



VNiVERSiDAD
DSALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS CON ALTERACIONES EN EL CROMOSOMA 7

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
MYELODYSPLASTIC SYNDROMES WITH
CHROMOSOME 7 ABNORMALITIES

GRADO EN MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
2022

Alumna: Marta Cacho Dueñas
Tutor: José Ramón González Porras
Cotutora: María Abáigar Alvarado

AGRADECIMIENTOS

A todas las chicas del laboratorio del I+D+i, especialmente a María, Rocío y Marta.
Gracias por vuestra inestimable ayuda, calidez y acogida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS -----	5
RESUMEN-----	6
ABSTRACT-----	7
INTRODUCCIÓN -----	8
1. Descripción general -----	8
1.1. Epidemiología y etiología-----	8
1.2. Diagnóstico y clasificación -----	9
2. Alteraciones cromosómicas -----	9
3. Mutaciones -----	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS-----	11
PACIENTES Y MÉTODOS -----	12
1. Características clínicas de la serie de estudio-----	12
2. Alteraciones citogenéticas de la serie -----	13
3. Mutaciones detectadas mediante NGS en la serie de estudio -----	13
4. Análisis estadístico -----	14
RESULTADOS-----	15
1. Incidencia y características de los pacientes con alteración del cromosoma 7 -----	15
2. Asociación de las alteraciones del cromosoma 7 con las características clínicas -----	15
3. Asociación de las alteraciones del cromosoma 7 con las mutaciones -----	17
4. Impacto pronóstico de alteraciones del cromosoma 7 en la supervivencia global-----	20
5. Impacto en la progresión a LAM de las alteraciones del cromosoma 7 -----	21
6. Impacto pronóstico de la presencia de alteraciones del cromosoma 7 en combinación con las mutaciones de TP53 o U2AF1 -----	22
DISCUSIÓN -----	24
CONCLUSIONES -----	27
BIBLIOGRAFÍA -----	28
ANEXOS -----	32
Anexos_1. Criterios mínimos para el diagnóstico de los SMD -----	32
Anexos_2. Clasificación de los SMD según la OMS 2017 -----	33
Anexos_3. Clasificación pronóstica de los SMD según el IPSS-R -----	33
Anexos_4. Alteraciones cromosómicas en los SMD y su pronóstico-----	34

<i>Anexos_5. Panorama de las mutaciones implicadas en los SMD, sus vías asociadas y su implicación clínica</i> -----	34
<i>Anexos_6. Características demográficas y clínicas principales de la serie de estudio</i> -----	35
<i>Anexos_7. Metodología: Citogenética Convencional (cariotipo y FISH)</i> -----	36
<i>Anexos_8. Alteraciones citogenéticas detectadas en la serie de estudio (A) y categorías de riesgo según el IPSS-R (B)</i> -----	37
<i>Anexos_9. Metodología: Secuenciación Masiva (NGS)</i> -----	37
<i>Anexos_10. Incidencia (A) y número (B) de mutaciones de la serie de estudio</i> -----	41
<i>Anexos_11. Incidencia de las mutaciones en U2AF1 en los diferentes subtipos de anomalías del cromosoma 7</i> -----	42

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FISH	Hibridación in situ fluorescente
Hb	Hemoglobina
IPSS-R	<i>International Prognostic Scoring System</i> revisado
LAM	Leucemia Aguda Mieloblástica
MO	Médula ósea
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> (secuenciación masiva)
OMS	Organización Mundial de la Salud
SG	Supervivencia global
SMD	Síndromes mielodisplásicos
SMD del(5q)	Síndromes mielodisplásicos con delección 5q
SMD-DM	Síndromes mielodisplásicos con displasia multilínea
SMD-DU	Síndromes mielodisplásicos con displasia unilínea
SMD-EB-1	Síndromes mielodisplásicos con exceso de blastos 1
SMD-EB-2	Síndromes mielodisplásicos con exceso de blastos 2
SMD-SA- DU/DM	Síndromes mielodisplásicos con sideroblastos en anillo con displasia unilínea o multilínea
SP	Sangre periférica
TTP	Tiempo hasta la progresión

RESUMEN

Los síndromes mielodisplásicos son un conjunto de neoplasias hematológicas clonales, caracterizados por una hematopoyesis anómala, alteraciones morfológicas, funcionales y genéticas de las células madre hematopoyéticas mieloides, además de un sustancial riesgo de transformación a leucemia aguda. Para su diagnóstico es necesario llevar a cabo un estudio integrado de morfología, citogenética y, cada vez más aceptado, molecular. De hecho, la presencia de determinadas anomalías cromosómicas (del(5q), del(7q)/-7, cariotipo complejo) así como mutaciones en determinados genes (*SF3B1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *TP53*) se han asociado con la patogenia y el pronóstico de esta enfermedad.

El objetivo principal de este trabajo es profundizar en el estudio de las características demográficas, diagnósticas, genéticas y pronósticas de aquellos pacientes con SMD que presentan alteraciones en el cromosoma 7.

Se observó que un 6% de los pacientes presentaron alteraciones en el cromosoma 7, ya sea de forma aislada (monosomía o deleción) o combinada con otras anomalías (dobles, triples o cariotipo complejo). En cuanto a las mutaciones, identificadas mediante secuenciación masiva, se observó que aquellas en *TP53* y *U2AF1* eran estadísticamente más frecuentes en el subgrupo de pacientes con alteraciones del 7. En concreto, las mutaciones de *TP53* aparecían en los pacientes con alteraciones del 7, sólo cuando éstas estaban en combinación con otras, asociándose también a la presencia de del(5q) como anomalía adicional, y relacionadas con una supervivencia global y tiempo hasta la progresión más cortos. Interesantemente, ninguno de los pacientes con anomalías del 7 aisladas tenían mutaciones de *TP53*, ni en *TET2* ni *SRSF2*, donde otras mutaciones (*DNMT3A*, *EZH2*, *GATA2*, *RUNX1*) podrían tener implicación pronóstica. Sin embargo, es necesario profundizar en su estudio en series más amplias.

Es de gran importancia la realización de estudios combinados de cariotipo/FISH y secuenciación masiva en los pacientes con SMD, para detectar cualquiera de estas anomalías, así como cualquier combinación de las mismas, pudiendo avanzar en el análisis de su impacto pronóstico y valor en la toma de decisiones.

Palabras clave: síndromes mielodisplásicos, alteraciones del cromosoma 7, *TP53*, evolución a leucemia aguda mieloblástica

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes are a group of clonal hematological malignancies, characterized by abnormal hematopoiesis, morphological, functional and genetic alterations of myeloid hematopoietic stem cells, and a substantial risk of progression to acute myeloid leukemia. An integrated diagnosis by combining morphology, cytogenetics and, increasingly accepted, molecular screening is necessary. In fact, the presence of certain chromosomal abnormalities (del(5q), del(7q)/-7, complex karyotype) as well as mutations in certain genes (*SF3B1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *TP53*) have been associated with the pathogenesis and prognosis of this disease.

The main objective of this work is to study the demographic, diagnostic, genetic and prognostic characteristics of those MDS patients with chromosome 7 abnormalities.

6% of patients carried chromosome 7 alterations, either isolated (monosomy or deletion) or combined (double, triple or complex karyotype). With regard to the mutations identified by next generation sequencing, those in *TP53* and *U2AF1* were statistically more frequent in the subgroup of patients with chromosome 7 abnormalities. Specifically, *TP53* mutations were detected in patients with abnormal chromosome 7 only when combined with other alterations, being associated with the presence of del(5q) as an additional anomaly, and related to a shorter overall survival and a time to progression.

Interestingly, none of the patients with isolated chromosome 7 abnormalities carried mutations in *TP53*, neither in *TET2* nor *SRSF2*, where other mutations (*DNMT3A*, *EZH2*, *GATA2*, *RUNX1*) could have prognostic impact. However, it is necessary to analyze larger series of patients.

It is of great importance to perform integrated studies by karyotype/FISH and next generation sequencing in patients with MDS, in order to detect any of these abnormalities, as well as any combination of them, thus being able to move forward in the analysis of their prognostic impact and their value in clinical decision making.

Keywords: myelodysplastic syndromes, chromosome 7 abnormalities, *TP53*, progression to acute myeloid leukemia

INTRODUCCIÓN

1. Descripción general

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un conjunto heterogéneo de neoplasias hematológicas clonales, cuyo origen se encuentra en la célula madre hematopoyética mieloide.¹

Se caracterizan por:

- Una hematopoyesis anómala en la médula ósea (MO) caracterizada por una elevada apoptosis y la consiguiente aparición de citopenias en sangre periférica (SP).²
- La presencia de alteraciones en la morfología y funcionalidad de las células en al menos un linaje mieloide (mielodisplasia).³
- Un riesgo sustancial de transformación a leucemia aguda mieloblástica (LAM), lo que ensombrece el pronóstico y la supervivencia.⁴

1.1. Epidemiología y etiología

Los SMD constituyen la primera causa de neoplasias hematológicas que afectan a las personas de edades más avanzadas. Su incidencia es de 2-12 x 100.000 al año, alcanzando los 50 x 100.000 en los individuos mayores de 70 años, con un mayor predominio en la población masculina (x1,8).^{4,5}

Es infrecuente en la población infantil y adulta joven, en cuyo caso la causa es generalmente primaria o hereditaria (asociada a enfermedades como la anemia de Fanconi, la neutropenia congénita severa, el síndrome de Shwachman-Diamond o la anemia de Diamond-Blackfan).⁵

Además, el 20% de los SMD son secundarios a la exposición a quimioterápicos, productos químicos (benzeno), radiaciones ionizantes, inmunosupresión o tabaquismo.⁶

1.2. Diagnóstico y clasificación

Los elementos necesarios para el diagnóstico de un SMD parten de la realización de una buena historia clínica y exploración física, en la que se indagará en los antecedentes personales (exposición a radiaciones, tóxicos, fármacos, etc.) y familiares de interés (antecedentes de neoplasias hematológicas).⁷

Se realizan estudios en sangre periférica, hemograma completo para detectar la presencia de citopenias, así como un diagnóstico diferencial exhaustivo con otras posibles causas de anemia, infecciones víricas u otras enfermedades hematológicas.⁸

Para confirmar el diagnóstico de SMD es imprescindible el examen citomorfológico en un frotis de SP o de un aspirado de MO, para confirmar que las citopenias son consecuencia de un fallo medular, detectándose cambios morfológicos inequívocos (displasia) en al menos el 10% de las células de algún linaje mieloide, la presencia de blastos y sideroblastos en anillo.⁹ Asimismo, es imprescindible la detección de anomalías cromosómicas, mediante cariotipo¹⁰ y/o hibridación in situ fluorescente (FISH)¹¹, y algunas mutaciones (**Anexos_1**).

La clasificación más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2017¹² recoge diferentes subtipos según las alteraciones morfológicas arriba indicadas, la presencia de anomalías citogenéticas específicas y, por primera vez, la presencia de mutaciones (como *SF3B1*) (**Anexos_2**).

El *International Prognostic Scoring System* revisado (IPSS-R)¹³ es un sistema de estratificación pronóstica que, en base a los blastos en MO, grado de citopenias y las alteraciones citogenéticas, clasifica a los pacientes en 5 grupos de riesgo con claras diferencias en la supervivencia global (SG) y tiempo de progresión a LAM (TTP). (**Anexos_3**)

2. Alteraciones cromosómicas

La presencia de anomalías cromosómicas se ha descrito en aproximadamente el 40-50% de los SMD primarios,¹⁴ y su estudio, mediante cariotipo/FISH, es de gran utilidad en el

diagnóstico, ya que su presencia junto con una citopenia es, en ausencia de displasia, evidencia suficiente. Además, son importantes predictores de la supervivencia y evolución a LAM.¹⁵

Las alteraciones más comunes incluyen la delección del brazo largo de los cromosomas 5, 7 y 20, trisomía 8 y monosomías del 5 y 7.¹⁶ (**Anexos_4**)

Las alteraciones del cromosoma 7 se presentan en aproximadamente el 10% de los SMD primarios y el 50% de los SMD post-exposición a agentes alquilantes.¹⁷ Estas alteraciones se asocian con acortamiento de la SG.¹⁸ Sin embargo, existen diferencias: la monosomía 7 es más frecuente en neoplasias secundarias, y es un factor de mal pronóstico según el IPSS-R¹³, mientras que la delección 7q aislada se ha asociado con características clínico-patológicas de mayor benignidad, así como una mejor SG.¹⁹

3. Mutaciones

Los estudios de secuenciación masiva (*Next-generation sequencing* o NGS) han permitido identificar diversas mutaciones genéticas, adquiridas conforme evoluciona la historia natural de la enfermedad.

Aproximadamente, el 78% de los pacientes con SMD presentan al menos una mutación.²⁰ Se han identificado mutaciones en genes implicados en múltiples vías: metilación del DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*), modificación de la cromatina (*EZH2*, *ASXL1*), maquinaria de *splicing* (*SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*), regulación de la transcripción (*EVII*, *RUNX1*, *GATA2*) y transducción de señales (*JAK2*, *RAS*, *CBL*).²¹ Algunas de estas mutaciones se han asociado con un pronóstico desfavorable (*TP53*, *ASXL1*) y sólo una favorable (*SF3B1*). (**Anexos_5**)

En la actualidad se está intentado llevar a la práctica el estudio combinado morfológico, citogenético y mutacional, para una mejor caracterización y estratificación del riesgo de los SMD.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Un acontecimiento de gran relevancia, que supuso un gran avance en el conocimiento fisiopatológico del SMD, fue la detección de mutaciones somáticas en más del 70% de los casos de SMD, incluso en aquellos pacientes con cariotipo normal.²² Algunas de estas mutaciones tienen gran impacto clínico, lo que ha planteado un desafío para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con SMD. De hecho, el valor pronóstico de determinadas anomalías cromosómicas, en concreto, la alteración del cromosoma 7, asociada generalmente a un pronóstico más adverso según el IPSS-R, podría redefinirse en función de la presencia o ausencia de mutaciones. En este sentido, hay pocos estudios que hayan profundizado en el impacto de alguna de estas mutaciones en pacientes con anomalías del cromosoma 7.

El **objetivo principal** de este trabajo es profundizar en el estudio de la presencia de alteraciones en el cromosoma 7 en pacientes con SMD y analizar su relación con las características demográficas, diagnósticas, genéticas y pronósticas.

Objetivos específicos:

- Describir la incidencia y características de las alteraciones del cromosoma 7.
- Analizar la asociación de las alteraciones del 7 con las características clínicas de la enfermedad.
- Estudiar la asociación de las alteraciones del 7 con la presencia de mutaciones.
- Analizar el impacto pronóstico de estas alteraciones en la SG y progresión a LAM.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se han analizado 418 pacientes con SMD, de los que se había recogido material biológico (muestras de MO y/o SP) y los datos clínicos y de seguimiento en la Unidad de Citogenética Oncológica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. A todos ellos se les solicitó el consentimiento informado y el estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki. Así mismo, se recogieron los resultados de cariotipo y FISH que forman de parte de la rutina diagnóstica de los SMD. La secuenciación masiva (NGS) se realizó en el laboratorio de Genética Molecular en Oncohematología, en el Centro de Investigación del Cáncer/Edificio Multiusos I+D+i.

1. Características clínicas de la serie de estudio

Las principales características demográficas y clínicas se recogen en **Anexos_6**. Brevemente, la mediana de edad al diagnóstico era de 74,6 años, siendo el 76% mayores de 65 años. Además, el 58,9% eran hombres.

Según la clasificación de la OMS 2017¹², el 4,8% de los pacientes eran SMD con displasia unilínea (SMD-DU) y 29,1% con displasia multilínea (SMD-DM); 25,5% correspondían a SMD con sideroblastos en anillo con displasia unilínea/multilínea (SMD-SA-DU/DM); 13,7% y 14,9% eran SMD con exceso de blastos tipo 1 y 2 (SMD-EB-1/2); 9,6% eran SMD con delección del 5q (SMD del(5q)) y 2,4% eran SMD inclasificables. La mediana del porcentaje de blastos en MO era de 1,5 con un 77,1% con menos del 5% de blastos.

Por otro lado, en cuanto a la estratificación pronóstica IPSS-R¹³: el 27% de los pacientes eran de riesgo muy bajo, el 43,9% de riesgo bajo, el 15,5% intermedio y el 7,9% y 5,6% de riesgo alto y muy alto, respectivamente.

La mediana de seguimiento de la serie era de 28,2 meses, período de tiempo durante el cual 28,8% de los pacientes había progresado a LAM y el 48% había fallecido.

2. Alteraciones citogenéticas de la serie

La metodología general de cariotipo y FISH está descrita en **Anexos_7** y las alteraciones detectadas están detalladas en **Anexos_8**.

Brevemente, el 68,6% tenían un cariotipo normal, es decir, no presentaban alteraciones citogenéticas mediante cariotipo/FISH. El 31,4% restante presentó alguna anomalía cromosómica. De todas las alteraciones detectadas (**Anexos_8.A**), la más prevalente fue la deleción 5q (10,4%), seguida por la trisomía 8 (3,6%), pérdida del Y (1,8%), deleción 20q (1,5%), deleción 7q (1,2%) y monosomía 7 (0,9%). Además, un 8% de los pacientes presentaron varias anomalías: 11 pacientes tenían dos alteraciones, lo que hemos denominado como “dobles”, 4 tenían tres anomalías, “triples”, y 12 pacientes tenían más de 3, definido como cariotipo complejo.

Teniendo en cuenta la clasificación de estas anomalías según el IPSS-R¹³, la mayoría de los pacientes (80,2%) presentaban alteraciones de pronóstico favorable, siendo un 4,2% de pronóstico muy favorable, un 9,4% intermedio, y un 6,2% de pronóstico adverso (3,1%) o muy adverso (3,1%) (**Anexos_8.B**)

3. Mutaciones detectadas mediante NGS en la serie de estudio

Una descripción de la técnica de NGS está incluida en **Anexos_9**, pero señalar que se empleó un panel personalizado propio del laboratorio, que permite el análisis de las regiones codificantes de 117 genes asociados con neoplasias hematológicas mieloides. Destacar que la parte más crítica es el filtrado e interpretación de las variantes obtenidas para seleccionar, tras aplicar una serie de filtros de calidad, aquellas mutaciones que puedan ser consideradas clínicamente relevantes. Para este filtrado se utilizaron diferentes bases de datos con información acerca de polimorfismos (*dbSNP*), mutaciones en cáncer (*COSMIC*), asociadas con enfermedades (*ClinVar*), e información sobre el potencial benigno/patogénico de las variantes (*VarSome*).

El análisis de las mutaciones reveló un total de 1035 mutaciones en 88 genes, detectándose al menos una mutación en el 85,4% de los pacientes. La mayor parte de las mutaciones correspondían a los genes *TET2* (31,3%), *SF3B1* (27%), *DNMT3A* (16,5%),

SRSF2 (16%) y *TP53* (10%). Las funciones celulares más afectadas fueron las del spliceosoma (51,9%), metilación del DNA (46,7%) y los factores de transcripción (34,9%) (**Anexos_10.A**).

En relación al número de mutaciones, la mediana fue de 2 (rango: 0-9). La mayoría de los pacientes presentaron 1 (19,4%), 2 (19,4%) y 3 (20,6%) mutaciones, mientras que más de 5 mutaciones sólo fueron detectadas en menos del 5% de los pacientes (**Anexos_10.B**).

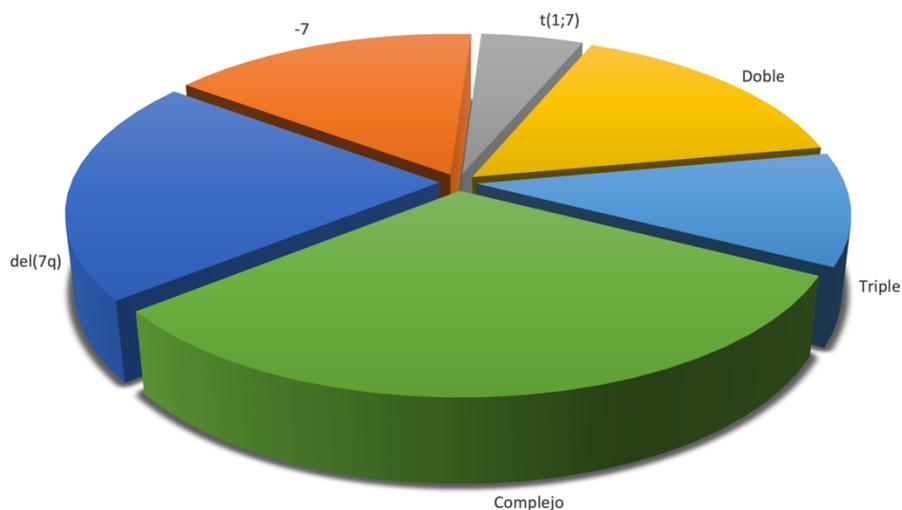
4. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico *IBM SPSS Statistics v.23*. para analizar la posible relación de la presencia de alteraciones en el cromosoma 7 con las características clínicas, citogenéticas, mutaciones y de supervivencia de la serie en estudio. Para ello se emplearon los test *chi cuadrado* (χ^2) para variables categóricas y *U de Mann-Whitney* para variables numéricas de tipo continuo. El método de *Kaplan-Meier (log-rank)* se utilizó para el análisis de la SG y TTP. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. Incidencia y características de los pacientes con alteración del cromosoma 7

De los 418 pacientes estudiados, 338 con información acerca de las alteraciones citogenéticas, 20 (6%) presentaron alguna anomalía en el cromosoma 7 (**Figura_1**). En relación a los diferentes tipos de alteraciones en las que estaba afectado el cromosoma 7, se observó que en 8 pacientes (40%) esta anomalía estaba presente de manera aislada, de las cuales en 4 pacientes (20%) comprendían deleciones del brazo largo del cromosoma 7 (*del(7q)*), en 3 pacientes (15%) eran una pérdida completa, monosomía (-7) y en 1 paciente (5%) una traslocación entre los cromosomas 1 y 7 (*t(1;7)*). Los 12 pacientes restantes (60%) presentaron una y dos alteraciones adicionales (3 y 2 pacientes, respectivamente), grupo que hemos denominado como “doble, triple”, y formando parte de un cariotipo complejo (7 pacientes, 35%).



Figura_1: Subtipos de alteraciones del cromosoma 7 detectadas en la serie de estudio

2. Asociación de las alteraciones del cromosoma 7 con las características clínicas

Para estudiar si había diferencias en las características clínicas de aquellos pacientes que presentaban alteraciones del cromosoma 7, se compararon variables como edad, sexo, subtipo OMS, porcentaje de blastos, niveles de hemoglobina, plaquetas, neutrófilos y categorías IPSS-R entre el subgrupo de pacientes con alguna alteración en el cromosoma

7 (todas ellas en su conjunto) respecto a los que no, es decir, cariotipo normal o cualquier anomalía que no incluya el cromosoma 7 (Tabla_1).

Tabla 1: Asociación de las características clínicas con la presencia o no de alteraciones en el cromosoma 7

Variable	Sin alteraciones del cr.7		Con alteraciones del cr.7		P valor
	%	Mediana [p10-p90]	%	Mediana [p10-p90]	
Edad (> o = a 75 años)	46,2		25,0		p = 0,030
Género					p = 0,372
Hombre	58,5		65,0		
OMS (2017)					p = 0,104
SMD-DU	5,4		5,0		
SMD-DM	31,3		35,0		
SMD-SA-DU/DM	25,6		10,0		
SMD-EB-1	12,3		15,0		
SMD-EB-2	13,3		35,0		
SMD del(5q)	9,5		0,0		
SMD inclas.	2,5		0,0		
Blastos MO (%)		1,4 [0-10]		5 [0,1-17,2]	p = 0,002
<i>Categorías IPSS-R</i>					
≤2	63,8		30,0		p = 0,016
>2<5	14,0		20,0		
≥5≤10	12,6		25,0		
>10	9,6		25,0		
Sideroblastos en anillo		0 [0-52,2]		0 [0-0]	p = 0,655
Hb (g/dL)		10 [7,6-12,8]		8,3 [5,9-11,7]	p < 0,001
<i>Categorías IPSS-R</i>					
≥10	51,2		15,8		p = 0,001
≥8<10	35,1		42,1		
<8	13,7		42,1		
Plaquetas (<100 x 10⁹/L)		151,5 [45-355]		101 [39-350]	p = 0,057
<i>Categorías IPSS-R</i>					
≥100	64,2		52,6		p = 0,599
≥50<100	24,1		31,6		
<50	11,7		15,8		
Neutrófilos (<100 x 10⁹/L)		2 [0,6-4,6]		1,1 [0,3-4,2]	p = 0,046
<i>Categorías IPSS-R</i>					
≥0,8	87,1		66,7		p = 0,029
<0,8	12,9		33,3		
Leucocitos (<100 x 10⁹/L)		4 [2,3-7,7]		3,3 [1,7-8]	p = 0,217
Monocitos (<100 x 10⁹/L)		0,3 [0,1-0,9]		0,9 [0,1-0,9]	p = 0,605
Categorías Riesgo, IPSS-R					p < 0,001
Muy bajo	27,6		5,3		
Bajo	46,6		5,3		
Intermedio	14,5		26,3		
Alto	7,1		21,1		
Muy alto	4,2		42,1		

Se muestran en color azul las diferencias estadísticamente significativas

No se observó asociación estadística entre la presencia de las anomalías del 7 en relación al género, pues en ambos grupos se observó que la mayoría eran hombres (58,5% vs 65%, $p=0,372$). Sin embargo, sí que se observó significación estadística en relación con la edad, pues se vio que había una mayor proporción de pacientes que no presentan alteraciones del 7 que tenían una edad avanzada, ≥ 75 años, 46,2% vs 25% ($p=0,030$).

Atendiendo a la clasificación OMS¹², se observó una mayor proporción de pacientes con alteraciones del 7 en la categoría de SMD-EB-2 (35% vs 13.3%), pero no alcanzó la significación estadística ($p=0,104$), probablemente debido a que la distribución en las categorías SMD-DU, SMD-DM y SMD-EB-1 era muy similar en ambos grupos (5% vs 5,4%; 35,0% vs 31,3%; 15% vs 12,3%, respectivamente).

En cuanto a las citopenias, sí que se observaron diferencias significativas entre ambos grupos tanto en los niveles de hemoglobina (Hb) como de neutrófilos, siendo más bajos en los pacientes con alteraciones del 7 ($p<0,001$ y $p=0,046$, respectivamente). Se observó una mayor proporción de pacientes con anemia severa (42,1% vs 13,7%, $p=0,001$), con valores de Hb <8 g/dL, y con neutropenia, $<0,8 \times 10^9/L$, (33,3% vs 12,9%, $p=0,029$) dentro del subgrupo con anomalías del 7.

Dado que las alteraciones del cromosoma 7 puntúan de forma negativa para el cálculo del riesgo según el IPSS-R¹³: los pacientes con el cromosoma 7 afectado se incluían en las categorías de alto y muy alto riesgo (21.1% vs 7,1, y 42,1% vs 4,2%, respectivamente, $p<0,001$).

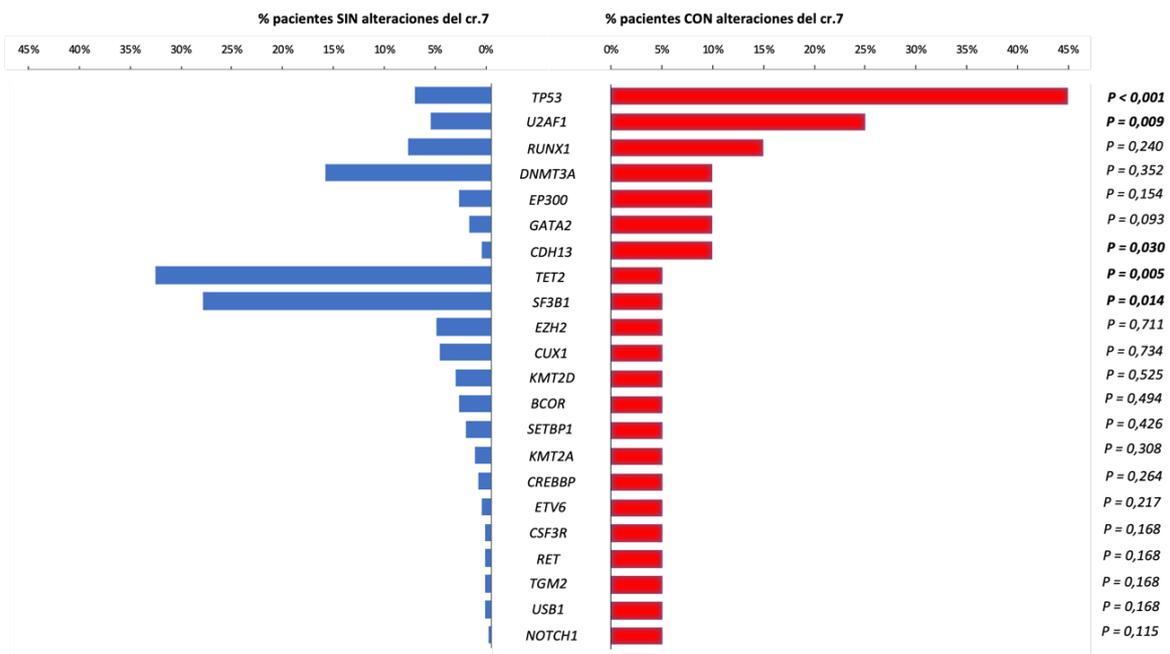
3. Asociación de las alteraciones del cromosoma 7 con las mutaciones

Para estudiar si los pacientes con alteraciones del cromosoma 7 presentaban alguna mutación más característica, se analizó si existía algún tipo de asociación entre las mutaciones, tanto en número total como en los genes a nivel individual, con la presencia de estas anomalías del 7, consideradas en su conjunto.

En relación al número total de mutaciones por paciente, se observó que no existían diferencias significativas entre los dos grupos, siendo la mediana de 2 ($p=0,467$) y la

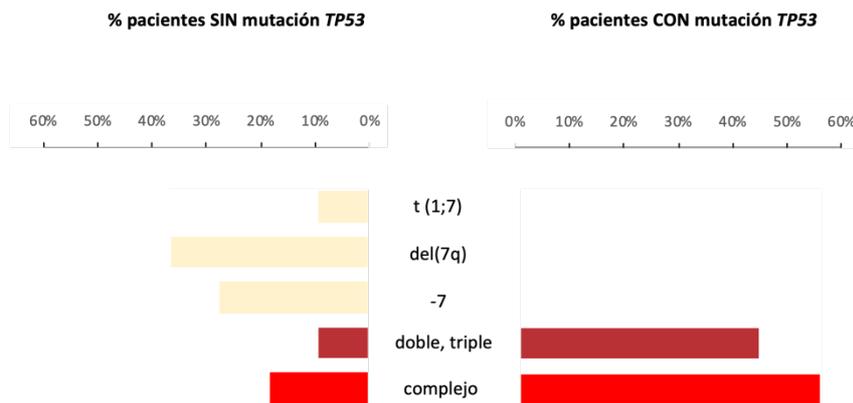
proporción de pacientes con ≥ 2 y < 2 mutaciones muy similar (40% vs 48.7%, 60% vs 51,3%, $p=0,3$).

Sin embargo, respecto a los genes mutados (**Figura_2**), sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con alteraciones del 7 y aquellos que no, siendo la proporción de pacientes con mutaciones en *TP53* (45% vs 7,5%, $p<0,001$) y *U2AF1* (25% vs 6%, $p=0,009$) superior en el grupo con anomalías del cromosoma 7. Las mutaciones en *RUNX1* también eran más frecuentes en los pacientes con alteraciones del 7 (15% vs 8,2%, $p=0,240$), pero no se alcanzó la significación estadística. Cabe destacar que, por el contrario, las mutaciones en los genes *TET2* (5% vs 33%, $p=0,005$), *SF3B1* (5% vs 28,3%, $p=0,014$) y *SRSF2* (0% vs 18,2%, p) eran significativamente menos prevalentes en este grupo de pacientes con el cromosoma 7 afecto.



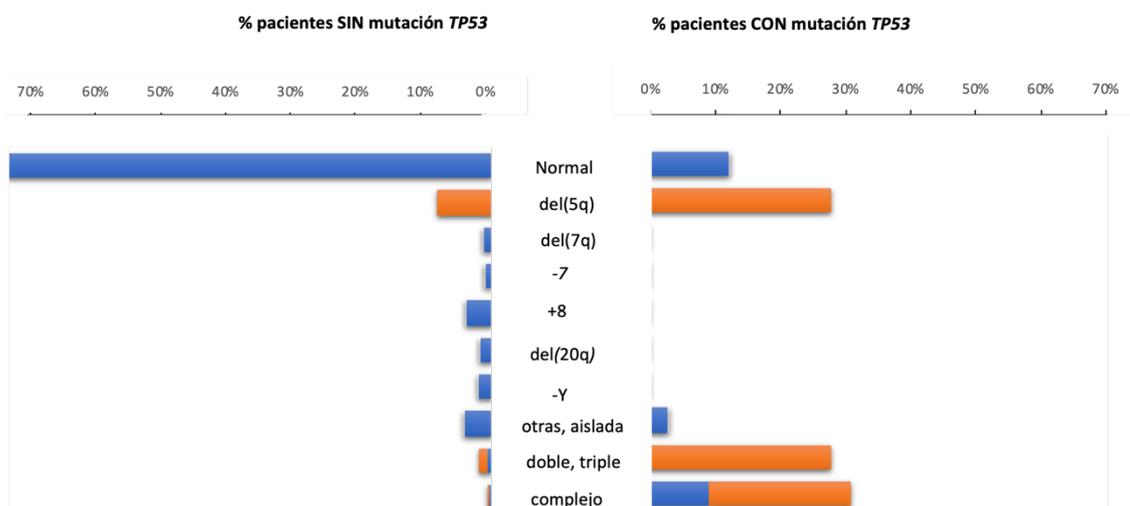
Figura_2: Genes mutados en los pacientes con alteraciones del cromosoma 7

Dentro de los pacientes con alguna alteración del 7, se vio que las mutaciones de *TP53* aparecían exclusivamente en los subgrupos en los que esta anomalía estaba en combinación con otras: dobles, triples y cariotipo complejo, no estando presente en ninguno de los casos con la alteración de forma aislada ($p=0,027$) (**Figura_3**).

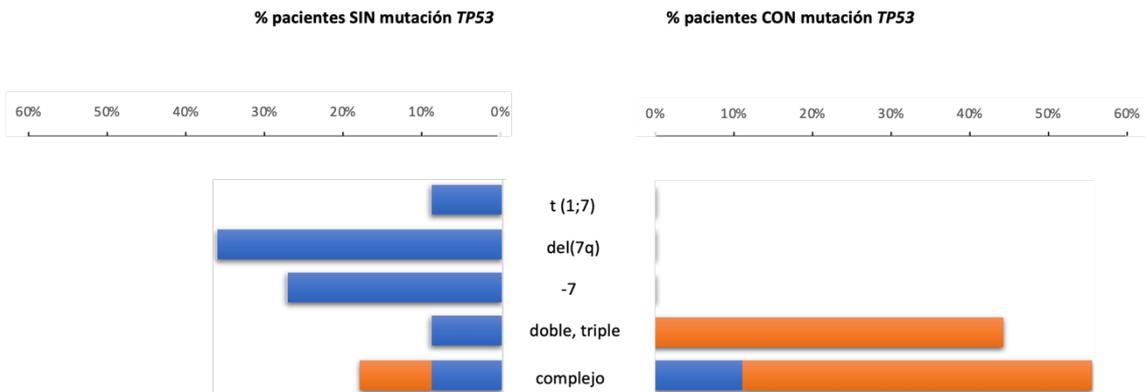


Figura_3: Incidencia de mutaciones de *TP53* en los distintos subtipos de alteraciones del cromosoma 7

Las mutaciones de *TP53* están descritas en los SMD con alteraciones del cromosoma 5 y cariotipo complejo. Por ello se analizó si en la serie de estudio, tanto global como el subgrupo con alteraciones del 7, las mutaciones de *TP53* ocurrían en aquellos pacientes con anomalías del cromosoma 5. El análisis estadístico así lo confirmó ($p < 0,001$) (**Figura_4**), y en concreto, que la presencia de mutaciones en *TP53* en los pacientes con alteraciones del 7 se asociaba con la presencia de deleción (5q) como anomalía adicional ($p = 0,022$) (**Figura_5**).



Figura_4: Incidencia de mutaciones de *TP53* en los distintos tipos de anomalías cromosómicas en la serie completa del estudio. En naranja, aquellas alteraciones que presentan del(5q)



Figura_5: Incidencia de mutaciones de *TP53* en la serie de pacientes con alteraciones del cromosoma 7, según los diferentes subtipos. En naranja, aquellas alteraciones que presentan del(5q)

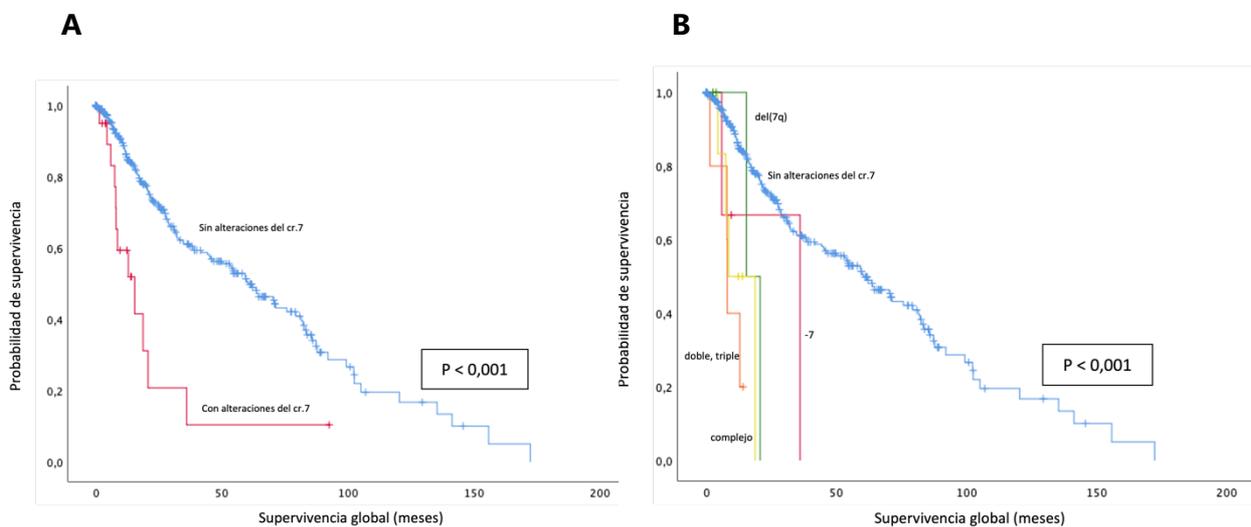
Del mismo modo, se analizó si las mutaciones de *U2AF1*, cuyas mutaciones se han asociado con un pronóstico más desfavorable en los SMD, eran también más frecuentes en alguno de los subtipos con alteraciones del cromosoma 7. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que no existía asociación significativa con algún subtipo concreto ($p=0,968$) (**Anexos_11**).

4. Impacto pronóstico de alteraciones del cromosoma 7 en la supervivencia global

La SG se ha calculado como el tiempo que transcurre desde el diagnóstico de SMD hasta el último control realizado, momento en el que el paciente está vivo, o hasta el fallecimiento del paciente. En la serie de estudio un 8,4% de los pacientes había recibido trasplante de MO, procedimiento que modifica totalmente el curso de la enfermedad. Por esta razón, los pacientes que recibieron un trasplante se consideraron como censurados en la fecha en la que se realizó, y así mismo aquellos en los que se había perdido el seguimiento, considerándolos vivos en su última visita (2,4%).

El análisis de supervivencia mostró que la presencia de alteraciones del 7, en conjunto, acortaban significativamente la SG frente a los que no presentaban dicha alteración (15,4

vs 60,4 meses, $p < 0,001$) (**Figura_6.A**). Pero, además, si nos centramos en el subtipo específico de alteraciones del 7, los análisis confirmaron que las alteraciones combinadas (dobles, triples, cariotipo complejo) tenían un pronóstico más desfavorable en comparación con las alteraciones aisladas (8 y 8,6 vs 15,4 y 36 meses, $p < 0,001$) (**Figura_6.B**). La presencia de cariotipo complejo, con independencia de alteraciones del 7, era un factor de mal pronóstico ya en la serie global (mediana de 8,6 meses, IC al 95%: 2,6-14,5). Sin embargo, en las combinaciones dobles o triples el valor pronóstico podía ser muy diferente según las anomalías implicadas (mediana de 27,6 meses, IC al 95%: 1,0-54,3), y así se contempla dentro del IPSS-R¹³. En este caso, y como ya se ha descrito, la presencia de alteraciones del 7 ensombrecería sustancialmente el pronóstico (mediana 8 meses, IC al 95%: 0,1-7,7).

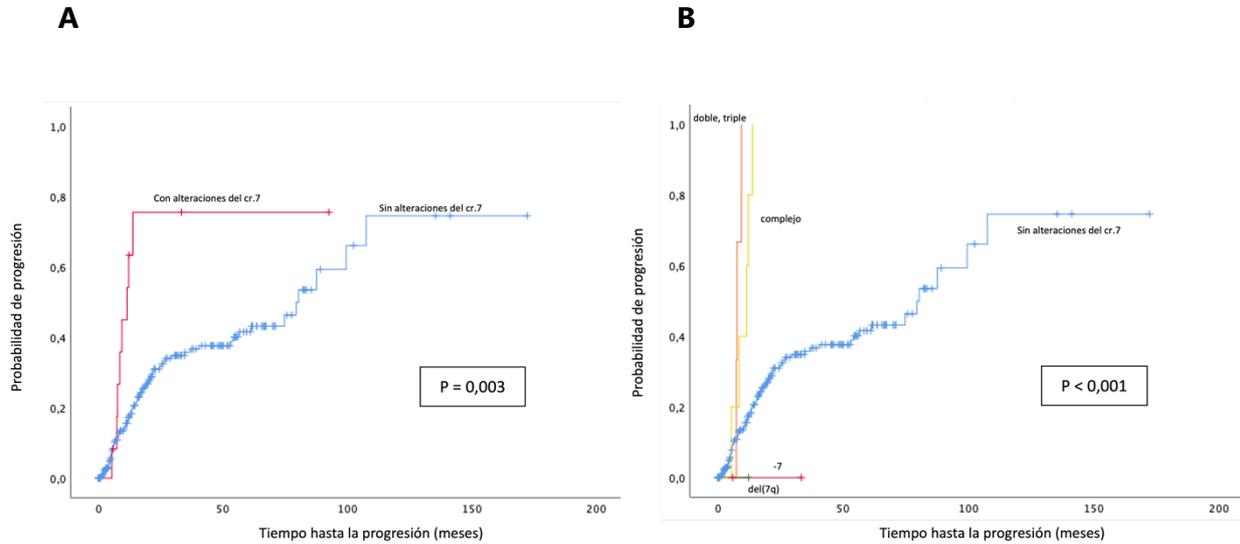


Figura_6.A: Curva de Kaplan-Meier para la SG en función de la presencia o ausencia de cromosoma 7 alterado, y **6.B:** en función del subtipo de anomalía del 7

5. Impacto en la progresión a LAM de las alteraciones del cromosoma 7

Se analizó también el tiempo de progresión a leucemia, definido como el tiempo que transcurre desde que se diagnostica la enfermedad hasta que el paciente progresa a LAM. El subgrupo con alteraciones del cromosoma 7, consideradas en conjunto, mostró un menor TTP (11,5 vs 80,5 meses, $p = 0,003$) (**Figura_7.A**). Si tenemos en cuenta los distintos tipos de alteraciones del 7, las combinaciones dobles/triples y el cariotipo complejo progresaban rápidamente a LAM (7,7 meses, IC al 95%: 7,2-8,2 y 11,5 meses,

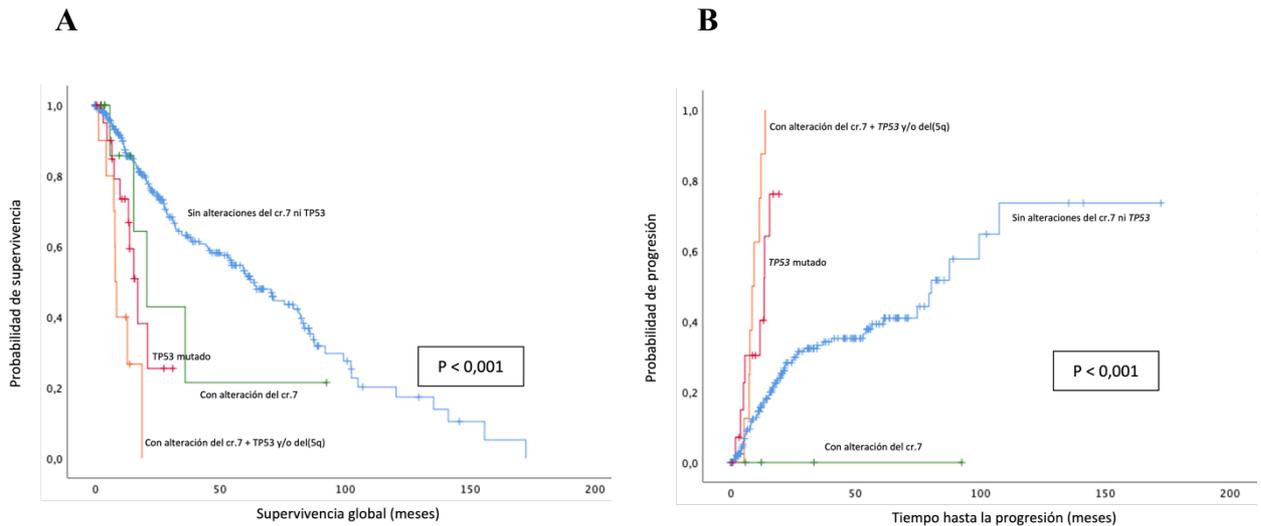
IC al 95%: 5,2-17,8, respectivamente) (**Figura_7.B**). Para aquellos pacientes con alteración aislada del cromosoma 7, sólo se disponía de información de progresión de 4 de ellos, y ninguno progresó.



Figura_7.A: Curva de Kaplan-Meier para el TTP en función de la presencia o ausencia de cromosoma 7 alterado, y **7.B:** según el subtipo de anomalía del 7

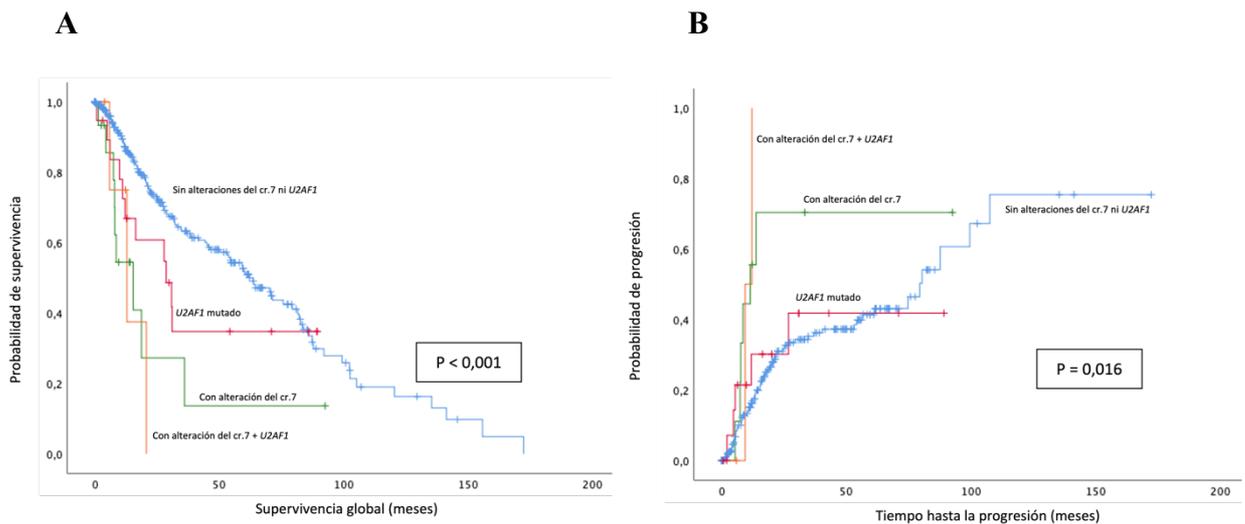
6. Impacto pronóstico de la presencia de alteraciones del cromosoma 7 en combinación con las mutaciones de *TP53* o *U2AF1*

Como se ha visto que las anomalías del cromosoma 7 en combinación con otras (dobles, triples o cariotipo complejo) presentan un pronóstico más desfavorable y dada la asociación de estas combinaciones con mutaciones de *TP53* y *del(5q)*, se ha analizado el impacto pronóstico en la DG y TTP de esta triple combinación. La combinación tiene un pronóstico desfavorable ($p < 0,001$) tanto en la SG (8 meses, IC al 95%: 7-9; 17,1) como el TTP (8,6 meses, IC al 95%: 6,2-11), seguida por los pacientes con *TP53* mutado sin anomalías del 7 (SG: 17,1 meses, IC al 95%: 12,6-21,6; TTP: 13,4 meses, IC al 95%: 11-15,9) (**Figura_8.A y 8.B**).



Figura_8: Curvas de Kaplan-Meier para SG (8.A) y TTP (8.B) para la combinación anomalía 7 + $TP53^{mut}$ + del(5q)

Del mismo modo, se analizó el impacto de la combinación de mutaciones de *U2AF1* con la presencia de cromosoma 7 alterado en la SG y TTP. El análisis reveló que las mutaciones en *U2AF1* no empeoraban significativamente la SG o TTP en combinación con las alteraciones del cromosoma 7, consideradas en conjunto (SG: 12,9 meses, IC al 95%: 2,4-23,3; 15,4 meses, IC al 95%: 4,8-26; TTP: 9,4 meses; 11,5 meses, IC al 95%: 2,9-20) (Figura_9.A y 9.B).



Figura_9: Curvas de Kaplan-Meier para SG (9.A) y TTP (9.B) para la combinación anomalía 7 + $U2AF1^{mut}$

DISCUSIÓN

Las anomalías del cromosoma 7 se han descrito asociadas con una SG más corta¹⁸, aunque existen diferencias en relación a si se trata de monosomía, deleción del brazo largo, o aparece en combinación con otras, y así se refleja dentro del IPSS-R.¹³ Y son múltiples los estudios que demuestran la importancia de la detección de dicha anomalía para el diagnóstico y pronóstico de los SMD.²³

En este trabajo, se ha visto que el cromosoma 7 estaba alterado en un 6% de los pacientes, bien de forma aislada o combinada con otras anomalías citogenéticas, porcentaje que se aproxima al 10% de las series generales ya estudiadas.¹⁰ Además, se ha demostrado que la presencia de alteraciones del 7 en conjunto se asociaba a características de peor pronóstico, como mayores citopenias (anemia y neutropenia) y mayor porcentaje de blastos, así como una SG más corta y menor tiempo hasta la progresión a LAM. Numerosos estudios han expuesto que, dentro de las alteraciones aisladas, la deleción 7q es de mejor pronóstico que la monosomía 7.²⁴ Sería de gran interés poder profundizar en el análisis de estos casos. Sin embargo, en este trabajo no se disponía de suficiente tamaño muestral para ello. Lo que si se realizó fue agrupar las alteraciones aisladas del 7 y compararlas con las alteraciones dobles, triples y cariotipo complejo, demostrando que, la presencia de estas combinaciones con el cromosoma 7 afecto, acertaba considerablemente la SG y el TTP.

Por otro lado, dado que la presencia de determinadas mutaciones puede modificar el pronóstico de los pacientes con SMD, se analizó si los pacientes con alteraciones del cromosoma 7 presentaban alguna mutación más característica. En este trabajo se vio que las mutaciones de *TP53*, uno de los genes estudiados, eran significativamente más frecuentes en este subtipo de pacientes.

TP53 es uno de los genes mutados más frecuentes en todo tipo de cáncer.²⁵ En los SMD, tiene una incidencia del 10% y es un factor independiente de mal pronóstico, estando asociado con cariotipo complejo, presencia de trombocitopenia severa y mayor porcentaje de blastos, supervivencia más corta, transformación más rápida a LAM y mayor resistencia a las terapias convencionales.^{26,27} Sin embargo, en las series publicadas hasta la fecha no se había visto asociado de forma característica con las alteraciones del

cromosoma 7. Por ello, se consideró necesario realizar un estudio más exhaustivo para entender por qué en esta serie de pacientes la mutación de dicho gen supresor, *TP53*, alcanzó la significación estadística. Los análisis revelaron que ninguno de los pacientes con la alteración aislada presentaba mutaciones en *TP53*, detectándose, por el contrario, en la mayor parte de los pacientes con combinaciones dobles y triples (4/5 pacientes, 80%) y cariotipo complejo (4/7 pacientes, 57%). Además, se demostró que esta asociación podía deberse a que estas mutaciones ocurrían en los pacientes que tenían del(5q) como anomalía adicional a la del cromosoma 7. Así mismo, se demostró que los pacientes con esta combinación, anomalía del 7, mutaciones de *TP53* y/o del(5q), presentaban un acortamiento de la supervivencia y un menor tiempo de progresión a LAM ($p < 0,001$).

Se han publicado numerosos estudios con nuevas aproximaciones terapéuticas en pacientes con alteración de *TP53*, como Sallman *et al.*²⁸ donde se ha visto que el Eprentapopt (APR-246) induce selectivamente apoptosis en las células con *TP53*^{mut}, aumentando el estrés oxidativo. Dicha molécula, en combinación con Azacitidina, parece ser bien tolerado y producir altas tasas de respuesta clínica y remisiones moleculares en pacientes con SMD con mutación *TP53* y LAM oligoblástica. Además, un enfoque para mejorar el IPSS-R sería incluir la presencia de mutaciones en genes con impacto pronóstico independiente, como *TP53*, cuyo análisis es actualmente de obligada realización.

Por otro lado, podría ser igual de importante detectar la presencia de mutaciones como su ausencia. En ese sentido, en este trabajo hemos demostrado que las mutaciones de *TP53* no aparecían en ninguno de los pacientes con alteración aislada del cromosoma 7, un hallazgo ya descrito también por Kulasekararaj *et al.*²⁹ al igual que ocurrían con las mutaciones en *SRSF2* y *TET2*, que tampoco aparecían en este subgrupo o eran muy infrecuentes. Sin embargo, estos pacientes con alteración aislada del 7, sí que presentaron otras mutaciones como *U2AF1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *GATA2* o *RUNX1*, pero, debido al bajo tamaño muestral, ninguna se asoció específicamente con este subgrupo. Por tanto, sería de grandísimo interés poder profundizar en el análisis de este subgrupo concreto de pacientes en series mucho más amplias.

Todo esto nos lleva a determinar que es de sustancial importancia la realización de estudios de secuenciación como test complementario al cariotipo/FISH, pudiendo

detectarse así estas anomalías y cualquier combinación de las mismas, y que son de gran relevancia en la toma de decisiones terapéuticas en los pacientes con SMD, avanzando hacia una mayor individualización terapéutica, la medicina de precisión.

CONCLUSIONES

1. Las alteraciones del cromosoma 7 no son las más frecuentes dentro de los SMD y pueden aparecer de forma aislada o en combinación con otras, presentando un impacto pronóstico diferente. Las combinaciones con el cromosoma 7 afecto presentaron un impacto pronóstico muy adverso, acortando significativamente la SG y el TTP.
2. Los SMD con anomalías del cromosoma 7 presentaron un mayor recuento de blastos en MO, así como niveles más bajos de hemoglobina y neutrófilos, todos ellos factores asociados con mal pronóstico.
3. Las mutaciones en *TP53* eran más frecuentes en los SMD con alteraciones del cromosoma 7 cuando éstas estaban en combinación con otras (dobles, triples, cariotipo complejo), presentando así un pronóstico muy desfavorable.
4. Las mutaciones de *TP53*, *TET2* y *SRSF2* no aparecían en ninguno de los pacientes que tenían alguna alteración del cromosoma 7 de forma aislada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blau O, Hofmann WK, Baldus CD, Thiel G, Serbent V, Schüman E, et al. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol.* 2007;35(2):221-229.
2. Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1995;86:268-276.
3. 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(20):2391-2405.
4. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood.* 2013;122(25):4021-4034.
5. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361(19):1872-85.
6. Nisse C, Lorthois C, Dorp V, Eloy E, Haguenoer JM, Fenaux P. Exposure to occupational and environmental factors in myelodysplastic syndromes. Preliminary results of a case-control study. *Leukemia.* 1995;9(4):693-699.
7. Garcia-Manero G, Chien KS, Montalban-Bravo G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95: 1399– 1420.
8. Nucifora E, Zimmerman J, Fazio P, Prates MV. Diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicos (SMD). *Hematología.* 2010;14(3):103-107
9. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997; 89(6):2079–2088.
10. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007;110:4385-4390.

11. Rigolin, GM, Bigoni R., Milani R, Cavazzini F, Roberti MG, Bardi A, et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia*. 2001;15:1841–1847.
12. Hasserjian RP, Orazi A, Brunning RD, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, et al. Myelodysplastic syndromes: Overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4th ed, Lyon, IARC. 2017. p. 98-106.
13. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465.
14. Lindsley RC, Ebert BL. Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annu Rev Pathol*. 2013;24(8):21-47.
15. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):820-829.
16. Borjas-Gutiérrez C, Domínguez-Cruz MD, González-García JR. La citogenética de los síndromes mielodisplásicos y su impacto como factor pronóstico (Cytogenetics of myelodysplastic syndromes and its impact as prognostic factor). *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2017;55(4):481-9
17. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol*. 2001;19(5):1405-13.
18. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2005;90(9):1168-78.

19. Cordoba I, González-Porras JR, Nomdedeu B, Luño E, Paz R, Such E, et al. Better prognosis for patients with del(7q) than for patients with monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2012 Jan 1;118(1):127-33.
20. 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(2):241-247.
21. Zhang L, Padron E, Lancet J. The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2015;39(1):6-17.
22. 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(26):2496-506.
23. Morel P, Hebbar M, Lai JL, Duhanem 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.
24. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, et al. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia*. 2005;19:1424-1431.
25. Boettcher S, Miller PG, Sharma R, McConkey M, Leventhal M, Krivtsov AV, et al. A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies. *Science*. 2019;365(6453):599–604.
26. Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood*. 1995;85:2189-2193.
27. 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.
28. Sallman DA, DeZern AE, Garcia-Manero G, Steensma DP, Roboz GJ, Sekeres MA, et al. Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2021;39(14):1584-1594.

29. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol.* 2013;160(5):660-72.
30. 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;31:727-36.
31. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer.* 2012 Dec;12(12):849-59
32. Steensma DP. Steensma DP. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2015 Jul;90(7):969-83
33. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):178-192.

ANEXOS

Anexos_1. Criterios mínimos para el diagnóstico de los SMD

A. Prerrequisitos

(se deben cumplir los dos)

- Citopenia constante (6 meses) en una o más de las líneas siguientes: eritroide, neutrofílica o plaquetar (excepción: presencia de un exceso de blastos y anomalías citogenéticas relacionadas con SMD que por si son diagnósticas de SMD)
 - Exclusión de enfermedades hematológicas y no hematológicas como causa de citopenia/displasia
-

B. Criterios decisivos

(relacionados con el SMD, se debe de cumplir al menos uno)

- Displasia en al menos 10% de las células de 1 o más de las líneas mieloides en MO
 - 5-19% de blastos en MO (o 2-19% en SP)
 - $\geq 15\%$ sideroblastos en anillo (tinción de Pearls)
 - $\geq 5\%$ sideroblastos en anillos en presencia de mutación en *SF3B1*
 - Anomalías cromosómicas típicas, por CG o FISH (+8, -7, 5q-, 20q-, otras)
-

C. Co-criterios

(cuando se cumple A pero no B, y presenta clínica)

- Alteraciones histológicas en la BO características de SMD
 - Fenotipo atípico en MO por citometría de flujo
 - Datos moleculares de clonalidad (detectados por secuenciación)
-

SMD: síndromes mielodisplásicos; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; CG: cariotipo; FISH: hibridación in situ fluorescente; BO: biopsia ósea.

Modificado de: Valent P et al. Leuk Res. 2011.³⁰

Anexos_2. Clasificación de los SMD según la OMS 2017

	Lineas displásicas	Citopenias ^a	Sideroblastos en anillo	Blastos en SP	Blastos en MO	Bastones de Auer	Citogenética
SMD-DU	1	1 - 2	<15%/<5% ^b	<1%	<5%	No	Cualquiera a menos que cumpla criterios de SMD con del(5q) aislada
SMD-DM	2 - 3	1 - 3	<15%/<5% ^b	<1%	<5%	No	Cualquiera a menos que cumpla criterios de SMD con del(5q) aislada
SMD-SA							
SMD-SA-DU	1	1	<15%/<5% ^b	<1%	<5%	No	Cualquiera a menos que cumpla criterios de SMD con del(5q) aislada
SMD-SA-DM	2 - 3	1 - 3	<15%/<5% ^b	<1%	<5%	No	Cualquiera a menos que cumpla criterios de SMD con del(5q) aislada
SMD con del(5q) aislada	1 - 3	1 - 2	Ninguno o alguno	<1%	<5%	No	Del(5q) solo o con una anomalía adicional excepto -7 o del(7q)
SMD-EB							
SMD-EB-1	1 - 3	1 - 3	Ninguno o alguno	2 - 4% o 5-9%		No	Cualquiera
SMD-EB-2	1 - 3	1 - 3	Ninguno o alguno	5 - 19% o 10-19%		Si/No	Cualquiera
SMD inclasificable							
Con 1% de blastos en SP	1 - 3	1 - 3	Ninguno o alguno	1% ^c	<5%	No	Cualquiera
Con displasia en una línea y pancitopenia	1	3	Ninguno o alguno	<1%	<5%	No	Cualquiera
Basado en alteraciones citogenéticas	0	1 - 3	<15% ^d	<1%	<5%	No	Anomalía citogenética definitoria de SMD

^aLas citopenias se definen como: hemoglobina <10 g/dL, plaquetas <100x10⁹/L, neutrófilos <1,8x10⁹/L.

^bSi hay mutaciones de *SF3B1*.

^cRecuento de 1% de blastos debe realizarse en al menos dos ocasiones separadas.

^dLos casos con ≥15% de sideroblastos en anillo tienen por definición displasia eritroide significativa.

^eLa presencia de bastones de Auer en blastos define cualquier tipo de SMD como SMD-EB-2 independientemente del porcentaje de blastos.

SMD: síndrome mielodisplásico; SMD-DU: síndrome mielodisplásico con displasia unilínea; SMD-DM: síndrome mielodisplásico con displasia multilínea; SMD-SA: síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo; SMD-SA-DU: síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo y displasia unilínea; SMD-SA-DM: síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo y displasia multilínea; SMD con del(5q) aislada: síndrome mielodisplásico con deleción del 5q aislada; SMD-EB: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos; SMD-EB-1: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos 1; SMD-EB-2: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos 2; SP: sangre periférica; MO: médula ósea.

Modificado de: Hasserjian RP et al. 2017¹²

Anexos_3. Clasificación pronóstica de los SMD según el IPSS-R

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

Grupo de riesgo:

Muy bajo: 0 -1,5 puntos.

Bajo: <1,5-3 puntos.

Intermedio: >3-4,5 puntos.

Alto: >4,5-6 puntos.

Muy alto: >6 puntos.

Categorías de 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) (excepto -7 o del(7q)).

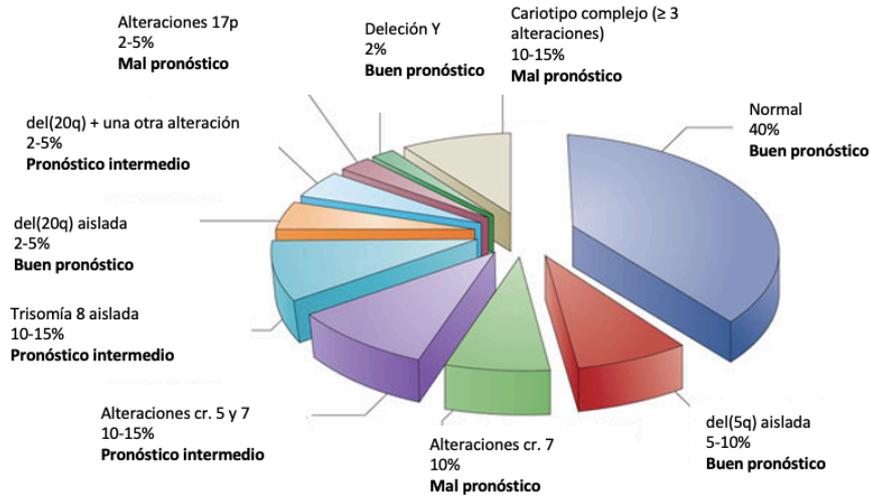
Intermedio: del(7q), +8, +19, i(17q) aislada y cualquier otra anomalía única o doble en clones independientes.

Pobre: -7 e inv(3)/t(3q)/del(3q) aisladas, anomalías dobles que incluyen -7/del(7q) y anomalías complejas con 3 anomalías.

Muy pobre: anomalías complejas con >3 anomalías (cariotipo complejo).

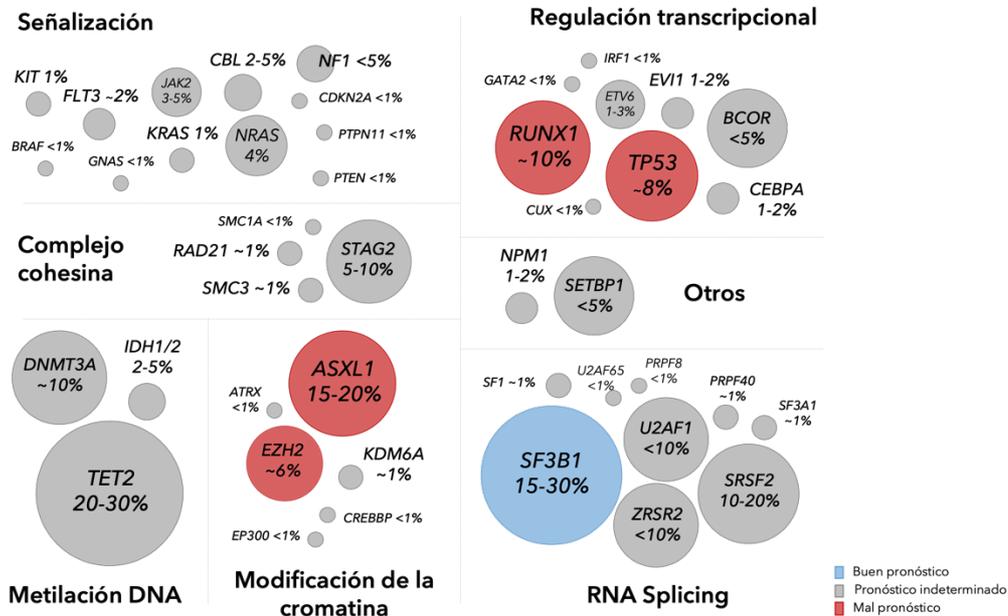
Modificado de: Greenberg PL et al. Blood. 2012¹³

Anexos_4. Alteraciones cromosómicas en los SMD y su pronóstico



Modificado de: Raza A et al. Nat Rev Cancer. 2012³¹

Anexos_5. Panorama de las mutaciones implicadas en los SMD, sus vías asociadas y su implicación clínica



En color azul la única mutación favorable, en rojo las desfavorables y en gris las de significación incierta

Modificado de: Steensma DP. Mayo Clin Proc. 2015³²

Anexos_6. Características demográficas y clínicas principales de la serie de estudio

Variable	%	Mediana	Percentiles	
			p10	p90
Edad (años)		74,6	56,3	84,8
Género				
Hombre	58,9			
OMS (2017)				
SMD-DU	4,8			
SMD-DM	29,1			
SMD-SA-DU/DM	25,5			
SMD-EB-1	13,7			
SMD-EB-2	14,9			
SMD del(5q)	9,6			
SMD inclas.	2,4			
Blastos MO (%)		1,5	0,0	10,0
<i>Categorías IPSS-R</i>				
≤2	62,6			
>2<5	14,5			
≥5<10	13,2			
>10	9,7			
Sideroblastos en anillo (%)		0,0	0,0	62,0
Displasia				
<i>Número de displasias</i>				
Una serie	17,5			
Dos series	33,0			
Tres series	48,8			
<i>Tipo de displasia</i>				
Eritroide	79,5			
Granulocítica	69,7			
Megacariocítica	65,3			
Hb (g/dL)		9,9	7,5	12,6
<i>Categorías IPSS-R</i>				
≥10	48,9			
≥8<10	35,3			
<8	15,8			
Plaquetas (<100 x 10⁹/L)		152,0	45,0	354,2
<i>Categorías IPSS-R</i>				
≥100	66,4			
≥50<100	22,4			
<50	11,2			
Neutrófilos (<100 x 10⁹/L)		1,9	0,7	4,5
<i>Categorías IPSS-R</i>				
≥0,8	87,3			
<0,8	12,7			
Leucocitos (<100 x 10⁹/L)		4,0	2,3	7,7
Monocitos (<100 x 10⁹/L)		0,3	0,1	0,9
Categorías Riesgo, IPSS-R				
Muy bajo	27,0			
Bajo	43,9			
Intermedio	15,5			
Alto	7,9			
Muy alto	5,6			
Progresión LAM				
No	71,2			
Si	28,8			
Status, último seguimiento				
Exitus	47,5			
Vivo	50,1			
Pérdida de seguimiento	2,4			
Seguimiento (meses)		28,1	5,9	82,4

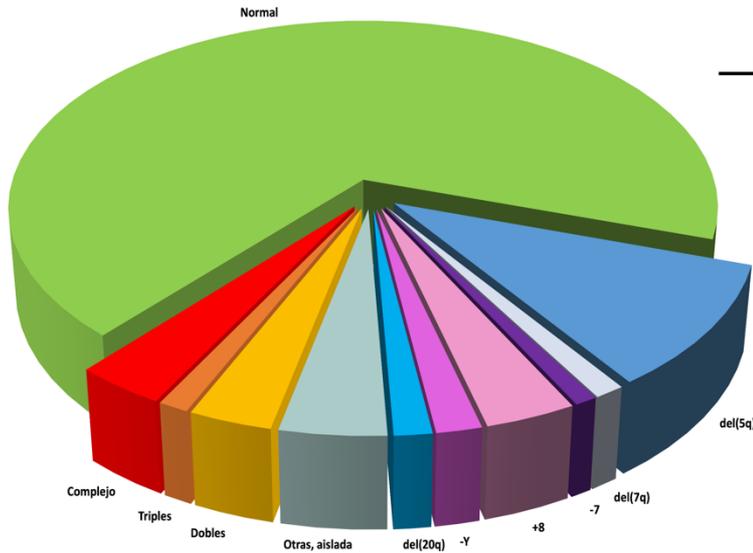
Anexos_7. Metodología: Citogenética Convencional (cariotipo y FISH)

El análisis del cariotipo tiene como finalidad detectar anomalías en el número y/o estructura de los cromosomas. Para ello, a partir de una muestra de MO o SP, se cultivan las células en un medio adecuado obteniéndose células en división, que son tratadas con colchicina para que se mantengan en este estado permanentemente. Esto es muy importante, ya que una de las limitaciones del cariotipo es que los cromosomas deben de ser visibles, y esto sólo es posible durante la fase de mitosis. Posteriormente, se utilizan tintes específicos que colorean las diferentes regiones cromosómicas para que puedan ser visualizadas y fotografiadas bajo el microscopio óptico, obteniéndose el llamado cariograma.¹⁰

La técnica de FISH tiene como objetivo detectar anomalías en los cromosomas mediante el uso de secuencias de DNA, llamadas “sondas”, que son homólogas a las regiones de los cromosomas que se quieren estudiar, y que están marcadas con un fluorocromo. Dichas sondas se unen por complementariedad a unos lugares específicos dentro del DNA, y emiten fluorescencia, la cual puede ser analizada mediante un microscopio. La gran utilidad de esta técnica radica en que es válida tanto en células que se encuentran en metafase como en interfase del ciclo celular (no solamente en fase de división) y permite detectar anomalías genómicas con una alta resolución, siendo una técnica más sensible y específica. Sin embargo, es necesario seleccionar las regiones de interés con anterioridad. Las sondas que se utilizan en el estudio diagnóstico de los SMD son aquellas que permiten el análisis de las regiones 5q, 7q, centrómero del cromosoma 8 y 20q.¹²

Anexos_8. Alteraciones citogenéticas detectadas en la serie de estudio (A) y categorías de riesgo según el IPSS-R (B)

A



B

Categoría Riesgo citogenético, IPSS-R	%
Muy favorable	4,2
Favorable	80,2
Intermedio	9,4
Adverso	3,1
Muy adverso	3,1

Anexos_9. Metodología: Secuenciación Masiva (NGS)

En este anexo se describen los diferentes pasos que se llevan a cabo para el estudio de secuenciación masiva (NGS), desde la extracción de la muestra, preparación de la librería, secuenciación y análisis de los resultados. Como ya se ha indicado, los estudios de NGS se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular en Oncohematología, en el Centro de Investigación del Cáncer / Edificio Multiusos I+D+i.

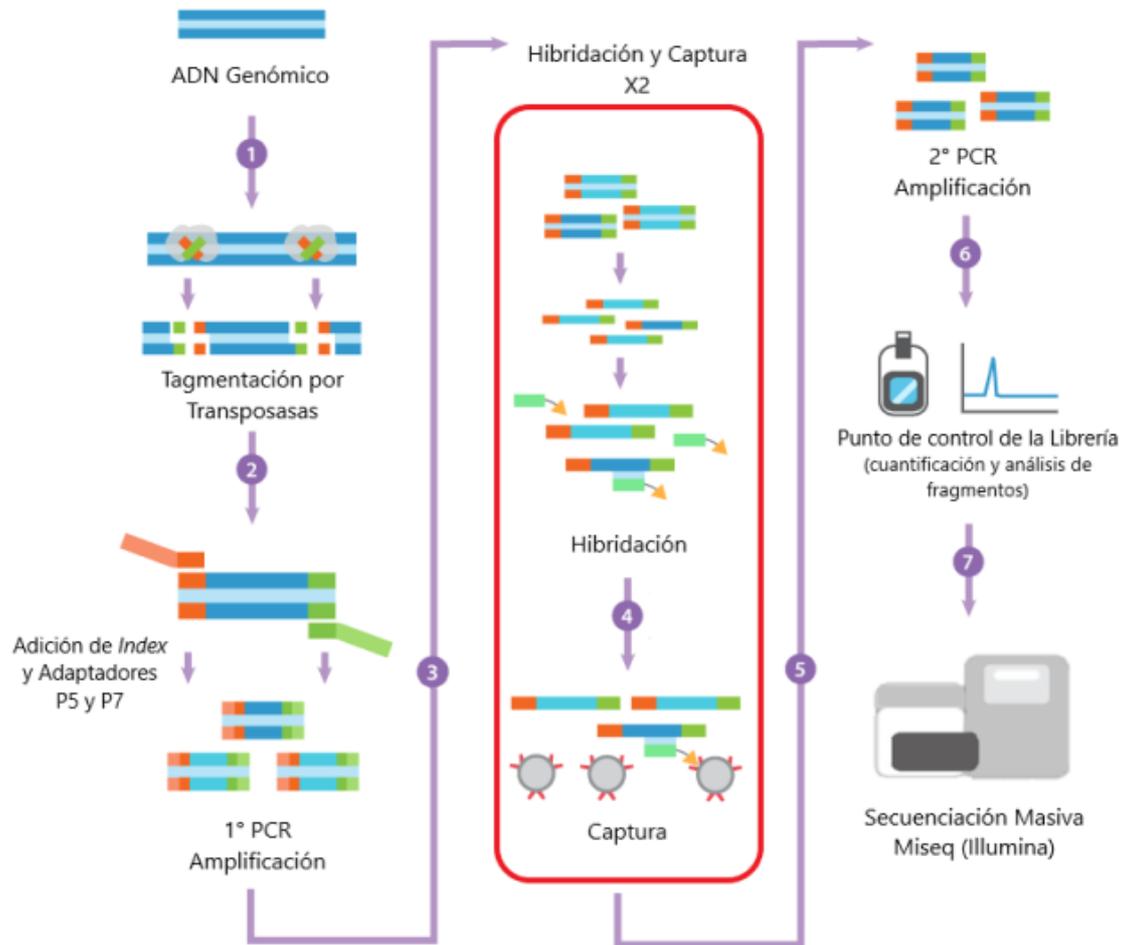
Para el estudio de la secuenciación masiva (NGS) se extrajo el material genético (DNA) de muestras (células mononucleadas en su gran mayoría) procedentes de MO y SP, recogidas al momento del diagnóstico de todos los pacientes incluidos en la serie de estudio. La extracción del material genético se realizó con un kit comercial denominado *AllPrep® DNA/RNA MiniKit (Qiagen)*.

La secuenciación masiva se llevó a cabo mediante la estrategia de captura de secuencia, *Nextera Rapid Custom Enrichment (Illumina)* y las plataformas de secuenciación MiSeq y NextSeq (*Illumina*), e incluye varios pasos:

9.1. Preparación de la librería, hibridación, captura y secuenciación de las regiones de interés

La secuenciación por síntesis se inicia con la fragmentación del DNA en 300 pares de bases mediante una enzima específica denominada transposasa (*figura, paso 1*), que va añadiendo simultáneamente a los extremos del DNA unos moldes que permiten la unión posterior de los adaptadores P5 y P7, necesarios para la unión de los fragmentos de DNA a la placa de secuenciación “*flow cell*” (*figura, paso 2*).

En este punto del proceso, se dispone de un conjunto de fragmentos de DNA que corresponden a todo el genoma. Sin embargo, mediante el empleo de un panel de NGS personalizado y la estrategia de captura de secuencia, lo que interesa es el análisis de una serie de genes específicos. Para este trabajo se utilizó un panel de diseño propio del laboratorio que permite el análisis de 117 genes asociados con neoplasias hematológicas mieloides. Este panel permite la secuenciación mediante el empleo de 3.259 sondas de 499 Kb distribuidas en 1.765 regiones de interés. Para ello, se realiza la hibridación con el panel de NGS, que contiene las sondas complementarias a las regiones de interés marcadas con biotina. Tras la hibridación, se utilizan unas bolas magnéticas marcadas con streptavidina, que, gracias a su afinidad por la biotina, permiten la captura de exclusivamente dichas regiones (*figura, pasos 3 y 4*). Posteriormente se amplifican los fragmentos capturados (*figura, paso 5*). Los pasos siguientes ya tienen lugar dentro del secuenciador e incluyen la unión de los fragmentos de DNA de la muestra a la superficie de la *flow cell*, su amplificación clonal en lo que se denomina generación de *clusters*, y finalmente la secuenciación propiamente dicha (*figura, paso 7*).



Técnica por pasos de la secuenciación masiva (NGS)

Modificado de: www.abmgood.com

9.2. Análisis de los datos de secuenciación, filtrado e interpretación de las variantes

Los datos resultantes una vez completado el proceso de secuenciación, en formato de ficheros FASTQ, son procesados para, en primer lugar, realizar un control de calidad de la secuenciación y de las lecturas obtenidas (*FastQC*). Este programa genera una serie de gráficos y test estadísticos que muestran el número y calidad de las lecturas, número y calidad de las bases, etc.

A continuación, estos ficheros FASTQ son procesados mediante un análisis ya automatizado en el laboratorio que realiza el alineamiento con el genoma de referencia

(*BWA* y *GATK*), recalibración, detección de las variantes (*VarScan* y *SAMTools*) y la anotación de las mismas (*ANNOVAR*).

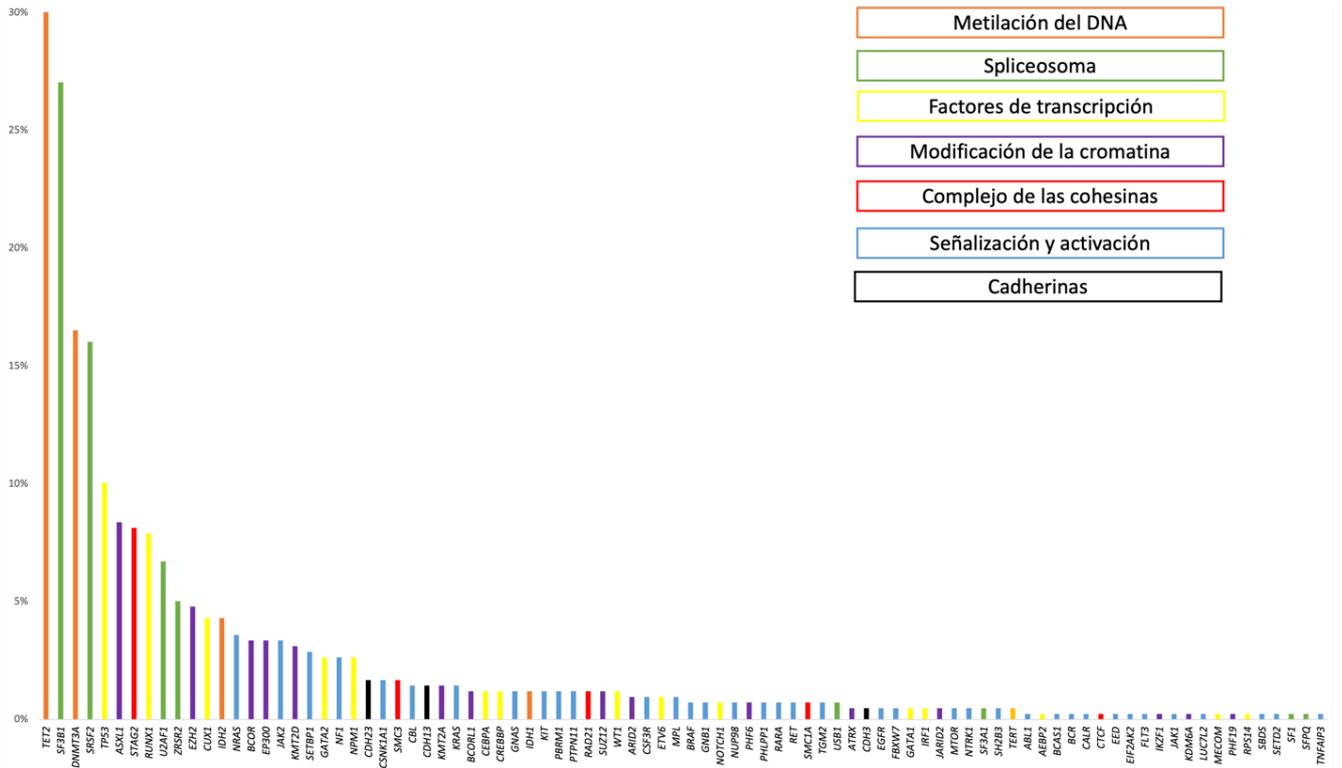
En un tercer paso, se realiza el análisis, filtrado e interpretación de las variantes obtenidas. El objetivo es la selección de aquellas variantes secuenciadas con buena calidad y cobertura suficiente: Q (calidad) de >30, ≥ 50 -100 lecturas totales y ≥ 10 -20 lecturas mutadas; la eliminación de posibles artefactos de secuenciación; la identificación y filtrado de los polimorfismos, variantes descritas en la población normal con una frecuencia $\geq 1\%$ (*dbSNP*, *1000 Genomes*, *ExAC*, *ESP 6500*, entre otras); y finalmente la selección de aquellas variantes que puedan ser consideradas clínicamente relevantes. Para este último paso, se seleccionan todas aquellas variantes, habiendo pasados los filtros anteriores, que están localizadas en regiones exónicas y de *splicing*, que dan lugar a un cambio de aminoácido, y que, además, tienen un efecto dañino para la función de la proteína (predictores *SIFT* y *PolyPhen-2*, entre otros). Se utilizaron también las bases de datos *COSMIC*, *ClinVar* y *Varsome* para seleccionar aquellas mutaciones ya descritas en cáncer, asociadas con alguna enfermedad y consideradas patogénicas o de significado incierto. Durante el proceso se utilizó también el visualizador *Integrative Genomic Viewer* (IGV, *Broad Institute*)³³ que permite la inspección visual de las lecturas y localización de las variantes de interés.

Los genes incluidos en el panel de diseño propio del laboratorio para neoplasias hematológicas mieloides son los siguientes:

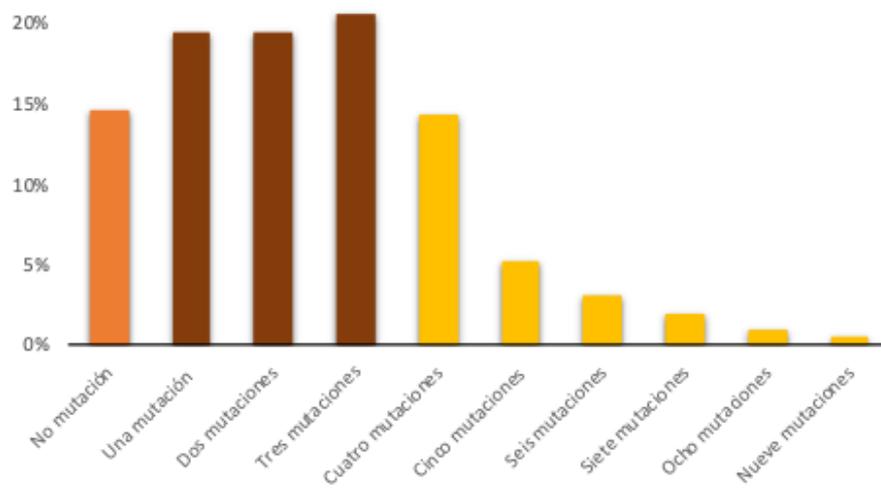
ABL1	CBLC	EED	HRAS	MECOM	PHF19	SF1	TET2
AEBP2	CD177	EGFR	IDH1	KMT2A	PHF6	SF3A1	TGM2
ARID2	CDH13	EIF2AK2	IDH2	KMT2D	PHLPP1	SF3B1	TIMM50
ASXL1	CDH23	ENG	IKZF1	MPL	PTEN	SFPQ	TNFAIP3
ATRX	CDH3	EP300	IL3	MTOR	PTPN1	SH2B3	TP53
BCAS1	CDK2	ETV6	IRF1	NF1	PTPN11	SMC1A	TYK2
BCOR	CDKN2A	EZH2	JAK1	NOTCH1	RAD21	SMC3	U2AF1
BCORL1	CEBPA	FBXW7	JAK2	NPM1	RARA	SPARC	UMODL1
BCR	CREBBP	FLT3	JAK3	NRAS	RET	SRSF2	USB1
BMI1	CSF3R	G3BP1	JARID2	NR2F6	RPS14	STAG1	WASF3
BRAF	CSNK1A1	GATA1	JKAMP	NTRK1	RUNX1	STAG2	WT1
CALR	CTCF	GATA2	KDM6A	NUP98	SALL4	SUZ12	ZRSR2
CBF3	CTNNA1	GCAT	KIT	PBRM1	SBDS	TCL1B	
CBL	CUX1	GNAS	KRAS	PDGFRA	SETBP1	TERC	
CBLB	DNMT3A	GNB1	LUC7L2	PDGFRB	SETD2	TERT	

Anexos_10. Incidencia (A) y número (B) de mutaciones de la serie de estudio

A



B



Anexos_11. Incidencia de las mutaciones en *U2AF1* en los diferentes subtipos de anomalías del cromosoma 7

