlos Solano Vercet</b> <small>Presidente del Comité Científico LVI Congreso Nacional de la SEHH y XXX Congreso Nacional de la SETH</small>	 <b>Dr. Gines Escolar Albaladejo</b> <small>Vicepresidente del Comité Científico LVI Congreso Nacional SEHH y XXX Congreso Nacional SETH</small>
---	--	--	---	--

- Parte de los resultados de este trabajo fueron aceptados para su comunicación en formato de póster en el *13th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes* celebrado en Washington (EEUU) del 29 de Abril al 2 de Mayo de 2015.



Leukemia Research

Volume 39, Supplement 1, April 2015, Page S154



Poster Presentations

## 309 FREQUENCY AND PROGNOSTIC IMPACT OF SF3B1 AND DNMT3A MUTATIONS IN REFRACTORY ANEMIA WITH RING SIDEROBLASTS (RARS)

I. Martín, E. Such, A. Vicente, B. Navarro, M. López-Pavía, M. Gómez, M. Ibáñez, M. Tormo, S. Oltra, J. Cervera, G. Sanz

[Show more](#)

[https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(15\)30310-6](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(15)30310-6)

[Get rights and content](#)

**Artículos científicos:**

Se derivaron dos publicaciones científicas de los resultados del presente proyecto:

- Martín I, Such E, Navarro B, Vicente A, López-Pavía M, Ibáñez M, Tormo M, Villamón E, Gómez-Seguí I, Luna I, Oltra S, Pedrola L, Sanz MA, Cervera J, Sanz G. Negative impact on clinical outcome of the mutational co-occurrence of SF3B1 and DNMT3A in refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Leuk Lymphoma*. 2017; 58:1686-1693.

- Martín I, Such E, Navarro B, Villamón E, Vicente A, Mora E, Pedrola L, Ibáñez M, López-Pavía M, Tormo M, Serrano A, Sanz MÁ, Cervera J, Sanz G. Prognostic impact of gene mutations in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Blood Cancer J*. 2017; 7:630.

## **10. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS**



- 1.- Análisis del efecto de las mutaciones en la respuesta al fármaco hipometilante azacitidina en una serie amplia de pacientes con SMD → **estudio activo**.
- 2.- Caracterización molecular con un panel de exoma de los pacientes de la serie no mutados en los genes de *splicing* del panel para identificar alteraciones en nuevos genes no relacionados hasta el momento con la enfermedad.
- 3.- Análisis de muestras consecutivas de pacientes con SMD/NMP-SA-T para estudiar la dinámica mutacional de *SF3B1* y *JAK2* en relación con los niveles de sideroblastos en anillo, plaquetas y otras características clínicas.

