

**Universidad de Salamanca**

**Departamento de Medicina**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**IMPACTO DE LAS MUTACIONES  
SOMÁTICAS EN PACIENTES CON  
SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS  
SOMETIDOS A DISTINTAS MODALIDADES  
DE TRATAMIENTO**

**Tesis doctoral**

Juan Carlos Caballero Berrocal

Salamanca, 2020



Dña. María Díez Campelo, Doctora en Medicina y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca

Dña. María Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán, Doctora en Medicina y Catedrática del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

D. Jesús María Hernández Rivas, Doctor en Medicina, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D. Juan Carlos Caballero Berrocal, titulado "IMPACTO DE LAS MUTACIONES SOMÁTICAS EN PACIENTES CON SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS SOMETIDOS A DISTINTAS MODALIDADES DE TRATAMIENTO", reúne las condiciones de originalidad y calidad científica requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 14 de octubre de 2020.

Dña. María Díez Campelo



Dña. María Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán



D. Jesús María Hernández Rivas





*A mi abuelo*



# **AGRADECIMIENTOS**





A María Díez Campelo, por su guía, paciencia, comprensión y ánimo constantes, y por haber confiado inmerecidamente en mí.

A la Dra. del Cañizo, de la que tanto he aprendido, por haberme puesto en la senda de este proyecto.

Al Dr. Hernández Rivas y a los investigadores del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, en particular a Mónica, María, Kamila, Jesús y Marta, por el extraordinario trabajo realizado con la secuenciación, sus explicaciones y su ayuda siempre desinteresada.

A Mercedes Sánchez Barba, por su inestimable aportación con la estadística y sus valiosos consejos.

Al servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, a mis compañeros de residencia y, sobre todo, a Julio y a Sara, cuya amistad y compañía han sido para mí un bálsamo en el camino.

A mis padres, por su desvelo incondicional. Sin ellos nunca habría llegado a ser lo que soy hoy.

Y a Sonia, víctima colateral de estos cinco años de trabajo, por haberme soportado, comprendido y apoyado hasta el final.



# ÍNDICE



1. Introducción	
1.1. Evolución histórica de los síndromes mielodisplásicos .....	18
1.2. Citogenética en los síndromes mielodisplásicos .....	21
1.3. Epidemiología y diagnóstico de los síndromes mielodisplásicos.....	23
1.4. Pronóstico de los síndromes mielodisplásicos .....	25
1.5. Tratamiento de los síndromes mielodisplásicos.....	28
1.5.1. <i>Síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo</i> .....	29
1.5.2. <i>Síndromes mielodisplásicos de alto riesgo</i> .....	32
1.6. Mutaciones somáticas en los síndromes mielodisplásicos.....	35
1.6.1. <i>Pronóstico de las mutaciones somáticas</i> .....	36
1.6.2. <i>Mutaciones somáticas e índices pronósticos</i> .....	46
1.6.3. <i>Hematopoyesis clonal</i> .....	47
1.6.4. <i>Evolución clonal</i> .....	49
1.6.5. <i>Mutaciones y respuesta al tratamiento en los síndromes mielodisplásicos</i> .....	52
2. Hipótesis y objetivos	
2.1. Hipótesis .....	59
2.2. Objetivos .....	61
3. <b>Capítulo 1:</b> Efectos de las mutaciones somáticas en pacientes con síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo tratados con agentes estimulantes de la eritropoyesis. Resultados del estudio SPRESAS .....	63
3.1. Material y métodos .....	65
3.2. Resultados .....	68
3.3. Discusión.....	81
4. <b>Capítulo 2:</b> Impacto de las mutaciones somáticas en pacientes con síndromes mielodisplásicos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y papel de la enfermedad injerto contra receptor .....	85
4.1. Material y métodos .....	89

4.2. Resultados .....	91
4.3. Discusión.....	102
5. <b>Capítulo 3:</b> Perfil mutacional en la recaída y evolución clonal de los pacientes con síndromes mielodisplásicos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.....	105
5.1. Material y métodos .....	107
5.2. Resultados .....	109
5.3. Discusión.....	125
6. Conclusiones.....	131
7. Bibliografía .....	137
8. Abreviaturas.....	155
9. Listado de tablas y figuras.....	161

# **INTRODUCCIÓN**





## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la clasificación de las neoplasias hematológicas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los *Síndromes Mielodisplásicos* (SMD) constituyen un conjunto de enfermedades clonales de la célula madre hematopoyética caracterizado por citopenias, displasia en una o más líneas mieloides, hematopoyesis ineficaz y aumento del riesgo de progresión a Leucemia Mieloide Aguda (LMA).(1) Esta definición reúne las principales características clínicas y biológicas de los SMD, pero en el pasado no siempre estuvo clara la línea que los separaba de otras patologías con características en común, como las leucemias agudas, las insuficiencias medulares o las neoplasias mieloproliferativas crónicas. Debido a la ausencia de rasgos patognomónicos, esto es, inequívocamente específicos, el diagnóstico de los SMD continúa basándose, desde hace décadas, en la microscopia óptica, con lo que ésta tiene de subjetividad y de variabilidad entre observadores, y en la exclusión de causas alternativas de citopenia o displasia, de ahí la necesidad de incorporar otras técnicas, como la citogenética, la biología molecular o la citometría de flujo, que contribuyan a confirmar el origen clonal de la enfermedad y a despejar las dudas que con frecuencia arroja la citomorfología.(2) Al mismo tiempo, la gran heterogeneidad en el comportamiento clínico de los SMD, fruto de la implicación de mecanismos fisiopatológicos diversos, ha llevado a priorizar el desarrollo de herramientas pronósticas que ayuden a tomar decisiones individualizadas. Además, la escasa respuesta de los SMD a los tratamientos convencionales obliga a la búsqueda constante de alternativas terapéuticas, especialmente aquellas adaptadas al perfil genético de cada paciente.

A lo largo de la presente introducción realizaremos, en primer lugar, un recorrido a través de la historia de los SMD, lo que nos permitirá entender mejor su compleja fisiopatología y las dificultades que entraña su diagnóstico. Luego, exploraremos el papel que ha desempeñado la citogenética en el diagnóstico y el pronóstico de los SMD. Continuaremos con una exposición de los aspectos más relevantes de la epidemiología, el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de los SMD en la actualidad. Finalmente, trataremos en profundidad el papel que desempeña actualmente la biología molecular y cómo las mutaciones somáticas, objeto de nuestro estudio, nos pueden ayudar a mejorar el diagnóstico, refinar el pronóstico y optimizar el tratamiento de estos pacientes.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Fue Cornelius Parker Rhoads quien, en 1938, empleó por primera vez el término *anemia refractaria* para referirse a un tipo de anemia que no respondía al tratamiento con hierro o extracto de hígado, empleado entonces en el tratamiento de la anemia megaloblástica, debido a su alto contenido en vitamina B12, además de otros nutrientes, como hierro y ácido fólico.(3) Sin embargo, de los 100 casos referidos por Rhoads a la *American Medical Association*, posiblemente solo eran verdaderos SMD menos del 10%, en tanto que el resto correspondía a aplasias medulares, mielofibrosis, leucemias agudas, hepatopatías u otras neoplasias.(4) Desde entonces, el vocablo, ampliamente utilizado hasta nuestros días, ha coexistido con otras denominaciones menos exitosas, aunque igualmente imprecisas, como preleucemia, anemia pseudoaplásica, leucemia smoldering o síndrome dismielopoyético<sup>1</sup>.

El término *preleucemia* parece haber sido usado por primera vez en 1953 por Matthew Block, quien examinó la médula ósea de 12 pacientes que habían desarrollado leucemia aguda tras un período de “latencia” de entre 3 y 17 meses.(5,6) Todos ellos presentaban citopenias, es decir, disminución del número de células sanguíneas, principalmente anemia con reticulocitos bajos, y una médula ósea frecuentemente hipercelular y con defectos madurativos (displasia), especialmente en la serie granulocítica. Otros autores reportaron casos similares, como Richard W. Vilter, quien en 1960 confirmó estos mismos hallazgos en 23 pacientes.(7) Enfermedades como la aplasia medular o la hemoglobinuria paroxística nocturna fueron englobadas bajo la común denominación de preleucemia durante años, debido a que la frecuencia de leucemia aguda en estos pacientes era inusualmente elevada en comparación con la población normal.(8–10) Jack J. Rheingold, en 1963, acuñó el término *leucemia smoldering*, que describía un tipo de leucemia con un curso más benigno y prolongado, caracterizado por anemia, trombopenia o leucopenia, hiperplasia medular con escasa presencia de células hematopoyéticas inmaduras (blastos) y displasia.(11)

Janet D. Rowley, en 1966, distinguió tres tipos de síndrome preleucémico: la aplasia medular, los síndromes mieloproliferativos y los *myelodysplastic disorders*.(12) William B. Fisher, en un artículo de 1973 titulado *Preleukemia*, propuso utilizar el término mielodisplasia en lugar de preleucemia, dado que no todos los pacientes incluidos en esta categoría acababan desarrollando leucemia.(13) Por su parte, Harriet S. Gilbert y William Dameshek, propusieron en 1970 la denominación *síndrome mielodisplásico*

---

<sup>1</sup> Término empleado por la clasificación del grupo FAB de las leucemias aguda de 1976.

## INTRODUCCIÓN

para todos aquellos trastornos hematopoyéticos que cursaban con anomalías en el desarrollo de los precursores hematopoyéticos, lo que incluía a los síndromes mieloproliferativos (actualmente renombrados como neoplasias mieloproliferativas) y a los síndromes mielodisplásicos propiamente dichos y entidades afines, que estarían originados por la interrupción de la hematopoyesis normal, ocasionando un aumento de precursores inmaduros o un defecto en la producción de células hematopoyéticas (hematopoyesis ineficaz).(14) Matti I. Saarni, quien seguía decantándose por el término *preleucemia* a pesar de las objeciones de algunos autores que lo consideraban demasiado “despectivo”, resumió las principales características morfológicas de los SMD: anemia refractaria u otras citopenias, médula normalmente hipercelular y displasia.(15)

La clasificación de las leucemias agudas del Grupo Cooperativo Franco-Américo-Británico (FAB) de 1976 empleaba el término *síndrome dismielopoyético* para referirse a “*disorders associated with bone-marrow hypercellularity in which confusion with acute myeloid leukaemia is possible*”, haciendo hincapié en que la necesidad de tratamiento en estos casos podía ser no tan urgente como en las leucemias agudas propiamente dichas. Esta nueva entidad fue dividida en dos categorías: la Anemia Refractaria con Exceso de Blastos (AREB) y Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC). La primera incluía lo que hasta ese momento algunos denominaban ‘*preleukaemia*’, ‘*smouldering leukaemia*’, ‘*subacute leukaemia*’ o ‘*atypical leukaemia*’, y se caracterizaba por hiperplasia medular y diseritropoyesis, pudiendo presentar también disgranulopoyesis (degranulación, núcleos pseudo-Pelger) y/o distrombopoyesis (formas monolobuladas, micromegacariocitos), mientras que la LMMC se caracterizaba por monocitosis e hiperplasia del compartimento gránulo-monocítico. En ambos casos, el porcentaje de blastos en la médula ósea no debía superar el 30%, en cuyo caso el diagnóstico sería de LMA, al margen de cualquier otra consideración.(16)

En 1982, el grupo FAB creó una nueva clasificación de los ya definitivamente rebautizados como *síndromes mielodisplásicos*, que seguía incluyendo la LMMC y la AREB, que se dividió en AREB y AREB en transformación (AREB-T) según el porcentaje de blastos fuera inferior o superior, respectivamente, al 20%. A éstas se añadieron la Anemia Refractaria propiamente dicha (AR) y la Anemia Refractaria con Sideroblastos en Anillo (ARSA). Para establecer el diagnóstico de síndrome mielodisplásico se tuvieron en cuenta en aquel momento la presencia de displasia significativa, el porcentaje de blastos en médula y sangre periférica y la existencia de

## INTRODUCCIÓN

sideroblastos en anillo (eritroblastos con depósito perinuclear de gránulos de hemosiderina) en proporción superior o igual al 15%. Los rasgos displásicos de las tres series fueron minuciosamente definidos para garantizar el máximo de concordancia en la observación de las extensiones de médula ósea y evitar así errores diagnósticos.(17)

En 1999 las OMS realizó una clasificación de las neoplasias hematológicas que eliminaba la categoría AREB-T, rebajando así el porcentaje mínimo de blastos para establecer el diagnóstico de LMA del 30 al 20%, e incorporaba tres nuevas entidades: la Citopenia Refractaria con Displasia Multilínea (CRDM), el Síndrome 5q- y el SMD inclasificable. La LMMC fue transferida a un nuevo grupo: el de los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/NMP).(18)

Como ya se ha apuntado, uno de los rasgos distintivos de los SMD es el riesgo de progresión a LMA. Las primeras investigaciones realizadas en estos pacientes condujeron a los hematólogos a preguntarse si la existencia de *preleucemia* era condición *sine qua non* para desarrollar leucemia.(13,14) Los expertos parecían dividirse entre 2 modelos explicativos: el *preleucémico*, que interpretaba que los SMD formaban parte de la misma entidad que la LMA, pero en un estadio evolutivo anterior a ésta, y el *displásico*, según la cual los SMD no serían trastornos malignos *per se*, pero debido a eventos clonales en su desarrollo algunos pacientes acabarían transformándose.(19) Hoy sabemos que el riesgo de progresión a LMA se sitúa en torno al 30%, aunque varía ampliamente entre los SMD de bajo y alto riesgo.(20) La transformación leucémica parece ser el resultado de la acumulación de errores genéticos, que confieren a las células mutadas (clon) una ventaja selectiva sobre el tejido hematopoyético sano; una vez alcanzada esta fase, la enfermedad presenta una evolución rápida y agresiva y un pronóstico especialmente desfavorable, incluso con tratamiento.

El anterior repaso histórico nos ha permitido examinar la complejidad del diagnóstico de los SMD. La actual clasificación de la OMS, de 2017, ha desterrado el concepto de *anemia refractaria*, con el que iniciamos este recorrido, considerado obsoleto e impreciso, y ha optado por la común denominación de SMD en todos los casos, de tal forma que reconoce las siguientes entidades diagnósticas: SMD con displasia unilínea (SMD-DU), SMD con displasia multilínea (SMD-DM), SMD con sideroblastos en anillo (SMD-SA) con displasia uni o multilínea, SMD con exceso de blastos tipo 1 (SMD-EB 1, 5-9% de blastos), SMD con exceso de blastos tipo 2 (SMD-EB 2, 10-19% de blastos), SMD con delección 5q aislada y SMD inclasificable, sin olvidar los SMD/NMP,

## INTRODUCCIÓN

como la LMMC y el SMD/NMP con sideroblastos en anillo y trombocitosis (SMD/NMP-SA-T), que ha sido recientemente incorporado a esta clasificación. Estas nuevas denominaciones tratan de aportar claridad y de simplificar el diagnóstico, pero casi todas ellas están basadas en la citología óptica, que aunque fundamental, resulta insuficiente no sólo para diagnosticar, sino para establecer un pronóstico adecuado, de ahí la importancia que tuvo la citogenética a la hora de comprender mejor la fisiopatología de los SMD y lograr un manejo más adecuado de estos pacientes.

### 1.2. CITOGÉNÉTICA EN LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

La técnica del cariotipado y su aplicación al estudio de los tumores se desarrollaron en los años 50. En 1960, Nowel y Hugerford descubrieron la primera alteración citogenética específicamente relacionada con una neoplasia humana: el cromosoma Philadelphia, un cromosoma de tamaño diminuto que parecía corresponder a un cromosoma 22 que había perdido la mayor parte del brazo largo y que se encontraba virtualmente en todos los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC).(21,22) Aunque no se dudó en considerar esta alteración como el evento inicial en el desarrollo de la enfermedad, dada su altísima especificidad, tales hallazgos no pudieron ser extrapolados a otras neoplasias hematológicas, en que las alteraciones citogenéticas, más que la causa, parecían eventos secundarios relacionados con la progresión de la enfermedad. Los mismos autores describieron en 1962 varias alteraciones citogenéticas en pacientes con LMA, aunque ninguna de ellas era específica.(23) En 1966, Rowley describió los hallazgos citogenéticos de tres pacientes con *preleucemia*: en los 3 casos se detectaron anomalías numéricas de cromosomas del grupo C.(12)

En 1970 aparecieron las técnicas de bandeo cromosómico (bandas Q y bandas G), que permitían reconocer regiones concretas en los cromosomas, lo que hizo posible su correcta identificación, así como la de la mayoría de anomalías citogenéticas numéricas y estructurales, como deleciones, adiciones, translocaciones, monosomías, hiperdiploidías, etc. En años posteriores, se identificaron varias alteraciones citogenéticas recurrentes en pacientes con SMD, algunas de las cuales ya habían sido descritas en LMA, como la monosomía 5 (-5), la deleción 5q (5q-), la monosomía 7 (-7), la deleción 7q (7q-), la pérdida del cromosoma Y (-Y), la deleción 20q (20q-), la trisomía 8 (+8) y el cariotipo complejo, definido como la presencia de 3 o más alteraciones citogenéticas.(19,24,25) Aunque ya se había observado que la presencia

## INTRODUCCIÓN

de alteraciones citogenéticas parecía asociarse a un mayor riesgo de progresión leucémica en pacientes con *preleucemia*,<sup>(26)</sup> dos estudios realizados por Jorge J. Yunis y Renee H. Jacobs en 1986 demostraron que los pacientes con SMD que tenían un cariotipo anormal presentaban una mayor incidencia de progresión a LMA y una menor supervivencia independientemente del subtipo FAB, siendo el cariotipo complejo la alteración de peor pronóstico, seguida de -7 o 7q-.<sup>(27,28)</sup> En 1974 Herman Van den Berghe describió 3 casos de SMD con delección del brazo largo del cromosoma 5 (5q-) como alteración citogenética aislada y un fenotipo característico, consistente en anemia macrocítica con hipoplasia de serie roja y megacariocitos monobulados, lo que consituyó el descubrimiento del primer SMD asociado a una alteración genética específica, el *síndrome 5q-*, un importantísimo avance en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad.<sup>(25,29)</sup>

Estudios posteriores han evidenciado que el porcentaje de anomalías citogenéticas en los SMD se sitúa en torno al 50%, aunque este porcentaje varía según las series estudiadas y el subtipo de SMD, siendo más frecuentes entre los pacientes con exceso de blastos. La alteración citogenética más frecuente es la delección 5q, que se encuentra hasta en el 15% de los SMD, siendo el punto de rotura cromosómica más común el situado en 5q33.1, asociado al síndrome 5q-; por el contrario, el punto 5q31 se asocia a SMD relacionado con el tratamiento (agentes citotóxicos o radiaciones ionizantes) o a LMA con displasia. Las alteraciones del cromosoma 7 (-7/7q-) son también frecuentes (10%) y se asocian a mal pronóstico y a SMD relacionado con el tratamiento, donde su frecuencia alcanza el 50% de los casos. La trisomía 8 es la única amplificación recurrente en los SMD y presenta un pronóstico intermedio. La pérdida del cromosoma Y, en varones, y la delección 20q se asocian a buen pronóstico y son útiles para confirmar clonalidad y monitorizar la respuesta al tratamiento. Otras alteraciones citogenéticas frecuentes son 11q- y 12q-.<sup>(30–33)</sup>

Los métodos citogenéticos más comúnmente empleados son el cariotipo convencional y la Hibridación In Situ Fluorescente (FISH, del inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*), que enfrenta el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de la célula con sondas fluorescentes complementarias de secuencias específicas, como, por ejemplo, la región 5q33.1, ya descrita. El cariotipo es un método relativamente sencillo y barato que permite identificar la mayoría de las alteraciones citogenéticas recurrentes en los SMD, si bien requiere de amplia experiencia para su correcta interpretación. En los casos en los que no se obtienen mitosis, o el número o la calidad de las metafases es insuficiente (se recomienda evaluar al menos 20 metafases de buena calidad), se

## INTRODUCCIÓN

debe realizar FISH, que es más rápida, sensible y de fácil interpretación y puede detectar anomalías crípticas y confirmar alteraciones cromosómicas conocidas. Sin embargo, al tratarse de una técnica “dirigida”, la FISH sólo permite examinar regiones concretas, obviando el resto del genoma, por lo que no es sustitutiva del cariotipo. En general, en los SMD se aconseja el empleo de las sondas -5/5q-, -7/7q-, 20q- y C8. Sólo el cariotipo ha sido validado como técnica con valor pronóstico, por lo que debe realizarse siempre en todo paciente con sospecha de SMD y en caso de progresión, siendo la FISH una técnica complementaria de éste.(34–36)

La citogenética ha sido fundamental en la investigación de los SMD, aportando la evidencia de su naturaleza clonal y convirtiéndose en uno de los pilares de su diagnóstico, junto con la citología óptica. Sin embargo, su importancia actual reside sobre todo en su valor pronóstico, como veremos más adelante.

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS**

Los SMD tienen una prevalencia en la población general aproximada de 20 casos por cada 100.000 habitantes, con una mediana de edad al diagnóstico en torno a los 70 años, siendo su frecuencia mayor en varones que en mujeres. Su incidencia es de 3-4 casos por cada 100.000 habitantes en EEUU y Europa Occidental. Los principales factores de riesgo asociados a esta enfermedad son las radiaciones ionizantes, la exposición a agentes químicos como el benceno y los pesticidas, la quimioterapia (agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II, principalmente) y el consumo de alcohol y tabaco, así como los antecedentes familiares de neoplasia hematológica.(37,38) El riesgo de SMD se halla también aumentado en trastornos congénitos como el síndrome de Blackfan-Diamond, la disqueratosis congénita o la anemia de Fanconi.(37) Más recientemente, se han identificado SMD de la infancia secundarios a mutaciones germinales en genes como *CEBPA*, *RUNX1* o *GATA2*, todas ellas relacionadas con neoplasias mieloides.(39)

Como ya hemos mencionado, el diagnóstico de los SMD se realiza por exclusión de otras causas.(40) En un requisito que existan citopenias significativas, que suele ser el motivo de consulta habitual de estos pacientes: anemia (hemoglobina <11 g/dl), neutropenia (neutrófilos <1.5 x10<sup>9</sup>/l) y trombopenia (plaquetas <100 x10<sup>9</sup>/l). En segundo lugar, debe haber algún grado de displasia, es decir, presencia de formas

## INTRODUCCIÓN

anómalas secundarias a defectos madurativos, que suele ser más evidente en los elementos maduros, pudiendo ser inicialmente valorada en una extensión de sangre periférica. Sin embargo, ante toda sospecha de SMD, es obligatoria la realización de un aspirado de médula ósea. Ésta suele presentar una celularidad aumentada, aunque existe alrededor de un 10% de SMD hipoplásicos, pudiendo asociar un porcentaje variable de blastos de hasta el 19%. La displasia puede estar presente en número e intensidad variable en una o varias series hematopoyéticas, siendo necesaria la presencia de al menos un 10% de formas displásicas en una de las series en un conteo de al menos 200 células.(41) Algunas formas displásicas altamente sugestivas de SMD son los neutrófilos hiposegmentados (pseudo-Pelger) y degranulados, los micromegacariocitos, los eritroblastos multinucleares, PAS positivos o con puentes internucleares y los sideroblastos en anillo.(42) Ahora bien, las citopenias o la displasia no siempre son cuantitativamente significativas y pueden tener otras etiologías (estados carenciales, infecciones, trastornos hepáticos, intoxicaciones, consumo de alcohol o fármacos, envejecimiento fisiológico...), en tanto que los blastos pueden estar ausentes. La presencia de marcadores citogenéticos por cariotipo o FISH contribuye a apoyar el diagnóstico en los casos dudosos y confiere, al mismo tiempo, valor pronóstico, por lo que debe realizarse a todos los pacientes con sospecha de SMD al menos un cariotipo. La biopsia ósea resulta de utilidad en los casos en que no se obtiene grumo medular, se sospecha mielofibrosis asociada o la celularidad es baja, y permite hacer el diagnóstico diferencial con la aplasia medular o las neoplasias mieloproliferativas crónicas. La citometría de flujo, aunque no es imprescindible y su uso no está generalizado, pueden constituir una herramienta útil en casos con morfología dudosa, al igual que el número de Colonias Formadoras de Progenitores (CFU), que suelen estar disminuidas en los SMD.(2)

Numerosos pacientes que son derivados a las consultas de hematología, sin embargo, presentan citopenias inexplicadas en ausencia de displasia significativa, blastos en médula ósea o alteraciones citogenéticas típicas, por lo que en 2007 se creó una nueva categoría diagnóstica, la Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado (ICUS, del inglés *Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance*).(43) Los pacientes con ICUS, aunque no cumplan criterios de SMD, deben ser vigilados, ya que pueden desarrollar neoplasias mieloides hasta en un 25% de los casos.(44) En estos pacientes, la realización de un panel de mutaciones mediante secuenciación masiva podría ayudar a clarificar el diagnóstico y predecir la evolución futura.



## INTRODUCCIÓN

<p>A. Prerrequisitos</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Citopenia constante en una o más de las líneas siguientes: eritroide (hemoglobina &lt; 11/dl), granulocítica (&lt; 1.5 x10e9/l) o megacariocítica (plaquetas &lt; 100 x10e9/l)</li><li>2. Exclusión de cualquier otra enfermedad hematológica o no hematológicas como causa de citopenia/displasia</li></ol>
<p>B. Criterios decisivos</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Displasia en al menos el 10% de las células de 1 línea mieloide o &gt;15% de sideroblastos en anillo en médula ósea</li><li>2. 5-19% de blastos en médula ósea</li><li>3. Anomalías cromosómicas típicas, por cariotipo o FISH*</li></ol>
<p>C. Co-criterios (cuando se cumplen los prerrequisitos pero no los criterios decisivos, y presenta manifestaciones clínicas típicas)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Fenotipo claramente indicativo de población monoclonal en médula ósea por citometría de flujo</li><li>2. Datos moleculares de clonalidad: HUMARA, perfil génico, mutaciones puntuales</li><li>3. Disminución de formación de colonias en médula ósea y/o sangre periférica</li></ol>

**Tabla I. Criterios diagnósticos de SMD (adaptado de Valent et al.).** El diagnóstico se establece cuando ambos prerrequisitos y al menos uno de los criterios decisivos están presentes (obsérvese que la presencia de alteraciones citogenéticas típicas tiene el mismo peso diagnóstico que la displasia o el porcentaje de blastos, aunque si es el único de los criterios decisivos que se cumple, el diagnóstico debe ser de alta sospecha de SMD). En caso de no cumplir los criterios decisivos, los co-criterios pueden ayudar a diagnosticar al paciente de SMD o de alta sospecha de SMD.

\*Según las recomendaciones de la OMS de 2017 la trisomía 8, la pérdida del cromosoma Y y la del(20q) no deben considerarse definitivas de SMD en ausencia de hallazgos morfológicos de SMD, ya que pueden presentarse en individuos sanos.

### 1.4. PRONÓSTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

El pronóstico de los SMD es sumamente variable: los pacientes de bajo riesgo suelen tener una supervivencia relativamente larga y baja probabilidad de transformación a LMA, en tanto que los de alto riesgo presentan una esperanza de vida limitada y acaban progresando invariablemente a LMA. Por esta razón, determinar el pronóstico de los SMD constituye un objetivo fundamental para los hematólogos, de ahí la necesidad de identificar qué variables inciden directamente en la supervivencia y en el

## INTRODUCCIÓN

riesgo de transformación a LMA y de desarrollar, a partir de dichas variables, índices pronósticos adecuados.

En 1997 se creó el primer índice pronóstico para SMD al margen de la clasificación OMS, la cual no tenía en cuenta la citogenética: el IPSS (*International Prognosis Scoring System*).<sup>(35)</sup> Esta escala se basaba en tres variables: el porcentaje de blastos en médula ósea, el número de citopenias y el tipo y número de alteraciones citogenéticas, que se combinaban entre sí para dar lugar a 4 grupos pronósticos: bajo riesgo, con una mediana de Supervivencia Global (SG) de 5.7 años; intermedio-1, 3.5 años; intermedio-2, 1.2 años; y alto, 0.4 años. Sin embargo, a pesar de haber sido validado y ampliamente utilizado por su sencillez y valor predictivo, el IPSS adolece de ciertas limitaciones: confiere el mayor peso pronóstico al porcentaje de blastos, no tiene en cuenta la gravedad de las citopenias y sólo atribuye un pronóstico específico a un pequeño número de alteraciones citogenéticas, englobando el resto de alteraciones en la nebulosa categoría de riesgo “intermedio”<sup>2</sup>. En 2005, *Malcovati et al.*, del grupo italiano de SMD, desarrollaron la escala WPSS (*WHO classification-based Prognostic Scoring System*), que incluía el soporte transfusional, el diagnóstico OMS y la citogenética.<sup>(45)</sup> Sin embargo, el WPSS no logró aportar ventajas significativas sobre el IPSS, por lo que su uso ha sido menos generalizado.

En 2012 apareció un nuevo índice pronóstico, el IPSS revisado (IPSS-R), cuya principal novedad fue que agrupaba todas las alteraciones citogenéticas en 5 nuevos grupos de riesgo<sup>3</sup>.<sup>(32,36)</sup> Además, asignaba una puntuación distinta a las citopenias atendiendo a su gravedad. Combinando la citogenética, el porcentaje de blastos y las citopenias se obtenían 5 grupos de riesgo: muy bajo, con una mediana de SG de 8.8 años; bajo, 5.3 años; intermedio, 3 años; alto, 1.6 años; y muy alto, 0.8 años. Además, la nueva escala introducía la edad como factor pronóstico dentro de cada uno de los grupos; así, un paciente de más de 70 años con IPSS-R bajo tendría una mediana de supervivencia de 4.2 años frente a los 8.8 años de otro con edad igual o inferior a 70 perteneciente al mismo grupo de riesgo. El IPSS-R ha sido sistemáticamente

---

<sup>2</sup> Bueno: normal, -5q-, -Y, 20q- como anomalías únicas. Malo: alteraciones del cromosoma 7, cariotipo complejo. Intermedio: otras alteraciones únicas o dobles.

<sup>3</sup> Muy bueno: -Y, 11q-. Bueno: normal, 20q-, 5q-, alteración doble incluyendo 5q-. Intermedio: +8, +19, 7q-, isocromosoma 17p, alteraciones únicas o dobles no incluidas en otras categorías. Pobre: - 7, doble incluyendo 7q-, inv(3)/t(3q)/del(3q), cariotipo complejo con 3 alteraciones. Muy pobre: cariotipo complejo con más de 3 alteraciones.

## INTRODUCCIÓN

validado(46) y es hoy el índice pronóstico más depurado y, por tanto, el de elección en todo paciente con SMD al diagnóstico.

	0 puntos	0.5 puntos	1 punto	1.5 puntos	2 puntos
Blastos MO (%)	<5%	5-10%		11-20	21-30
Cariotipo	Bueno	Intermedio	Malo		
Citopenias	0-1	2-3			

**Tabla II. IPSS (adaptado de Greenberg et al.).** Bajo: 0 puntos. Intermedio-1: 0.5 – 1 puntos. Intermedio-2: 1.5 – 2 puntos. Alto: 2.5 – 3.5 puntos.

	0 puntos	0.5 puntos	1 punto	1.5 puntos	2 puntos	3 puntos	4 puntos
Blastos MO (%)	0-2		>2-<5		5-10	>10	
Hemoglobina (g/dl)	≥10		8-<10	<8			
Neutrófilos ( $\times 10^9/l$ )	≥0.8	<0.8					
Plaquetas ( $\times 10^9/l$ )	≥100	50-99	<50				
Cariotipo	Muy bueno		Bueno		Intermedio	Pobre	Muy pobre
Citopenias	0-1	2-3					

**Tabla III. IPSS-R (adaptado de Greenberg et al.).** 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.

Recapitulando, si agrupamos las diferentes categorías de riesgo podemos reducirlas a dos grandes grupos de pacientes, lo que resulta más manejable desde el punto de vista clínico: SMD de bajo riesgo y SMD de alto riesgo. Para Pierre Fenau, deberían considerarse SMD de bajo riesgo los que presenten un IPSS-R inferior a 4, mientras que los de alto riesgo serían aquellos con una puntuación de 4 o más.(47) Tal distinción es crucial, ya que los pacientes de bajo riesgo se tratarán de manera más conservadora, mientras que los de alto riesgo requerirán un manejo más agresivo.

Se han identificado otros factores de riesgo, que aún no han sido incorporados a ningún índice pronóstico, como la presencia de mielofibrosis grado 2 o 3,(48) o la sobrecarga férrica, una complicación habitual en pacientes politransfundidos.(49)

## INTRODUCCIÓN

### 1.5. TRATAMIENTO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

A diferencia de otras hemopatías malignas, cuyo pronóstico ha mejorado significativamente gracias a la aparición de nuevos fármacos, no han surgido aún tratamientos que modifiquen de manera sustancial el curso natural de la mayoría de los SMD. En el momento actual, las opciones terapéuticas para estos pacientes se limitan al tratamiento de la anemia sintomática con Agentes Estimulantes de la Eritropoyesis (AEE) y Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas (G-CSF, del inglés *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), los quelantes del hierro, la lenalidomida en pacientes con síndrome 5q-, la quimioterapia intensiva y los agentes hipometilantes en los SMD de alto riesgo, y el Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos (TPH).

Los primeros tratamientos para SMD de alto riesgo, empleados en los años 80,(50,51) consistían en regímenes de quimioterapia intensiva similar a los utilizados en pacientes con LMA, basados en antraciclinas y citarabina a altas dosis. Dichos esquemas permitían alcanzar un gran número de respuestas completas (80-90%) en sujetos jóvenes, pero éstas eran poco duraderas y los pacientes acababan recayendo tras un período breve de tiempo. Simultáneamente, el TPH alogénico comenzó a ser empleado en el tratamiento de pacientes jóvenes con SMD de alto riesgo, con resultados satisfactorios (75% de supervivencia libre de recaída a los 2 años en pacientes con SMD-EB).(52,53) Pero, ¿qué hacer con los pacientes no candidatos a regímenes intensivos, que eran la gran mayoría, o los que tenían SMD de bajo riesgo? A finales de los años 80 y principios de los 90 se realizaron los primeros ensayos clínicos para evaluar la eficacia tanto del G-CSF como de los AEE en el tratamiento de la anemia en pacientes de bajo riesgo, observándose alrededor de un 40% de respuestas eritroides empleando ambos en combinación.(54) Ya en la primera década del siglo XXI, lenalidomida, un inmunomodulador empleado en el tratamiento del mieloma múltiple, demostró una extraordinaria eficacia en pacientes con síndrome 5q-. Azacitidina, un antimetabolito análogo de nucleósido con acción hipometilante, se convirtió en 2009 en el primer fármaco en demostrar una mejoría significativa de la supervivencia frente al tratamiento convencional en pacientes con SMD de alto riesgo y LMA con 20-30% de blastos.(55) El último fármaco aprobado para el tratamiento de los SMD ha sido luspatercept, indicado en SMD-SA y dependencia transfusional, intolerantes o refractarios a AEE.

## INTRODUCCIÓN

### ***1.5.1. Síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo***

El objetivo del tratamiento de los pacientes con SMD de bajo riesgo es reducir la sintomatología, prolongar la SG y mejorar la calidad de vida. La anemia es la citopenia más frecuente en este grupo de pacientes (el 87% de los SMD tiene < 12 g/dl y un 63% tiene <10 g/dl o dependencia transfusional)(56) y condiciona la aparición de síntomas (síndrome anémico) que repercuten en la calidad de vida y agrava patologías previas como la insuficiencia cardiaca o renal. Aunque la transfusión de hematíes mejora inicialmente los síntomas de los pacientes con SMD, se acompaña de efectos adversos, como la sobrecarga férrica, la aloinmunización (hasta un 15%),(57) las reacciones transfusionales, la transmisión de agentes infecciosos (VIH, VHB, VHC...) o la sobrecarga de volumen, que se traducen en una menor supervivencia. Además, la presencia de anemia en los SMD de bajo riesgo se ha asociado con un aumento del riesgo de LMA.(56)

La sobrecarga férrica es una de las consecuencias más evidentes de la transfusión repetida de concentrados de hematíes, habiéndose relacionado con un incremento en las necesidades transfusionales, menor supervivencia y mayor riesgo de progresión a LMA. Se ha demostrado, asimismo, que el uso de quelantes en pacientes con SMD de bajo riesgo con dependencia transfusional mejora las citopenias y reduce la mortalidad y el riesgo de progresión a LMA.(49) Deferasirox es actualmente el quelante más utilizado y del que mayor experiencia publicada se dispone (el estudio TELESTO ha demostrado que mejora la supervivencia libre de evento frente a placebo, con un adecuado perfil de seguridad).(58)

#### *Agentes Estimulantes de la Eritropoyesis (AEE)*

Los AEE son derivados sintéticos de la Eritropoyetina (EPO) humana, una hormona segregada por el riñón que estimula la proliferación de colonias eritroides en la médula ósea. Actualmente, cuentan con aprobación en pacientes con SMD de bajo riesgo con anemia sintomática,(59,60) debiendo emplearse al menos durante 8-12 semanas para alcanzar una hemoglobina de entre 10 y 12 g/dl, y pueden asociarse a G-CSF si no hay respuesta.(61) Entre sus efectos adversos más frecuentes destacan los síntomas gastrointestinales, la cefalea, la erupción cutánea, la hipertensión arterial y la trombosis, sin bien se trata, en general, de un tratamiento bien tolerado según todos los estudios realizados.

## INTRODUCCIÓN

Para evaluar la respuesta a los AEE, se emplean los criterios IWG (*International Working Group*) del 2006: aumento de la cifra de hemoglobina en 1.5 g/dl o disminución de la dependencia transfusional en al menos 4 concentrados de hematíes cada 8 semanas.(62) La tasa de respuesta, con o sin G-CSF, se sitúa en torno al 40%, aunque oscila entre el 30% y el 60% según las series publicadas, con una mediana de duración de la misma de entre 17 y 24 meses.(53,55,60–66)

Se ha observado un claro aumento de la supervivencia en los pacientes respondedores respecto a los no respondedores a AEE(65,66,68,70), así como en los que inician precozmente el tratamiento(66). Según el estudio realizado por *Kelaidi et al.*, los pacientes con respuestas inferiores a 6 meses tienen un pronóstico peor que los que tienen respuestas más duraderas, siendo éste similar al de los no respondedores<sup>4</sup>.(71) Además de prolongar la supervivencia, los AEE mejoran significativamente la calidad de vida(63,67,72) y no incrementan el riesgo de LMA.(63,65,67,70)

En cuanto a los factores que influyen en la respuesta a los AEE, se han identificado de manera bastante unánime algunas variables, como los niveles de EPO endógena, la dependencia transfusional y el IPSS.(66,67,69,73,74) Se ha observado que cuanto más altos son los niveles de EPO endógena, menor es la probabilidad de respuesta a los AEE, y viceversa, ya que niveles altos de EPO revelarían una respuesta insuficiente a la misma, a pesar de una secreción adecuada; por el contrario, los pacientes con niveles desproporcionadamente bajos en relación al grado de anemia podrían beneficiarse de dicho tratamiento(75). Se han propuesto diferentes puntos de corte por encima de los cuales la probabilidad de respuesta decaería significativamente: 100, 200 o 500 U/l. También los pacientes con IPSS o R-IPSS de bajo riesgo se benefician más del tratamiento con EPO, mientras que los que tienen una mayor dependencia transfusional responden peor, lo que probablemente refleja un estado más avanzado de la enfermedad y una menor respuesta a la EPO endógena, incapaz de mantener una eritropoyesis adecuada. Otras variables que influyen desfavorablemente en la respuesta a los AEE son el porcentaje de blastos  $\geq 10\%$ , el cariotipo anormal o la ferritina alta(69,73–75). A partir de la dependencia transfusional y los niveles de EPO el grupo Nórdico de SMD elaboró en 1997 una escala predictiva

---

<sup>4</sup> La SG se calculó a partir de las 12 semanas en los no respondedores y a partir de la pérdida de respuesta eritroide en los respondedores. Entre los no respondedores la SG fue de 40 meses. La SG fue de 36.7 meses entre los respondedores de <6 meses y de 54.3 meses en los respondedores de >6 meses ( $p=0.02$ ), y la incidencia acumulada de LMA a 5 años fue del 21.6% y del 9%, respectivamente ( $p=0.02$ ).

## INTRODUCCIÓN

de respuesta a AEE, que se ha venido utilizando ampliamente<sup>5</sup>, aunque algunos autores consideran que el punto de corte de 500 UI/l que propone es demasiado alto, y consideran más apropiado bajarlo a 200 UI/l (86% de los pacientes con SMD).(63,75,76)

### *Lenalidomida*

Lenalidomida ha sido hasta fecha reciente el único tratamiento con aprobación en pacientes con SMD de bajo riesgo que ha demostrado ser capaz de influir favorablemente en el curso natural de la enfermedad. Su indicación aprobada se limita a pacientes con SMD de bajo riesgo y 5q- con dependencia transfusional, en los que permite alcanzar más de un 75% de respuestas eritroides y citogenéticas (el 45% de ellas completas), con una mediana de tiempo hasta la respuesta de 4-5 semanas. La respuesta a lenalidomida se ha asociado también a mayor SG y menor incidencia de LMA (solo un 15% a 10 años en respondedores frente a un 67% en no respondedores),(77–79) así como a una mejor calidad de vida.(79,80) Lenalidomida ha sido ensayada también en pacientes con SMD de bajo riesgo sin 5q-, con un 27% de independencia transfusional<sup>6</sup>, aunque no existe aprobación actualmente para esta indicación.(80) Sus principales efectos adversos son la neutropenia y la trombopenia.

### *Luspatercept*

Luspatercept es el fármaco aprobado más recientemente para el tratamiento de los SMD. Se trata de una molécula que bloquea los ligandos que se unen a uno de los receptores de la superfamilia TGF-beta (*Transforming Grow Factor-beta*), reduciendo las señales de fosforilación de SMAD2 y SMAD3 e impidiendo la eritropoyesis ineficaz. Su indicación se restringe a pacientes con SMD de bajo riesgo con sideroblastos en anillos. Los pacientes que más se benefician del tratamiento son lo que presentan una menor dependencia transfusional (independencia transfusional del 80% con <4 concentrados de hematíes cada 8 semanas vs. 9% con >6 concentrados de hematíes cada 8 semanas).(81)

---

<sup>5</sup> Los pacientes sin dependencia transfusional y EPO <500 U/L tenían una tasa de respuestas del 61%, frente al 14% en los pacientes con sólo un factor pronóstico. Otras escalas predictivas de respuesta más recientes son la ideada por Santini (EPO >200, R-IPSS de alto riesgo, ferritina >350), la de Houston (EPO >100, IPSS de alto riesgo) y la de Buckstein (>100, dependencia transfusional, IPSS de alto riesgo).

<sup>6</sup> Se observó un mayor número de respuestas entre los pacientes con EPO endógena ≤500 U/l (34.0% vs. 15.5% para >500 U/l).

## INTRODUCCIÓN

### *Otros tratamientos*

Tradicionalmente, se han venido empleando en el tratamiento de los SMD fármacos comúnmente destinados a tratar enfermedades autoinmunes, como los corticoides, la ciclosporina o la globulina antitímocítica humana, con respuestas variables.(56) Aunque en la actualidad se les reconoce un papel limitado a estos fármacos, podrían ser útiles en pacientes jóvenes, con <5% de blastos, médula hipocelular, haplotipo HLA DR15, presencia de clon HPN o trisomía 8. También los andrógenos, como el danazol, han sido empleados para tratar la anemia, con respuestas transitorias.

En cuanto al manejo de la neutropenia y la trombopenia las evidencias al respecto son escasas. En el primer caso, puede emplearse G-CSF en aquellos pacientes con infecciones de repetición, mientras que en el segundo se puede recurrir a los análogos de trombopoyetina, una alternativa eficaz, pero que en la actualidad no cuenta con aprobación.(41,82) Los pacientes con características de alto riesgo (fibrosis, citopenias graves, alteraciones citogenéticas de mal pronóstico o mutaciones somáticas en determinados genes), independientemente del IPSS o el IPSS-R, deben ser tenidos en consideración para la realización de un TPH alogénico.(41,47,83)

### **1.5.2. Síndromes mielodisplásicos de alto riesgo**

En los SMD de alto riesgo el tratamiento debe ir encaminado a modificar el curso natural de la enfermedad, evitando o retrasando la progresión a LMA e incluso, en los casos en que sea posible, alcanzar la curación. El pronóstico adverso de los SMD no se ha visto modificado sustancialmente por la aparición de nuevos fármacos, por lo que su tratamiento sigue constituyendo un gran reto.

### *Quimioterapia*

La citarabina a bajas dosis se empezó a utilizar en los años 80 en el tratamiento de los SMD.(84) Este fármaco, barato, poco tóxico y de fácil administración, permite algún grado de respuesta, pero no parece que aporte beneficios significativos en la SG ni en la incidencia de transformación a LMA en pacientes con SMD de alto riesgo, por lo que en la actualidad ha caído en desuso.(85) En cuanto a la quimioterapia intensiva, se ha venido empleando tanto en el tratamiento de la LMA como de los SMD desde hace largo tiempo, con resultados infructuosos cuando no se sigue de la realización de un TPH alogénico. La tasa de respuestas completas se sitúa en torno al 40-50%, peor que la alcanzada por pacientes con LMA *de novo*, con una mediana de duración de la



## INTRODUCCIÓN

misma inferior a 12 meses, siendo los pacientes con citogenética desfavorable los que responden menos o recaen antes.(47,86) En general, se desaconseja el uso de la quimioterapia intensiva en los pacientes con SMD de alto riesgo, salvo como puente al trasplante alogénico en pacientes con una carga tumoral alta (>10% de blastos).(47,83)

### *Agentes hipometilantes*

Los agentes hipometilantes poseen un mecanismo de acción doble: inhiben la metilación del ADN (proceso que detallaremos más adelante) y son citotóxicos a dosis altas. Azacitidina es el único hipometilante que cuenta con aprobación por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) para el tratamiento de pacientes con SMD de alto riesgo (IPSS intermedio-2 o alto)<sup>7</sup>. El estudio AZA-001(55) evidenció que la mediana de supervivencia de estos pacientes era de 24.5 meses frente a los 15 meses de los pacientes tratados con regímenes convencionales (quimioterapia intensiva, citarabina a dosis bajas o tratamiento de soporte), con un 29% de respuestas globales y un 40% de pacientes con enfermedad estable, siendo la mediana de duración de la respuesta de 1 año<sup>8</sup>.(87) Los factores que afectan negativamente a la duración de la respuesta son la citogenética de alto riesgo, el mal estado general, la presencia de blastos en sangre periférica y la dependencia transfusional.(88) Además, azacitidina consigue mejorar significativamente la calidad de vida de estos pacientes, siendo sus principales efectos secundarios la neutropenia y la trombopenia.(88)

El mayor problema que plantea el uso de azacitidina es que los pacientes que no responden o pierden la respuesta tienen un pronóstico ominoso, siendo su mediana de SG de tan solo 5.6 meses (28.9% al año y 15.3% a 2 años).(89) Llegados a este punto, las opciones terapéuticas se vuelven extraordinariamente limitadas e infructuosas.

---

<sup>7</sup> Decitabina cuenta con aprobación por la EMA en LMA, pero no en SMD de alto riesgo, al no haber demostrado beneficio significativo en supervivencia en los ensayos en fase 3 en comparación con azacitidina.

<sup>8</sup> La SG a 2 años en pacientes tratados con azacitidina fue del 50.8% vs. 26.2% en el grupo de tratamiento convencional, mientras que la supervivencia libre de transformación a LMA fue de 17.8 meses vs. 11.5 meses, respectivamente.

## INTRODUCCIÓN

### *Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos*

El TPH alogénico constituye el único tratamiento capaz de curar a los pacientes con SMD, incluso a aquellos que han recibido azacitidina previamente, con una SG a largo plazo del 30-50% y una supervivencia libre de progresión a 2 años del 60%.(40,83,90–93) La elevada mortalidad asociada a este procedimiento hace que solo una pequeña proporción de pacientes con SMD, que se sitúa en torno al 8-10%, se considere candidata a recibirlo. Sólo los pacientes con IPSS intermedio-2 o alto se benefician del TPH alogénico, ya que prolonga la supervivencia a largo plazo, mientras que en los pacientes de bajo riesgo aumenta la mortalidad frente al tratamiento de soporte.(94) El acondicionamiento de intensidad reducida se acompaña de un mayor riesgo de recaída, pero al mismo tiempo presenta una menor mortalidad relacionada con el trasplante en comparación con el acondicionamiento mieloablativo, por lo que este último se reserva sólo a pacientes de alto riesgo, jóvenes y con buen estado general.(83,90,91) Los pacientes con citogenética adversa, IPSS o IPSS-R elevado al diagnóstico, edad avanzada o enfermedad en progresión en el momento del trasplante presentan mayor mortalidad y riesgo de recaída.(83,91,92)

Existe controversia acerca de cuál es la estrategia terapéutica ideal previa al trasplante: quimioterapia intensiva, hipometilantes o nada (trasplante directo). Los primeros estudios ya evidenciaron que los pacientes con un porcentaje de blastos en médula ósea previo al trasplante superior al 10% tenían peor pronóstico, mientras que aquellos con un porcentaje más bajo podían someterse directamente al mismo, sin necesidad de inducción previa.(52,95) Estudios más recientes sugieren que azacitidina podría ser tan eficaz como la quimioterapia como puente al trasplante en términos de SG y Supervivencia Libre de Progresión (SLP), mejorando incluso los resultados de ésta en paciente con citogenética de alto riesgo.(47,96–99) Otros autores consideran que no existen diferencias significativas entre la citorreducción con hipometilantes o quimioterapia y el trasplante directo, si bien el pronóstico empeora considerablemente en ausencia de respuesta a la quimioterapia en comparación con el resto de alternativas.(100)

Las complicaciones principales del trasplante son la Enfermedad Injerto contra Receptor (EICR), también denominada enfermedad injerto contra huésped, que consiste en el “ataque” inmune por parte de los linfocitos del donante a las células del receptor, y las infecciones oportunistas. Aunque la EICR, especialmente en su forma aguda, incrementa la mortalidad, son varios los estudios que han demostrado que existe un papel beneficioso de la EICR crónica (EICRc) en el control de la enfermedad

## INTRODUCCIÓN

post trasplante y, por tanto, en la prevención de la recaída, merced al “Efecto Injerto Contra Leucemia” (EICL).(101–104) Algunos autores han observado que la inducción con azacitidina se asocia a una menor incidencia de EICR aguda, lo que se cree debido a la inhibición de la proliferación y activación de los linfocitos T (acción inmunomoduladora).(98,99)

El pronóstico de los pacientes que recaen tras el trasplante alogénico es, en general, muy desfavorable, sin bien existen estrategias para prevenir o tratar dichas recaídas. En primer lugar, un adecuado manejo de la inmunosupresión, que debe encaminarse a evitar la EICR aguda, pero permitiendo un cierto grado de EICL; en segundo lugar, el seguimiento del injerto mediante los estudios de quimerismo y la constante reevaluación de la enfermedad con técnicas de Enfermedad Mínima Residual (EMR), como la citometría de flujo o la biología molecular. Algunos autores recomiendan el uso de Infusión de Linfocitos del Donante (ILD) o azacitidina de forma profiláctica en pacientes en los que se prevea una pronta recaída.(83,105,105) Azacitidina podría tener también un efecto inmunomodulador en el post trasplante que podría resultar beneficioso, al favorecer el EICL.(106)

### *Nuevos fármacos*

En el momento actual se encuentran en fase de ensayo clínico diversos fármacos destinados a pacientes con SMD de alto riesgo refractarios o en recaída tras hipometilantes: nuevos hipometilantes (guadecitabina), inhibidores de histona deacetilasa (vorinostat, pracinostat), inhibidores de *BCL-2*, inhibidores de *IDH2* e *IDH1*, activadores de p53 (APR-246) o inhibidores de *check-point*.

## **1.6. MUTACIONES SOMÁTICAS EN LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS**

Con el tiempo, la citogenética convencional dio paso a métodos de detección de anomalías genéticas más sensibles, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) o, más recientemente, la secuenciación masiva o Secuenciación de Última Generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*). Esta última ha permitido identificar mutaciones presentes en la mayoría de los SMD (hasta el 90% según algunos estudios), superando así las limitaciones de la citogenética convencional y proporcionando una gran cantidad de información con utilidad diagnóstica, pronóstica e incluso terapéutica. Aunque la citogenética seguirá

## INTRODUCCIÓN

empleándose y conservará, al igual que la citología óptica, su utilidad en la práctica clínica, la biología molecular desempeñará un papel cada vez mayor en el manejo de estos pacientes.

Definimos *mutación*, o *variante*, como cualquier cambio en la secuencia de ADN de una célula. Una *mutación somática* es toda mutación adquirida que afecta al ADN de una célula no germinal, o somática, mientras que una *mutación germinal* es la que afecta al ADN de los gametos y es, por tanto, heredada por los descendientes del individuo, que portarán dicha mutación en todas las células de su organismo. Las mutaciones somáticas se pueden clasificar en *nonsense* (el triplete resultante es un codón de parada y no codifica ningún aminoácido, dando lugar a un acortamiento de la proteína resultante), *missense* (el triplete resultante codifica un aminoácido distinto) o *frameshift* (se produce un desplazamiento en el marco de lectura, lo que altera toda la secuencia de aminoácidos). Atendiendo a los cambios que introducen en la función de un gen, se habla de mutaciones *driver* (conductoras) y *passenger* (pasajeras): las primeras dan lugar a cambios que confieren una ventaja selectiva a la célula, mientras que las segundas no se traducen en cambios funcionales y son, por tanto, silentes. Algunas variantes son particularmente frecuentes entre la población y dan lugar a *polimorfismos* o *SNP* (Polimorfismos de Nucleótido Único, del inglés *Single Nucleotide Polimorfisms*), variantes de un único nucleótido con una frecuencia  $\geq 1\%$  de la población que no tienen traducción fisiopatológica y, por tanto, no se consideran *driver* (esto es debido a que las mutaciones *driver* que afectan a la línea germinal suelen perjudicar a los individuos que las portan, lo que hace que su presencia entre la población sea muy baja).(107,108) Como normal general, para un mismo gen cada mutación afecta sólo a uno de los alelos. La proporción relativa de una variante en una muestra dada se expresa mediante la frecuencia alélica o VAF (*Variant Allele Frequency*), y oscila normalmente entre el 0% (ausencia de mutación, 100% del alelo normal) y el 50% (100% del alelo mutado)<sup>9</sup>.

Frederick Sanger desarrolló en 1977 un exitoso método para secuenciar ADN (esto es, obtener su secuencia de nucleótidos) denominado *secuenciación por terminación de nucleótidos*, que acabó siendo de elección para la identificación de nuevas

---

<sup>9</sup> En ocasiones, la VAF de una mutación supera el 50%, como ocurre con las mutaciones de genes situados en el cromosoma X en varones, en los que la totalidad de la dotación genética corresponde a un único alelo, o cuando existe pérdida del alelo contrario. Cuando se trata de mutaciones de la línea germinal, la VAF es exactamente del 50%, ya que la mutación está presente en todas las células del individuo.

## INTRODUCCIÓN

mutaciones. Al mismo tiempo, la PCR, desarrollada en 1982 por Kary B. Mullis, que permite amplificar secuencias de ADN en ciclos sucesivos de desnaturalización-naturalización, incrementó notablemente la capacidad de detección de anomalías genéticas, con una altísima sensibilidad, empleándose en la actualidad en la detección de la mayoría de las mutaciones conocidas en neoplasias hematológicas. A finales de los 80 surgieron los primeros secuenciadores automatizados, así como métodos derivados del de Sanger, como la pirosecuenciación (Nyren, 1985). En los años 2000 apareció la secuenciación de segunda generación, denominada secuenciación masiva o NGS. El primer secuenciador masivo con éxito comercial fue el GS20 de 454 Life Science© en 2005.(109)

La NGS ofrece importantes ventajas sobre otras técnicas: alta sensibilidad, estudio simultáneo de múltiples genes, secuenciación del gen completo y no sólo de regiones concretas, detección de mutaciones poco frecuentes o no conocidas, alta velocidad de procesamiento y posibilidad de analizar varias muestras a la vez, lo que se traduce en una importante reducción de los costes y tiempos asociados al procedimiento cuando se dispone de un alto volumen de muestras. Se puede secuenciar el genoma completo, el exoma (las regiones codificantes) o genes concretos; este último tipo, denominado secuenciación dirigida, es el procedimiento más empleado por ser más simple, fácil de interpretar y útil en la práctica clínica, gracias al uso de paneles de múltiples genes.

El proceso de secuenciación dirigida consta de varias fases. La primera, consiste en la creación de bibliotecas (*libraries*, en inglés), esto es, conjuntos de fragmentos cortos de ADN, lo que puede llevarse a cabo mediante 2 estrategias principales: amplicones y captura. La secuenciación mediante amplicones consiste en producir masivamente copias de pequeño tamaño de las regiones de interés mediante PCR utilizando *primers* específicos. Luego, se identifican los amplicones mediante un *índice* o “código de barras” (*indel* o *barcode*) y por último se añaden adaptadores que delimitan la zona a secuenciar; esta estrategia es más rápida y más específica de las regiones diana, pero susceptible de generar errores por la amplificación del ADN. En la secuenciación mediante captura se generan fragmentos de ADN que son marcados con sondas (*enriquecimiento*) y capturados por una matriz, que los separa del resto del ADN fragmentado; a diferencia de la secuenciación por amplicones, esta estrategia no requiere PCR, por lo que se evitan errores de amplificación, pero es más costosa y laboriosa. Una vez creadas las bibliotecas, el siguiente paso es la secuenciación propiamente dicha, que permite la obtención de secuencias denominadas *lecturas*

## INTRODUCCIÓN

(reads), empleando para ello plataformas basadas en distintos métodos de secuenciación, como la secuenciación por síntesis mediante terminación reversible o la secuenciación por síntesis mediante adición de un solo nucleótido. El parámetro que evalúa si una región ha sido “leída” el suficiente número de veces es la profundidad de cobertura: a mayor profundidad, mayor confianza en la detección de variables poco frecuentes (no olvidemos que cada lectura corresponde al ADN de una célula).(110,111)

A finales de los años 80 se identificaron las primeras mutaciones somáticas en pacientes con SMD en oncogenes de la familia *RAS*, un grupo de genes que codifica proteínas con función GTPasa que intervienen en la transducción de señales intracelulares, y se observó que su presencia se relacionaba con progresión a LMA.(112,113) Poco tiempo después, se identificaron en pacientes con SMD y LMA secundaria (LMA-s) mutaciones en el gen *p53* (hoy *TP53*), que codifica la proteína homónima, descubierta en 1979, cuya función es prevenir la degeneración neoplásica, reparando el ADN y programando la apoptosis celular cuando la acumulación de errores impide el normal funcionamiento de la célula y la convierte en una potencial amenaza para el organismo.(114,115) Varios estudios demostraron que estos pacientes solían tener un cariotipo complejo y presentaban mayor incidencia de transformación a LMA.(115,116) Con el tiempo, se fueron descubriendo nuevas mutaciones relacionadas con patologías mieloides en otros genes, como *RUNX1*, *IDH* o *TET2*, pero ha sido en los albores del nuevo siglo, tras de la implantación de la NGS, cuando se han empezado a llevar a cabo estudios de secuenciación de múltiples genes en paralelo en grandes series de pacientes.(117–123)

El porcentaje de pacientes con SMD con mutaciones somáticas, empleando paneles que cubren hasta 100 o más genes implicados en neoplasias mieloides, alcanza hasta el 90%.(118) Este porcentaje es muy superior al que se puede alcanzar con la citogenética convencional, dada la mayor sensibilidad de la NGS, y en teoría podría llegar al 100% de los pacientes con SMD con una cobertura lo suficientemente amplia. Los pacientes con SMD presentan una mediana de 2 o 3 genes mutados,(118,121,122) aunque algunos pueden exhibir un número considerablemente mayor o, por el contrario, no presentar mutaciones en los genes estudiados. Al igual que sucede con las alteraciones citogenéticas, no existen mutaciones específicas de SMD, si bien hay mutaciones que se asocian a determinados subtipos, como veremos.(123)

## INTRODUCCIÓN

Los genes más frecuentemente mutados en pacientes con SMD son *SF3B1* (el primero según las series de Papaemmanuil y Malcovati) y *TET2* (el primero según las de Haferlach y Béjar). También es habitual encontrar mutaciones en los genes *SRSF2*, *UA2F1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *RUNX1* o *TP53*. En general, ninguna mutación ha sido hallada en más del 20% de los pacientes con SMD, si consideramos todos los subgrupos, y la mayoría lo está en menos del 10%. Mientras que algunas mutaciones se asocian entre ellas con una frecuencia superior a la esperada (p.ej. *SF3B1* y *DNMT3A*), otras parecen excluirse mutuamente (p.ej. las que afectan a genes de *splicing* entre sí), o tienden a presentarse aisladas (p.ej. *SF3B1* o *TP53*). Algunas mutaciones se asocian a rasgos fenotípicos específicos, como las de *SF3B1* a los sideroblastos en anillo.(123,124)

### **1.6.1. Pronóstico de las mutaciones somáticas**

Resulta de gran interés determinar el papel de las mutaciones somáticas en el pronóstico de los pacientes con SMD. Sin embargo, debemos ser cautos a la hora de extraer conclusiones, ya que la NGS cuenta con ciertas limitaciones y, además, genera una enorme cantidad de información que puede resultar difícil de interpretar. Para empezar, mientras que el cariotipo nos proporciona una visión global del genoma del paciente, la NGS se aplica sólo a genes concretos. Por tanto, ¿cuál debe ser el número mínimo de genes incluido en un panel? ¿Qué genes deben ser incluidos y cuáles no? En segundo lugar, la asociación entre distintos genes es muy habitual, por lo que determinar el pronóstico individual de cada mutación no resulta nada sencillo. Sabemos también que existen mutaciones que son marcadores de hematopoyesis clonal, como examinaremos más adelante, esto es, “benignas” y no constitutivas de SMD. ¿Cuándo debemos, por tanto, considerar que una mutación es patogénica? Y en cuanto a la carga alélica, ¿influye en el pronóstico? Dado que las alteraciones citogenéticas suelen ser eventos tardíos,(119) su papel pronóstico es más claro, ya que la enfermedad en estos casos ha alcanzado una fase más avanzada, pero, ¿qué sucede con las mutaciones iniciales? ¿Cuánto tiempo transcurre desde que aparece la primera mutación hasta la transformación leucémica? ¿Cómo debe interpretarse la existencia de clones de pequeño tamaño? ¿El pronóstico de las mutaciones es el mismo independientemente de que sean clonales o subclonales, o dicho de otro modo, iniciadoras o colaboradoras? La mayoría de estos interrogantes se encuentran, actualmente, en discusión.

No obstante lo anterior, numerosos estudios han puesto de manifiesto que algunas mutaciones somáticas inciden claramente en el pronóstico de los pacientes con SMD.

## INTRODUCCIÓN

Si bien hay un relativo consenso acerca de qué mutaciones se asocian a un mejor o peor pronóstico, los resultados son dispares y, a menudo, divergentes.

### *Genes de splicing*

Se denomina espliceosoma (*splicing machinery* en inglés) al conjunto de moléculas implicadas en el proceso de “corte y empalme” o *splicing*, un mecanismo de edición del pre ARNm (Ácido Ribonucleico mensajero precursor), por el cual se eliminan las secuencias no codificantes o intrones, lo que permite a las secuencias intercaladas entre éstos, los exones, ensamblarse para dar lugar al ARNm maduro, que se traduce en proteínas. El espliceosoma está constituido por un núcleo de 5 moléculas de ARN asociado a proteínas que forma ribonucleoproteínas nucleares pequeñas o snRNP (*small nuclear Ribonucleoproteins*), las más importantes de las cuales son U1 y U2.(107) Este complejo se acopla a los puntos de corte del pre ARNm para llevar a cabo la eliminación de los intrones y el “empalme” de los exones. Aunque normalmente cada pre ARNm da lugar a un único ARNm maduro, los exones pueden reordenarse de formas diferentes (*splicing* alternativo), dando lugar a distintos ARNm. Cuando se altera este proceso se produce un *splicing* aberrante, que da como resultado la expresión de proteínas defectuosas. Un ejemplo de enfermedad causada por *splicing* aberrante es la beta-talasemia, cuyo resultado es un defecto en la síntesis de cadenas de beta-globina.(125) En el caso de los SMD, se han identificado patrones de *splicing* anormal específicos, que afectan a genes como *ASXL1*, *CBL*, *EZH2* o *RUNX1*.(126,127)

Los genes de *splicing* son los más frecuentemente mutados en los pacientes con SMD, afectando al 50-60% de los mismos.(107,118,123) Los principales de ellos son *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2*, que codifican proteínas que intervienen en el reconocimiento de la región 3' del punto de corte del pre ARNm. Estas mutaciones se observan tanto en pacientes de bajo como de alto riesgo y suelen ser mutuamente excluyentes.(119,128) Cada mutación produce un patrón de *splicing* aberrante determinado, lo que explicaría por qué dan lugar a fenotipos distintos.(128–130)

*SF3B1* (*Splicing Factor 3b Subunit 1*). Su frecuencia se sitúa entre el 20% y el 30% de los SMD.(131,132) Se trata del gen más frecuentemente mutado en pacientes con SMD de bajo riesgo y ha sido el primero en relacionarse con un rasgo fenotípico específico: los sideroblastos en anillo. Tal es así, que *SF3B1* está mutado hasta en el 90% de las ARSA y el 70% de las CRDM-SA, siendo el Valor Predictivo Positivo (VPP) de esta mutación para la presencia de sideroblastos en anillo del 98%.(131,132) La



## INTRODUCCIÓN

clasificación de la OMS de 2017 ha incluido la mutación de *SF3B1* como criterio diagnóstico de SMD-SA en pacientes con un porcentaje de sideroblastos en anillo entre el 5 y el 15%.<sup>10</sup> Esta mutación es característica también del SMD/NMP-SA-T.(121) Las mutaciones de *SF3B1* se han relacionado con características de buen pronóstico y con mutaciones en *DNMT3A*.(127,132–134) Hasta el momento, las mutaciones de *SF3B1* han sido las únicas que han demostrado tener un pronóstico claramente favorable en pacientes con SMD en varios estudios. Éstos han evidenciado que dichas mutaciones se asocian a mayor SG y a menor incidencia de transformación a LMA, tanto en los SMD en general como en los de bajo riesgo en particular.<sup>11</sup>(121,128,131–133,136,137)

*SRSF2* (*Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2*). Las mutaciones de *SRSF2* son frecuentes en los SMD (15%)(119,138) y se asocian a LMMC y LMA-s, así como a mutaciones en *RUNX1*, *IDH2*, *ASXL1*, *TET2*, *NRAS* y *FLT3*.(121,128,136) En cuanto al pronóstico, se relacionan con una menor SG y mayor incidencia de transformación a LMA, incluso en pacientes de bajo riesgo.(128,138–140)

*U2AF1* (*U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*): La mutación de este gen es más frecuente en pacientes de alto riesgo y se asocia a mutación de *TP53*.(128,136) Existe evidencia suficiente de que las mutaciones de *U2AF1* acortan la supervivencia y aumentan el riesgo de LMA.(121,122,128,141)

*ZRSR2* (*Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2*): No parece que las mutaciones de *ZRSR2* se asocien a hallazgos fenotípicos específicos ni que conlleven un pronóstico favorable o desfavorable.(140) Con frecuencia se asocian a mutaciones de *TET2*.(118)

### *Metilación del ADN*

La epigenética estudia las modificaciones genéticas estables y heredables que causan cambios de expresión en un gen sin afectar a su secuencia de nucleótidos.(142) Uno de los mecanismos epigenéticos mejor estudiados es la metilación del ADN, la

---

<sup>10</sup> La fisiopatología de los SMD-SA es compleja. *Cazzola et al.* han planteado que el splicing aberrante del gen *ABCB7*, implicado en la homeostasis del hierro y la eritropoyesis, podría ser la causa de la aparición de los sideroblastos en anillo y la sobrecarga férrica inicial en los pacientes con mutación de *SF3B1*.

<sup>11</sup> Algunos autores han apuntado que el pronóstico favorable de las mutaciones de *SF3B1* se debería a los sideroblastos en anillo, no encontrándose diferencias en este grupo entre pacientes mutados y no mutados (*Patnaik et al.*).(135)

## INTRODUCCIÓN

transferencia de grupos metilo por la enzima DNA metiltransferasa (DNMT). En el ADN existen regiones altamente metiladas, que corresponden a secuencias no codificantes ricas en dinucleótidos CpG (citosina-guanina), denominadas islas CpG. Por el contrario, otras regiones, en las que la densidad de las islas CpG es menor, se encuentran normalmente demetiladas, lo que hace que se encuentren “activas”, como las regiones promotoras de los genes. En ocasiones, se produce una metilación aberrante de estas regiones, lo que se traduce en un silenciamiento de la expresión del gen que da lugar a un fenotipo anómalo.(143,144) Los genes implicados en la metilación constituyen el segundo grupo de genes más frecuentemente mutado en los SMD (45-50%).(107,118) Se ha observado que el grado de metilación de los pacientes con SMD de alto riesgo es superior al de los de bajo riesgo.(145)

*TET2 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 2)*. Este gen codifica una proteína que cataliza la oxidación de la 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina; cuando está mutado aumenta la metilación del ADN y se produce un silenciamiento genético.(126) Las mutaciones de *TET2* están presentes en el 20-25% de pacientes con SMD y hasta en el 50-60% de las LMMC,(107,127) se han relacionado con mieloproliferación y diferenciación mielo-monocítica, estando presentes en casi el 80% de los pacientes con LMA-s o SMD/NMP y monocitosis,(121,126,127) y se asocian a citogenética normal y a mutaciones en otros genes.(146,147) No existe unanimidad sobre el significado pronóstico de las mutaciones de *TET2*, aunque la mayoría de los autores se inclinan por atribuirles un pronóstico indeterminado.(146–150) En pacientes sometidos a TPH alogénico, sin embargo, se han asociado a menor SG y mayor riesgo de LMA.(151–153)

*DNMT3A (DNA Methyltransferase 3 Alpha)*. Este gen codifica una DNA metiltransferasa cuya función es añadir grupos metilo al ADN. Cuando el gen está mutado, disminuye la metilación, lo que da lugar a la sobreexpresión de genes proliferativos e inhibidores de la diferenciación.(126) Las mutaciones de *DNMT3A* están presentes en el alrededor del 8% de los SMD y en el 23% de los SMD secundarios a tratamiento y LMA-s, siendo mayor su frecuencia en pacientes de bajo riesgo, en los que suelen asociarse a mutaciones en *SF3B1*.(133,154–156) Se asocian a mal pronóstico.(133,154)

*IDH1/2 (Isocitrato deshidrogenasa)*. Este gen codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa, que cataliza la conversión del alfa-cetoglutarato a isocitrato. Cuando está mutado el alfa-cetoglutarato se convierte en 2-hidroxiglutarato, que inhibe la función de *TET2*. Su frecuencia combinada en los SMD se sitúa en un 5-12%,

## INTRODUCCIÓN

correspondiendo el 80% a SMD-EB, siendo de un 14.3% y un 11.3% en LMA con <30% de blastos (AREB-T de la FAB) y LMMC, respectivamente.(155,157,158) Se asocian a edad avanzada, alto porcentaje de blastos y mutaciones en *DNMT3A*, *ASXL1* y *SRSF2*, son excluyentes con las mutaciones *TET2* y, en general, su pronóstico es desfavorable.(122,126,157–159)

### *Modificación de la cromatina*

Las histonas, proteínas estructurales en torno a las cuales se condensa la cromatina, presentan una cola amino-terminal susceptible de sufrir diferentes modificaciones epigenéticas. Una de estas modificaciones, la acetilación (adición de grupos acetilo al ADN), dificulta el empaquetamiento de la cromatina, haciendo al ADN más accesible a los factores de transcripción y favoreciendo, por tanto, la expresión génica. Cuando las histonas están deacetiladas se produce un “silenciamiento” que da lugar a la expresión anormal de genes que normalmente se encuentran activos.

*ASXL1 (ASXL transcriptional regulator 1)*. Se cree que la proteína codificada por este gen favorece la transcripción de unos genes e impide la de otros. Su frecuencia en los SMD es del 10-20%, llegando al 40% en las LMMC.(107,127,160) Se han asociado de manera consistente a citogenética de alto riesgo, menor SG y mayor riesgo de progresión a LMA.(120,121,133,145,146,161)

*EZH2 (Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit)*. Las mutaciones de este gen presentan una frecuencia del 6-7%, y al contrario de lo que sucede con otras mutaciones típicas de SMD, son raras en LMA, habiéndose relacionado con menor SG.(120,121,127,133,137,146,161)

### *Complejo de las cohesinas*

El complejo de las cohesinas interviene en mantener unidas las cromátidas hermanas durante la mitosis. Se desconoce cuál es el mecanismo oncogénico de las mutaciones que afectan a estos genes, ya que, al contrario de lo que sucede en otros casos, no suelen acompañarse de alteraciones citogenéticas. Su frecuencia es de un 10% en los SMD de bajo riesgo, y de un 16% en los de alto riesgo (llegando al 20% en las LMA-s). *STAG2* es el gen más frecuentemente mutado, representando alrededor del 50% de las mutaciones del complejo de las cohesina, seguido de *RAD21* y *SMC3*. Las mutaciones de este grupo son mutuamente excluyentes, se asocian a la trisomía 8 y a

## INTRODUCCIÓN

mutaciones de *RAS*, *ASXL1*, *BCOR* y *RUNX1*, y se relacionan con progresión a LMA.(162)

### *Transcripción del ADN*

La transcripción es el proceso por el que se obtiene a partir de una secuencia de ADN dada una secuencia complementaria de ARNm (en realidad pre ARNm, que posteriormente será editado). Dicho proceso se encuentra altamente regulado por una serie de proteínas denominadas factores de transcripción, que se unen a la región promotora del gen, activando o reprimiendo la transcripción del mismo. Alrededor del 30% de los SMD tienen mutaciones en genes de este grupo.(119) *RUNX1* (*RUNX family transcription factor 1*) es el gen más comúnmente mutado de este grupo (9-10%), y se asocia a SMD de alto riesgo y SMD secundario, menor SG y progresión a LMA.(119,121,127,146,163,164) Las mutaciones de los genes *ETV6* y *SETBP1* también se han asociado a pronóstico adverso.(146,164,165) *SETBP1* está mutado en el 20-30% de pacientes con LMC atípica, mientras que *CSF3R*, que codifica el receptor del G-CSF, se encuentra mutado en el 90% de los pacientes con Leucemia Neutrófila Crónica (LNC) y el 40% de los pacientes con LMC atípica.(107) *GATA2* se relaciona con SMD y LMA con predisposición familiar.(107) Otros genes de este grupo son *BCOR*, *BCORL*, *EED*, *PHF6*, *MECOM*, *GATA1*, *EP300* o *AEBP2*.

### *Vías de señalización*

Existe un gran número de genes que codifican proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares: *N-RAS*, *K-RAS*, *JAK2*, *CALR*, *PTPN11*, *MTOR*, *GNAS*, *CSNK1A1*, *KIT*, *GNB1*, *NOTCH1*, *NUP98*, *CBL*, *CUX1*, *SUZ1*, *CDH23*, *FLT3*, *NPM1*... Menos del 15% de los SMD asocian mutaciones en alguno de estos genes, la mayoría de las cuales se halla presente en menos del 5% de los pacientes y típicamente se relacionan con características mieloproliferativas.(107,118,127) Las mutaciones de *JAK2*, *CALR* y *MPL* pueden encontrarse en pacientes con SMD/NMP-SA-T junto con las ya mencionadas mutaciones de *SF3B1*.(121) Estos hallazgos sugieren que los SMD y las NMP forman parte de un *continuum* que tiene como común denominador la adquisición de alteraciones madurativas y proliferativas de la célula *stem* mieloide.(107) Algunos autores han observado que la mutación de *JAK2* tiene un pronóstico desfavorable en SMD.(166) Los genes de la vía *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *CBL*...) están presentes en aproximadamente el 90% de los pacientes con LMMC juvenil y se asocian de forma clara a progresión a LMA.(107)

## INTRODUCCIÓN

### *TP53*

De entre los llamados genes supresores de tumores, el más importante y más estudiado es *TP53* (*Tumor protein p53*). Con frecuencia, la mutación de *TP53* se asocia con la delección 17p o la pérdida del cromosoma homólogo, así como a cariotipo complejo y otras características de mal pronóstico. Es habitual que los pacientes con mutación de *TP53* no presenten mutaciones en otros genes. *TP53* es el gen que más claramente ha demostrado un pronóstico adverso en los SMD en términos de SG y de progresión a LMA en pacientes de bajo y alto riesgo.(116,120,121,146,166,167) Algunos autores han observado que el mal pronóstico de *TP53* se encuentra estrechamente ligado a la presencia de cariotipo complejo.(31,124,151)

### *Número de mutaciones*

Es bien conocido que los pacientes con cariotipo complejo presentan un pronóstico muy adverso.(35) Esto se debe a que un alto número de alteraciones refleja una mayor complejidad genética, lo que se traduce en un aumento de la capacidad de proliferación, evasión del sistema inmune y resistencia farmacológica del clon neoplásico. Los estudios llevados a cabo por R. Béjar y E. Papaemmanuil en 2011 y 2013, respectivamente, mostraron que un mayor número de mutaciones somáticas se asociaba a menor SG y mayor riesgo de transformación a LMA.<sup>12</sup> T. Haferlach, en 2014, encontró que el número de mutaciones era mayor en los pacientes con AREB frente a otros subtipos de la OMS de mejor pronóstico: hasta el 60% de los pacientes con AREB-2 tenían 4 o más mutaciones. Estudios posteriores han confirmado estos hallazgos, afirmando, en general, que el riesgo aumenta significativamente a partir de 3 o 4 genes mutados.(118,119,122,123,146,156,166) Para M. Gerstung, el número de mutaciones, debido a su relación con blastos, citogenética y citopenias, tendría, sin embargo, un valor pronóstico limitado por sí mismo.(168)

### *Carga alélica*

La proporción de células mutadas se expresa mediante la VAF o carga alélica. Ahora bien, ¿cuál es la utilidad pronóstica de este parámetro? ¿Existe relación entre la VAF y otras variables? ¿Es igual de relevante una VAF del 5% que otra del 45%? C.A. Cargo observó que la VAF media de las mutaciones de pacientes con SMD era superior al

---

<sup>12</sup> En el estudio de *Papaemmanuil et al.*, que agrupaba mutaciones somáticas y alteraciones citogenéticas, la supervivencia libre de LMA fue de 49 meses en los pacientes sin alteraciones, frente a sólo 4 meses en los pacientes con 6 o más.

## INTRODUCCIÓN

40%, frente a un 9-10% en sujetos sanos con mutaciones, lo que sugiere una relación directa entre la VAF y el desarrollo de displasia.(122) Sin embargo, en pacientes con SMD establecido los trabajos que han intentado evaluar si la VAF influye en el pronóstico han arrojado resultados dispares. Así, Y. Jiang encontró que los pacientes con mutación de *TET2* y VAF  $\geq 18\%$  tenían peor pronóstico que los mutados con VAF  $< 18\%$ .(166) Autores como G. Montalbán-Bravo, K. Al-Issa, M. Belichova o D.A. Sallman coinciden en afirmar que el mal pronóstico de las mutaciones de *TP53* se correlaciona directamente con la VAF.(169–172) E. Bernard, asimismo, que el pronóstico de las mutaciones de *TP53* depende de si éstas son bialélicas (pronóstico muy desfavorable), monoalélicas con VAF  $> 23\%$  (mejor pronóstico) o monoalélicas con VAF  $\leq 23\%$  (similar a pacientes no mutados).(173) Por el contrario, M.G. Della Porta no encontró diferencias pronósticas en cuanto la VAF, con un punto de corte del 10%, en pacientes con mutaciones de *ASXL1*, *RUNX1* y *TP53*.(174) Igualmente, para S. Goel el pronóstico de las mutaciones de *TP53* con VAF  $< 20\%$  no difiere de las que presentan una VAF superior.(153)

### **1.6.2. Mutaciones somáticas y modelos pronósticos**

En el futuro, el creciente conocimiento sobre el impacto de las mutaciones somáticas en pacientes con SMD permitirá desarrollar, en combinación con las variables ya conocidas, nuevos y más robustos índices pronósticos. Hasta el momento, la información es tan abundante como confusa, y hasta contradictoria, dada la enorme cantidad de genes implicados y las múltiples formas en que las distintas mutaciones pueden interaccionar entre sí. Algunos autores, no obstante, han intentado elaborar modelos pronósticos basados en las mutaciones somáticas. Haferlach, a partir de una de las mayores series de pacientes con SMD secuenciados, ideó un modelo pronóstico basado en 14 genes, que permitía diferenciar 4 grupos pronósticos: bajo, intermedio, alto y muy alto riesgo, con supervivencias a 3 años del 95.2%, 69.3%, 32.8% y 5.3%, respectivamente.(118) Otros autores también han diseñado sus propios índices pronósticos: A. Nazha ha combinado el IPSS-R con las mutaciones de *EZH2*, *SF3B1* y *TP53*, Jiang ha incorporado al IPSS las mutaciones de *ASXL1*, *TP53*, *JAK2* y *TET2* con VAF  $\geq 18\%$  en pacientes de bajo riesgo, Bejar, también en pacientes de bajo riesgo, ha integrado las mutaciones de *EZH2* en el índice LR-PSS (que incluye variables como la edad, la cifra de plaquetas y hemoglobina, la citogenética y el porcentaje de blastos) y N. Gangat ha crado un modelo basado en la edad, el cariotipo y algunas alteraciones de mal pronóstico (*RUNX1*, *ASXL1* y ausencia de *SF3B1*).(133,137,166,175) En cuanto a la LMMC, C. Elena ha diseñado un modelo

## INTRODUCCIÓN

que incorpora al CPSS (*CMML Prognosis Scoring System*) las mutaciones de *RUNX1*, *NRAS*, *SETBP1* y *ASXL1*, con 4 grupos de riesgo, denominado CPSS-Mol.(164)

### **1.6.3. Hematopoyesis clonal y síndromes mielodisplásicos**

Trastornos como la Linfocitosis B Monoclonal (LBM) o la Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (GMSI) son bien conocidos. Se trata de patologías de origen clonal, relacionadas con la edad, con una prevalencia elevada, de curso indolente y que eventualmente pueden degenerar en leucemia linfática crónica o mieloma múltiple, respectivamente, lo que ocurre con una probabilidad del 1% anual.(176) Ahora sabemos que también hay sujetos que pueden presentar mutaciones somáticas relacionadas con neoplasias mieloides en células hematopoyéticas en ausencia de enfermedad, lo que se denomina *hematopoyesis clonal*.

Las primeras evidencias de hematopoyesis clonal sana surgieron en los años 90, cuando se observó que un importante número de mujeres de edad avanzada presentaba un patrón de inactivación del cromosoma X sesgado, o lo que es lo mismo, clonal, empleando para ello la amplificación del gen del Receptor de Andrógenos Humano (*HUMARA*), técnica desarrollada en 1992<sup>13</sup>.(177) También se sabe que existen sujetos sanos portadores de clones con la mutación del gen *PIGA*, característica de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN),(178) así como de alteraciones citogenéticas como la pérdida del cromosoma Y, presente en el 5-10% de los varones ancianos, la trisomía 8 y la delección 20q-(30,176) En 2014, se publicaron 2 importantes estudios que mostraban que un gran número de personas sanas, a partir de los 65 años, presentaba mutaciones en genes relacionados con neoplasias mieloides.(179,180) Sin embargo, sólo 3 de estos genes se encontraban mutados con una alta frecuencia: *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*. Estas mutaciones son excepcionales en menores de 50 años (0.7%), pero su frecuencia aumenta exponencialmente a partir de

---

<sup>13</sup> Recordemos que en las mujeres (que poseen un cariotipo 46,XX), para compensar la dotación genética extra respecto de los varones (46,XY), uno de los cromosomas X se encuentra metilado, lo que produce su "silenciamiento". Mediante unas enzimas se degrada el DNA no metilado (activo), mientras que el DNA metilado (inactivo) queda intacto; a continuación, se realiza la amplificación del gen *HUMARA* mediante PCR y el producto resultante se traslada a un gel de electroforesis, en que se observan 2 bandas, una por cada alelo. En condiciones normales, ambas bandas serán similares, ya que el porcentaje de inactivación de cada alelo es el mismo (en torno al 50%). Por el contrario, si uno de los alelos inactivados predomina sobre otro (inactivación sesgada) se observará una banda más gruesa; esto indicará que existe una proliferación de células con el mismo patrón de activación.

## INTRODUCCIÓN

los 65<sup>14</sup>. En ambos estudios se observó un aumento de la mortalidad, del riesgo de neoplasias hematológicas (de 11 a 23 veces) y del riesgo de enfermedad cardiovascular, diabetes y cáncer no hematológico (el 42% de pacientes con cáncer tenían mutaciones 6 meses antes). Sin embargo, el riesgo absoluto de desarrollar una neoplasia hematológica resultó del 0.5-1% anual, similar al que presentan los pacientes con LBM y GMSI. Además, el riesgo de cáncer hematológico se relacionaba con la VAF, siendo casi 50 veces mayor si la VAF superaba el 10%. Entre quienes desarrollaban cáncer hematológico la VAF era del 25%, frente al 12% entre los que no lo desarrollaban.

Éstos y otros estudios posteriores(181) fueron la base sobre la cual se asentó el concepto de *Hematopoyesis Clonal de Potencial Indeterminado* (CHIP, del inglés *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*), cuyos criterios diagnósticos son: mutación somática de genes relacionados con neoplasias hematológicas con una VAF superior al 1%, exclusión de neoplasia hematológica y ausencia de criterios de GMSI, LBM o HPN.(176) La CHIP añade complejidad a la fisiopatología de los SMD, muchos de los cuales resultarían de la evolución de un “clon CHIP”, probablemente con la participación de alguna mutación adicional, ya que las mutaciones de genes CHIP carecerían, en general, de potencial “leucemógeno” suficiente por sí solas.(44,182) Esta nueva definición ha dado lugar a su vez a otra, la de Citopenia Clonal de Significado Incierto (CCUS, del inglés *Clonal Cytopenia of Undeterminate Prognosis*), que se refiere a aquellas citopenias idiopáticas que no cumplen criterios de SMD (ICUS) pero presentan mutaciones somáticas típicas.(182) Un 36% de los pacientes con ICUS presentan, de hecho, al menos 1 mutación somática. Los pacientes con CCUS presentan un riesgo de desarrollar una neoplasia mieloide del 85% a los 5 años y del 95% a los 10 años, frente al 9% de los pacientes con ICUS que no presentan mutaciones somáticas. Precisamente, la ausencia de mutaciones en pacientes con ICUS posee un alto Valor Predictivo Negativo (VPN) de hemopatía maligna. Ahora bien, no todas las mutaciones somáticas predicen transformación a SMD o LMA. Para L. Malcovati la presencia de mutaciones aisladas en *TET2*, *DNMT3A* o *ASXL1* posee un bajo VPP de transformación a SMD o LMA, pero éste aumenta si se asocian a otras mutaciones; por el contrario, mutaciones en *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *JAK2* o *RUNX1* poseerían por sí solas un alto VPP de hemopatía maligna, observando que la SG de los pacientes con CCUS con un patrón mutacional “altamente específico” es similar a la de los pacientes con SMD establecido.(44) El estudio de *Zheng et al.* mostró que las

---

<sup>14</sup> Según el estudio de *Jaiswal et al.* la prevalencia de mutaciones somáticas fue del 5.6% entre los 60 y los 70 años, 9.5% entre los 70 y los 80, 11.7% entre los 80 y 90, y 18.4% por encima de los 90 años.



## INTRODUCCIÓN

mutaciones cuya VAF excede el 20% o la presencia de 2 o más mutaciones con una VAF  $\geq 10\%$  en pacientes con ICUS tiene un VPP de SMD de alrededor del 95.9%.(183)

El descubrimiento de la CHIP constituye un avance enormemente importante en la comprensión de la patogénesis de los SMD. Sin embargo, aunque las mutaciones somáticas son necesarias, en general no son suficientes por sí solas para hacer emerger un clon displásico, por lo que parece necesaria la cooperación de varias de ellas entre sí.

### **1.6.4. Evolución clonal de los síndromes mielodisplásicos**

Un clon es un conjunto de células que deriva de un ancestro común, cuyo genoma comparte.(107) En *El origen de las especies* (1985), Charles Darwin afirmaba que “las variaciones, por ligeras que sean y cualquiera que sea la causa de la que procedan, si son en algún grado provechosas a los individuos de una especie [...], tenderán a la conservación de estos individuos y serán, en general, heredadas por la descendencia”. Nowell, en *The clonal evolution of tumor cell populations*, artículo publicado en 1976, aseveraba que “la mayoría de las neoplasias surgen de una sola célula, y la progresión tumoral resulta de la variabilidad genética adquirida por el clon original, permitiendo la selección secuencial de líneas más agresivas”.(184) Por su parte, Fisher ya apuntó en 1973 que los SMD se originaban a partir de un precursor hematopoyético multipotente que sufría algún tipo de alteración genética, como ocurría con el cromosoma Philadelphia en la LMC. Hoy sabemos que las neoplasias evolucionan como cualquier organismo vivo, solo que los cambios que en los organismos superiores acontecen a lo largo de miles o millones de años a nivel celular ocurren con mayor celeridad. Así, la aparición de una mutación en el ADN da lugar a una ventaja selectiva que permite al clon mutado, bajo unas determinadas circunstancias, competir con otros clones, evitando los mecanismos de reparación celular, escapando a la acción neutralizadora del sistema inmune, auto-perpetuándose proliferando y migrando a diferentes partes del organismo.

La aparición de mutaciones somáticas es un proceso secuencial, de menor a mayor complejidad genética: primero surge un clon portador de una mutación *iniciadora* y, a partir de éste, debido a que el genoma de la célula se vuelve cada vez más inestable, surgen subclones portadores de mutaciones *cooperadoras*. Estos subclones (clones que no están en la totalidad del clon neoplásico) pueden evolucionar siguiendo una línea continua, o separarse unos de otros, como si fueran ramas de un mismo tronco, dando lugar a diferentes patrones evolutivos. Las razones por las que aparecen

## INTRODUCCIÓN

nuevas mutaciones son diversas: la existencia de mutaciones previas, que aceleran la adquisición de otras nuevas; el envejecimiento fisiológico; la exposición a agentes cancerígenos, que ocasionan daños en el ADN; los estados de inmunosupresión, ya sean patógenos o iatrogenos<sup>15</sup>; o la eliminación de clones competidores más “débiles” por los tratamientos antineoplásicos. Se trata, pues, de un proceso de selección natural en el que unos clones rivalizan con otros, siendo los más agresivos y resistentes los que acaban predominando y manifestándose en forma de SMD de alto riesgo o LMA: tal es la evolución natural que, con el tiempo, presentan la mayoría de los pacientes con SMD.

Uno de los hechos más evidentes de la evolución de los SMD, es que algunas mutaciones tienden a aparecer antes que otras. En general, y para modelos de evolución lineal, se da por hecho que toda mutación que precede en el tiempo a otra ha de tener siempre una VAF mayor. Cuando un paciente presenta varias mutaciones, lo más probable es que pertenezcan a un mismo clon, o que se trate de un clon con varios subclones; en cualquiera de ambos casos habrá siempre una mutación *iniciadora* (o a veces varias), cuya VAF será mayor que la del resto, ya que estará presente en todos los subclones. A partir de aquí, el “árbol genealógico” puede complicarse si la línea principal se ramifica por la aparición de subclones que compiten entre sí. Para confirmar que dos mutaciones pertenecen al mismo clon, la suma de la VAF de ambas ha de ser superior o igual al 55% (en teoría sería suficiente un 51%, pero hay que tener en cuenta el margen de error de la técnica de detección). Por ejemplo, si un paciente presenta una mutación con una VAF del 40%, lo que quiere decir que está presente en el 80% de las células analizadas, y presenta otra con una VAF del 20%, ésta nunca podría corresponder a un clon distinto, ya que la suma de ambas sería mayor que la celularidad total.<sup>16</sup> De esta forma, se puede establecer una secuencia más o menos probable de adquisición de mutaciones.(187) Hasta el

---

<sup>15</sup> La aplasia medular adquirida es una enfermedad donde los progenitores hematopoyéticos sufren el “ataque” del propio sistema inmune, y un buen ejemplo de lo que significa la selección de clones neoplásicos. Es bien sabido que en estos pacientes tanto las características del microambiente de la médula ósea como el tratamiento inmunosupresor favorecen la aparición de clones malignos que acaban desembocando en LMA o SMD. El riesgo de que esto ocurra es, de hecho, del 15%. La prueba de esta selección clonal es que los pacientes con aplasia medular adquirida presentan hasta un 35% de mutaciones somáticas.(185,186)

<sup>16</sup> Mossner considera que la mutación A precede a B cuando tiene una VAF mayor en al menos un 10%; la suma de ambas debe ser igual o superior al 55%, ya que en caso contrario podría tratarse de clones distintos.

## INTRODUCCIÓN

momento no se ha observado que el pronóstico de una mutación sea distinto por ser clonal o subclonal, tal vez porque el efecto acumulativo de las mutaciones sea más importante que el orden en que éstas se suceden.(188)

Se estima que se requiere una media de entre 5 y 8 mutaciones para desarrollar cáncer, aunque esta cifra es menor en el caso de las neoplasias hematológicas.(108) Según Haferlach, las mutaciones en genes del espliceosoma y relacionados con la metilación del ADN suelen tener una VAF mayor, lo que indicaría que son de aparición más temprana; luego surgirían las mutaciones en genes implicados en la modificación de las histonas y en la transcripción del ADN, y finalmente las que afectan a genes de las vías de señalización intracelular.(118) La mayoría de autores está de acuerdo en líneas generales con este modelo, si bien algunos sitúan también las mutaciones de *TP53* entre las de inicio.(119,133,176,182,187) Para explicar por qué este proceso sigue un orden determinado y no otro, Pappaemanuil plantea la hipótesis de la *predestinación*: según el gen mutado inicialmente, la célula evolucionará en una dirección distinta; cada mutación se produciría, por tanto, en un contexto genético específico.(119) En este sentido, Ortmann encontró que los pacientes con SMD y mutaciones de *TET2* o *JAK2* aisladas se mantenían estables, mientras que la adquisición de mutaciones de *TET2* en pacientes con mutaciones de *JAK2* previas favorecía la mieloproliferación... pero no al revés.(189) Expresado de otro modo, no es lo mismo sumar o restar antes de multiplicar o dividir que hacerlo a la inversa: el resultado final cambia. Las mutaciones de *TP53* podrían ser una excepción a lo dicho hasta ahora, ya que parecen tener potencial “leucemógeno” suficiente para no requerir el concurso de mutaciones cooperadoras, de ahí que con frecuencia se presenten aisladas.(187,190)

Las mutaciones en genes reguladores de la transcripción y de las vías de señalización surgen casi siempre tardíamente y suelen ir asociadas a transformación leucémica; las alteraciones citogenéticas parecen ser también eventos tardíos, por lo que el cariotipo sólo permitiría detectar alteraciones en fases avanzadas de la enfermedad.(187) En la progresión, las mutaciones del diagnóstico suelen presentar un incremento de la VAF, y con frecuencia surgen mutaciones nuevas, más típicas de LMA, como *FLT3*, *RUNX1* o *RAS*.(148,191) La progresión a LMA suele producirse con ganancia de al menos una mutación, que afecta casi siempre a genes de las vías de señalización.(192) H. Mikishima observó que el aumento de la VAF en mutaciones que suelen estar presentes en SMD predice progresión a alto grado, mientras que la transformación a LMA se ve precedida por la aparición de mutaciones nuevas (*FLT3*, *PTPN11*, *WT1*,

## INTRODUCCIÓN

*IDH, NPM1, NRAS*).(193) Dado que la aparición de mutaciones subclonales parece asociarse claramente con progresión a LMA, su detección en el transcurso de la enfermedad puede ser útil para tomar decisiones antes de la progresión clínica.(192)

### ***1.6.5. Mutaciones somáticas y respuesta al tratamiento en los síndromes mielodisplásicos***

Janssen, en 1989, citaba el caso de un paciente con AREB en el que la mutación de *RAS* desapareció tras el tratamiento con citarabina a dosis bajas.(194) Cabe preguntar no sólo si las mutaciones, además de influir en la erradicación o selección de los clones mutados, pueden también influir también en la mejor o peor respuesta al tratamiento administrado. Conocer el impacto de las mutaciones en la SG y en la incidencia de recaída podría ayudarnos a saber cómo de sensibles son estas mutaciones al tratamiento administrado.

#### *Lenalidomida*

Lenalidomida fue el primer fármaco en demostrar un impacto beneficioso en un subgrupo de pacientes con SMD portadores de una alteración genética específica: la delección 5q. Se vio, sin embargo, que no todos los pacientes respondían, o bien perdían la respuesta muy precozmente. No tardó en descubrirse que esto era debido a la presencia de mutaciones en el gen *TP53*, presentes en el 18-19% de estos pacientes. Aunque los pacientes con síndrome 5q- son considerados en general como de bajo riesgo, los portadores de mutaciones de *TP53* presentan resistencia a lenalidomida y un pronóstico adverso.(167,195) En pacientes sin 5q- tratados con lenalidomida, se ha observado que la VAF de las mutaciones detectadas al diagnóstico (*SF3B1*, *TET2*, *DNMT3A* y *ASXL1*, principalmente) disminuye en presencia de lenalidomida y que esta disminución es directamente proporcional a la respuesta alcanzada; además, los pacientes con mutación de *DNMT3A* son más sensibles al tratamiento.(196) A pesar de lo anterior, parece que en pacientes tratados con lenalidomida los genes de hematopoyesis clonal persisten, incluso aunque desaparezca el clon 5q-, que parece ser un evento tardía.(187)

#### *Hipometilantes*

Los primeros estudios realizados en pacientes tratados con azacitidina mostraban que los pacientes con alteraciones del cromosoma 7 (-7/7q-) presentaban una mayor SG, en tanto los que presentaban un cariotipo complejo tenían menor SG y respuestas

## INTRODUCCIÓN

más cortas.(55,87) Montalbán-Bravo observó que los pacientes tratados con azacitidina con  $\geq 3$  mutaciones presentaban menor SG y SLP.(124) Varios trabajos sugieren, que las mutaciones de *TET2*, *DNMT3A* y *SF3B1*, y la ausencia de mutaciones de *ASXL1*, *TP53*, *RUNX1*, *SETBP1* y *NPM1*, se asocian a una mejor respuesta a los agentes hipometilantes, en ocasiones sin claro beneficio en la supervivencia.(147,197–201) Por el contrario, J.S. Welch descubrió que los pacientes con SMD y LMA y mutación de *TP53* respondían adecuadamente y “aclaraban” la mutación tras 10 ciclos, si bien en ninguno de los pacientes analizados se logró un “aclaramiento” de todas las mutaciones que presentaban al diagnóstico.(202) Otros estudios no han identificado mutaciones que predigan respuesta o supervivencia en este grupo de pacientes.(203) No parece, asimismo, que el grado de metilación se relacione con la respuesta a los hipometilantes.(197)

### *Luspatercept*

Luspatercept ha sido el primer fármaco aprobado para el tratamiento de pacientes con un fenotipo, el SMD-SA, asociado a la mutación de un gen específico: *SF3B1*. Las recientes investigaciones llevadas a cabo en estos pacientes han mostrado que la respuesta está directamente relacionada con el número de mutaciones: la tasa de independencia transfusional  $\geq 8$  semanas fue de 36%, 35%, 42% y 33% en pacientes con una, dos, tres o cuatro o más mutaciones, respectivamente.(81)

### *Trasplante alogénico*

En 2014, Bejar observó que las mutaciones de *TP53*, *TET2*, *DNMT3A* y el cariotipo complejo se asociaban con una menor SG en pacientes sometidos a TPH alogénico, y que los pacientes con cariotipo complejo y mutación de *TP53* tenían un pronóstico especialmente desfavorable en comparación con los que presentaban solo cariotipo complejo o mutaciones de *TP53*, lo que ha sido confirmado por T. Yoshizato.(151,204) En este estudio, *TP53* fue el único gen cuyas mutaciones se relacionaron con una mayor incidencia acumulada de recaída. Numerosos estudios muestran que los pacientes con mutaciones de *TP53*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *RUNX*, *JAK2*, *U2AF1*, *EZH2* y genes de la vía *RAS* presentan una menor supervivencia global y/o un mayor riesgo de recaída en el contexto del trasplante.(152,174,205–208) Della Porta ha demostrado que el número de mutaciones se relaciona directamente con la incidencia de recaída e inversamente con la supervivencia global.(174) Los estudios de M. Kim y R.C. Lindsley no lograron demostrar que desarrollar EICRc modifique el mal pronóstico de los pacientes con mutaciones de *TP53*.(206,208) En general, en los trabajos

## INTRODUCCIÓN

mencionados el porcentaje de pacientes con mutaciones previas al trasplante fue inferior al observado en los SMD al diagnóstico, debido sin duda a la acción del tratamiento citorreductor previo, ya fueran agentes hipometilantes o quimioterapia intensiva.

Algunos trabajos han analizado también la importancia de la detección de mutaciones somáticas tras el trasplante para predecir el riesgo de futuras recaídas. En un grupo de pacientes con SMD/NMP, Y. Fu observó que en aquellos que presentaban mutaciones por NGS a los 6 meses del trasplante el riesgo de recaída era mayor.(209) Asimismo, el estudio de *Duncavage et al.* confirmó que los pacientes con mutaciones con una VAF de al menos el 0.5% en el día +30 presentaban un alto riesgo de recidiva (HR 4.48).(210) Resultados similares han sido reportados por otros autores.(211,212)

La EICRc, como ya se ha señalado, desempeña un importante papel en el control de la enfermedad post trasplante, evitando la recaída. En teoría, los clones supervivientes podrían llegar a desaparecer gracias al EICL, si bien las evidencias al respecto son escasas.

### *Quimioterapia intensiva*

Son pocos los estudios que han evaluado el impacto de las mutaciones en la respuesta a la quimioterapia intensiva en pacientes con SMD, pero parece que ésta podría contribuir a reducir la carga alélica de los clones mutados en el momento del diagnóstico. El hecho de que los pacientes con SMD recaigan sistemáticamente tras haber recibido quimioterapia indica la pervivencia del clon mutado, pero si la ausencia de mutaciones previa al trasplante se traduce, como parece, en una mayor supervivencia, parece razonable suponer que el “aclaramiento” de dichas mutaciones (entendido no como eliminación, sino como reducción de su carga alélica hasta valores indetectables) redundaría en un mejor pronóstico, especialmente en aquellos pacientes con una carga tumoral alta. Al mismo tiempo, parece que las mutaciones somáticas confieren resistencia frente a la quimioterapia intensiva. Por ejemplo, la presencia de mutaciones de *RUNX1* en pacientes con LMA se asocia con una tasa de respuestas completas inferior en pacientes con LMA tratados con quimioterapia intensiva, especialmente aquellos con LMA-s, en particular cuando se asocian con otras mutaciones, como *ASXL1*, *SRSF2* y *PHPF6*.(213)

## INTRODUCCIÓN

### *Agentes estimulantes de la eritropoyesis*

Como se mencionó en el apartado correspondiente, algunos estudios ya han demostrado que tener un cariotipo adverso o un IPSS o IPSS-R de alto riesgo afecta negativamente a la respuesta a los AEE. El estudio llevado a cabo por *Kosmider et al.* parece indicar que un número elevado de mutaciones somáticas ( $>2$ ) se asocia a una menor probabilidad de respuesta eritroide (46% vs. 74% en los pacientes con  $\leq 2$  mutaciones), aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística en el análisis multivariante. Tampoco se encontró asociación entre el número de mutaciones y la duración de la respuesta eritroide, pero sí entre el número de mutaciones y la SG.(156)





# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. HIPÓTESIS

Los SMD representan un conjunto de trastornos de diagnóstico complejo, pronóstico generalmente desfavorable para los que no disponemos de tratamientos verdaderamente eficaces en la mayoría de los casos. Tan sólo una minoría de pacientes puede beneficiarse del TPH alogénico, el único tratamiento que ha demostrado capacidad curativa, aunque presenta una importante toxicidad y no logra evitar un alto número de recaídas. Los pacientes con SMD de alto riesgo en general tienen un pronóstico muy adverso y los tratamientos disponibles únicamente logran retrasar unos meses la progresión de la enfermedad, mientras que los de bajo riesgo que presentan anemia con dependencia transfusional no siempre responden a los AEE, y cuando lo hacen las respuestas no siempre son duraderas, con el consiguiente deterioro de su calidad de vida y las complicaciones propias de la transfusión periódica. Las futuras investigaciones en SMD deberán ir encaminadas, en última instancia, a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes. Si bien en los últimos años no han surgido novedades terapéuticas importantes, con la sola excepción de luspatercept para pacientes con SMD de bajo riesgo con sideroblastos en anillo, hemos asistido, en el campo del diagnóstico, a la irrupción de la NGS, cuya aplicación podría resultar de gran utilidad en varios campos.

A lo largo de los últimos años el conocimiento sobre el papel de las mutaciones somáticas en los SMD ha ido incrementándose exponencialmente. Sin embargo, nos encontramos en una fase incipiente en lo que a su aplicación clínica y estandarización se refiere. Los paneles de genes mieloides proporcionan gran cantidad de información, y aunque su uso está cada vez más extendido, existen aún aspectos por dilucidar.

Resulta evidente que la aplicación de las mutaciones somáticas en el futuro se llevará a cabo en tres áreas: el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento. Respecto al diagnóstico, la detección de mutaciones en genes mieloides contribuirá a apoyar el diagnóstico de SMD en casos con morfología dudosa y ausencia de alteraciones citogenéticas, o a identificar a pacientes con CCUS y realizar un correcto seguimiento de los mismos. También, se podrán identificar subtipos de SMD con características propias en base a la presencia de mutaciones concretas, como de hecho ya sucede con las mutaciones de *SF3B1* y el SMD-SA. En cuanto al pronóstico, a pesar de que disponemos de una amplia y creciente evidencia acerca del papel desempeñado por algunas mutaciones, aún no se ha logrado unificar e integrar dicha información junto con otras variables en índices pronósticos potentes y de fácil manejo en la práctica clínica habitual que, una vez desarrollados, deberán ser debidamente validados con

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

series amplias de pacientes. Además, todavía es poco lo que sabemos acerca de cómo interaccionan entre sí las distintas mutaciones. Por último, el conocimiento de las mutaciones somáticas será fundamental en el futuro para explorar nuevos tratamientos u optimizar los ya existentes. En el primer caso, mediante NGS podemos identificar mutaciones que afectan a vías cuyo normal funcionamiento podría ser, al menos parcialmente, restaurado con nuevos fármacos. En cuanto a la optimización de los tratamientos ya existentes, la NGS nos puede ayudar a determinar si un paciente presenta un perfil mutacional que prediga una mayor o menor sensibilidad a fármacos ya disponibles, lo que ayudaría a reducir costes innecesarios, evitaría toxicidades, optimizaría las tasas y la calidad de las respuestas y facilitaría la toma de decisiones. Además, la identificación de mutaciones por NGS nos permitirá realizar el seguimiento de las mismas durante la evolución de la enfermedad, con lo que podremos evaluar con mayor precisión la respuesta terapéutica, así como adelantarnos a la progresión clínica y llevar a cabo intervenciones precoces, en especial en pacientes jóvenes.

Profundizar en el conocimiento de las mutaciones somáticas a lo largo de la evolución de la enfermedad sin duda nos permitirá manejar mejor a los pacientes con SMD, sabiendo qué tratamientos son más o menos eficaces en determinados “contextos mutacionales”, si la presencia o ausencia de mutaciones somáticas predice una peor o mejor respuesta, si el mal pronóstico de algunas mutaciones puede ser vencido con determinadas estrategias terapéuticas o si la detección de mutaciones resulta útil para predecir recaída o transformación a SMD de alto grado o LMA.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.2. OBJETIVOS

*Objetivo general:*

Determinar el impacto de las mutaciones somáticas en el pronóstico y la respuesta de pacientes con SMD tratados con diferentes modalidades terapéuticas: agentes estimulantes de la eritropoyesis y trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

*Objetivos específicos:*

Evaluar la eficacia y la seguridad del tratamiento con AEE en pacientes del registro español de SMD (RESMD) y confirmar la prevalencia y el impacto de las mutaciones somáticas en estos pacientes en la respuesta eritroide, la supervivencia y la transformación a LMA.

Determinar la prevalencia de mutaciones somáticas en pacientes con SMD sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y si influyen en la supervivencia global y en la incidencia de recaída.

Determinar si la EICRc puede modificar el pronóstico de las mutaciones somáticas en pacientes trasplantados.

Determinar si el trasplante alogénico es capaz de eliminar los clones mutados en pacientes con SMD sometidos a dicho tratamiento.

Definir el perfil mutacional de los pacientes con SMD trasplantados en el momento de la recaída.

Definir el estado mutacional de los pacientes con SMD trasplantados que no recaen en el día +100 y determinar el impacto en la recaída posterior.

## **Nota aclaratoria**

Los apartados **MATERIAL Y MÉTODOS**, **RESULTADOS** y **DISCUSIÓN** han sido organizados en 3 capítulos, cada uno de los cuales consta del correspondiente apartado.

## **CAPÍTULO 1**

**Efectos de las mutaciones somáticas en  
pacientes con síndromes mielodisplásicos  
de bajo riesgo tratados con agentes  
estimulantes de la eritropoyesis. Resultados  
del estudio SPRESAS**





## CAPÍTULO 1

### 3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### *Estudio SPRESAS*

Entre 2013 y 2014, 959 pacientes con SMD del Registro Español de SMD (RESMD) fueron incluidos en el estudio SPRESAS (*Spanish Registry of Erythropoietic Stimulating Agents Study*). Se incluyeron en dicho estudio pacientes con SMD *de novo* con anemia (hemoglobina <11 g/dL), bajo riesgo según el IPSS (bajo e intermedio-1) y que no hubieran recibido tratamiento modificador alguno. Los pacientes debían haber sido diagnosticados antes de diciembre de 2011 y presentar suficientes datos relativos a la enfermedad, la respuesta y la supervivencia. Los siguientes 237 casos se excluyeron: 23 tratados con potenciales agentes modificadores, 38 con SMD secundario, 21 con IPSS > intermedio-1, 97 pacientes con hemoglobina >11 g/dl, 31 diagnosticados después del 31 de diciembre de 2011, 3 en progresión a SMD de alto riesgo y 24 con datos incompletos. Los restantes 722 pacientes con SMD *de novo*, IPSS bajo/intermedio-1 e información suficiente fueron analizados. El objetivo primario del análisis fue evaluar la eficacia y la seguridad de los AEE en pacientes con SMD de bajo riesgo del RESMD, mientras que los objetivos secundarios fueron determinar la duración de la Respuesta Eritroide (RE), la SG y la Incidencia Acumulada (IA) de transformación a LMA.

La RE fue definida de acuerdo a los criterios IWG 2006: aumento de hemoglobina  $\geq 1.5$  g/dl y reducción relevante del número de concentrados de hematíes en al menos 4 concentrados cada 8 semanas en comparación con el número de transfusiones en las 8 semanas previas. La SG fue calculada desde la fecha del diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa o la fecha de último seguimiento. La transformación a LMA fue definida como la presencia de  $\geq 20\%$  de blastos en médula ósea o sangre periférica.

#### *Estudio de mutaciones*

Analizamos retrospectivamente los datos de 65 pacientes de bajo riesgo tratados con AEE procedentes del registro SPRESAS de 5 centros españoles (Hospital Universitario de Salamanca, Hospital Universitario de León, Hospital Universitario Central de Asturias, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Hospital Clínico Universitario de Valencia) diagnosticados entre 1997 y 2011. El seguimiento de los pacientes se actualizó en agosto de 2019. De los pacientes incluidos en el registro SPRESAS en cada uno de los centros seleccionados, se escogieron muestras de los

## CAPÍTULO 1

respondedores con al menos 12 meses de duración de la respuesta y de los no respondedores, basándonos en un estudio previo que evidencia que el pronóstico de los pacientes con SMD de bajo riesgo tratados con AEE es similar entre los no respondedores y los que presentan respuestas de corta duración (<6 meses).(71)

Se seleccionó ADN genómico de células mononucleadas de médula ósea del diagnóstico; sólo en un caso se empleó sangre periférica, al no disponer de médula ósea. La extracción del ADN se llevó a cabo con QIAgen (Qiagen©) y la cuantificación por fluorometría con Qubit 2.0 (Life Technologies©). La detección de variantes se llevó a cabo mediante NGS, empleando una estrategia de secuenciación por captura con una plataforma *MiSeq* (Illumina©) y un panel de 117 genes mieloides diseñado con el programa *DesignStudio* (Illumina©), empleando 3259 sondas dirigidas a 1740 regiones, incluyendo exones, regiones de *splicing* y regiones UTR 3'/5'. (Tabla 1.1) El diseño del panel se realizó en dos pasos: primero, captura y generación de la librería mediante la metodología *Nextera Rapid Capture Enrichment Custom*, partiendo de 50 ng de ADN de cada muestra; y segundo, generación de clusters y secuenciación con la plataforma *MiSeq* de Illumina©, utilizando el kit de reactivos de 300 ciclos (obteniéndose una cobertura media de 500-600 lecturas).

### Panel de 117 genes mieloides diseñado con *DesignStudio* (Illumina)

*ABL1, AEBP2, ARID2, ASXL1, ATRX, BCAS1, BCOR, BCORL1, BCR, BMI1, BRAF, CALR, CBF, CBL, CBLB, CBL, CBLC, CD177, CDH13, CDH23, CDH3, CDK2, CDKN2A, CEBPA, CREBBP, CSF3R, CSNK1A1, CTCF, CTNNA1, CUX1, DNMT3A, UBR5, EGFR, EIF2AK2, ENG, EP300, ETV6, EZH2, FBXW7, FLT3, G3BP1, GATA1, GATA2, GCAT, GNAS, GNB1, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, IL3, IRF1, JAK1, JAK2, JAK3, JARID2, JKAMP, KDM6A, KIT, KRAS, LUC7L2, MECOM, KMT2A, KMT2D, MPL, MTOR, NF1, NOTCH1, NPM1, NRAS, NR2F6, NTRK1, NUP98, PBRM1, PDGFRA, PDGFRB, PHF19, PHF6, PHLPP1, PTEN, PTPN1, PTPN11, RAD21, RARA, RET, RPS14, RUNX1, SALL4, SBDS, SETBP1, SETD2, SF1, SF3A1, SF3B1, SFPQ, SH2B3, SMC1A, SMC3, SPARC, SRSF2, STAG1, STAG2, SUZ12, TCL1B, TERC, TERT, TET2, TGM2, TIMM50, TNFAIP3, TP53, TYK2, U2AF1, UMODL1, USB1, WASF3, WT1, ZRSR2*

**Tabla 1.1:** Panel de genes empleado en el estudio

## CAPÍTULO 1

Sólo se consideraron aquellas variantes localizadas en regiones exónicas o de splicing que causan cambios en la secuencia proteica. La mediana de cobertura mínima de las secuencias exónicas fue de 50-100 lecturas, con más de 10-20 lecturas mutadas. Las variantes fueron analizadas con el programa *IGV* (Broad Institute©). Todas las secuencias fueron evaluadas con FastQC y NGSQCToolkit v2.3.3 y alineadas con el genoma de referencia (GRCh37/hg19) con BWA v0.7.12 y GATK v.3.5. El *Q score* requerido para asegurar la calidad de los resultados fue de 30 (Q30). El llamado y la anotación de las variantes se llevaron a cabo con VarScan (v2.4), SAMTools v1.3.1 y ANNOVAR. Se utilizaron las bases de datos COSMIC y ClinVar y los predictores SIFT, PolyPhen-2 y Mutation Taster para evaluar el potencial oncogénico de las variantes. Los polimorfismos fueron excluidos del análisis. Las variantes con una VAF <5% fueron validadas mediante re-secuenciación de amplicones con el sistema GS-Junior (454-Roche), y las que tenían una VAF superior mediante Sanger.

### *Análisis estadístico*

Las comparaciones de proporciones y rangos entre diferentes variables fueron efectuadas con el test Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher. Las curvas de supervivencia fueron elaboradas empleando el método de Kaplan-Meier y comparadas con el test log-rank. El modelo de Cox fue usado para realizar el ajuste por características clínicas. Para el estudio SPRESAS, se realizó un análisis landmark y los pacientes en el brazo de soporte fueron censurados si habían muerto antes del día 100 desde el diagnóstico, ya que esta era la mediana de tiempo hasta el inicio de tratamiento con AEE. La IA de LMA se calculó empleando riesgos competitivos y las curvas se compararon con el test de Grey. El p valor se consideró significativo al nivel de 0.05. Los cálculos se realizaron con los programas R (v3.1.1), IBM SPSS v20.0 y v25.0 y Xlstat v2018.6 para la IA de LMA.

## CAPÍTULO 1

### 3.2. RESULTADOS

#### Estudio SPRESAS

De una cohorte de 722 pacientes del registro SPRESAS, 530 fueron tratados con AEE y 192 fueron manejados solo con tratamiento de soporte. La mediana de seguimiento fue de 2.9 años (p10-p90 0.696-7.662): 3.12 años en el grupo de AEE y 2.37 años en el grupo de soporte (p=0.002). La mediana de edad fue de 76 años (p10-p90 60.3-86). Las características de los pacientes incluidos en el registro SPRESAS se resumen en la Tabla 1.2.

	<b>AEE n=530</b>	<b>Soporte n=192</b>	<b>p- valor</b>
<b>Edad (mediana)</b>	77 años	76 años	<b>0.042</b>
<b>Sexo</b>	530	192	0.398
Hombre	280 (54%)	111 (58%)	
Mujer	240 (46%)	81 (42%)	
<b>Diagnóstico OMS 2008</b>	530	192	<b>0.000</b>
CRDU	48 (9.1%)	13 (6.8%)	
CRDM	182 (34.5%)	42 (21.9%)	
ARSA	101 (19.1%)	14 (7.3%)	
AREB-1	18 (3.4%)	19 (9.9%)	
AREB-2	2 (0.4%)	11 (5.7%)	
SMD inclasificable	3 (0.6%)	0 (0%)	
Síndrome 5q-	17 (3.2%)	10 (5.2%)	
LMMC	33 (6.3%)	10 (5.2%)	
SMD/NMP	7 (1.3%)	2 (1%)	
No disponible	117 (22.2%)	71 (37%)	
<b>IPSS</b>	484	185	<b>0.000</b>
Bajo	305 (63%)	74 (40%)	
Intermedio-1	179 (37%)	111 (60%)	
No disponible	46	7	
<b>IPSS-R</b>	484	185	<b>0.000</b>
Muy bajo	130 (26.9%)	18 (9.7%)	
Bajo	285 (58.9%)	94 (50.8%)	
Intermedio	63 (13%)	57 (30.8%)	
Alto	6 (1.2%)	16 (8.6%)	
No disponible	46	7	

## CAPÍTULO 1

<b>Hemoglobina (mediana)</b>	10 g/dl	9 g/dl	<b>0.000</b>
<b>Neutrófilos (mediana)</b>	2.74 x10 <sup>9</sup> /l	2.58 x10 <sup>9</sup> /l	0.742
<b>Plaquetas (mediana)</b>	214 x10 <sup>9</sup> /l	198.5 x10 <sup>9</sup> /l	0.384
<b>Blastos SP (mediana)</b>	0%	0%	<b>0.001</b>
<b>Blastos MO (mediana)</b>	1%	3%	<b>0.000</b>
<b>Eritropoyetina (mediana)</b>	59.5 U/l	142.5 U/l	<b>0.003</b>
<b>Ferritina (mediana)</b>	315 ng/ml	376 ng/ml	<b>0.009</b>
<b>Dependencia transfusional</b>	329	192	<b>0.000</b>
Sí	185 (56.2%)	184 (95.8%)	
No	144 (43.8%)	8 (4.2%)	
No disponible	201	0	
<b>Cariotipo IPSS-R</b>	484	185	0.227
Muy bueno	28 (5.8%)	5 (2.7%)	
Bueno	418 (86.5%)	163 (88.1%)	
Intermedio	37 (7.2%)	14 (7.6%)	
Pobre	3 (0.6%)	2 (1.1%)	
Muy pobre	0 (0%)	1 (0.5%)	
No disponible	46	7	

**Tabla 1.2:** Características de los pacientes del estudio SPRESAS

### *Respuesta eritroide*

Los datos sobre RE se encontraban disponibles en 478 pacientes, de los que 310 (64.8%) respondieron de acuerdo a los criterios IWG 2006, con una mediana de duración de la RE de 1.78 años (p10-p90 0.507-5.492). No se observaron diferencias entre el tipo de AEE (darbopoetina, epoetina  $\alpha$ , epoetina  $\beta$ , otros) o la dosis (baja vs. alta). De los 284 pacientes con duración de la RE conocida, 265 (93.3%) y 213 (75%) mantenían la respuesta a los 6 y a los 12 meses, respectivamente.

Las variables con impacto en la RE en el análisis univariante fueron el porcentaje de blastos, la hemoglobina, los niveles de EPO, la ferritina, la dependencia transfusional, el IPSS y la citogenética. En el análisis multivariante, sólo los niveles de EPO <200 U/l se relacionaron significativamente con una mayor RE (OR 2.446 IC 95% 1.061-5.639, p=0.036). (Tabla 1.3)

## CAPÍTULO 1

	Univariante		Multivariante			
	OR	p valor	OR	p valor	IC 95%	IC 95%
Edad ( $\geq 77$ vs. $< 77$ [ref])	0.780	0.196	1.629	0.157	0.828	3.204
Sexo (hombre vs. mujer [ref])	1.088	0.663	1.296	0.450	0.661	2.540
Dependencia transfusional (sí vs. no [ref])	1.655	0.033	1.898	0.087	0.911	3.953
IPSS (intermedio-1 vs. bajo [ref])	1.779	0.005	1.348	0.438	0.634	2.867
Hemoglobina (continua)	0.785	0.003	1.104	0.502	0.827	1.473
Hemoglobina ( $< 10$ vs. $\geq 10$ g/dL [ref])	1.511	0.032				
Neutrófilos ( $< 800$ vs. $\geq 800$ g/dL [ref])	1.160	0.767				
Blastos SP ( $> 0$ vs. 0 [ref])	2.929	0.045	1.332	0.740	0.240	7.244
Blastos MO (continua)	1.588	0.022	1.104	0.398	0.895	1.322
EPO ( $\geq 200$ vs. $< 200$ U/L [ref])	<b>3.969</b>	<b>0.000</b>	<b>2.446</b>	<b>0.036</b>	<b>1.061</b>	<b>5.639</b>
Ferritina (continua)	1.001	0.001	1.000	0.429	0.999	1.000
Cariotipo (Intermedio vs. favorable [ref])	1.876	0.056				
WHO 2008 (ARSA vs. CRDU + CRDM [ref])	0.859	0.574				
AREB	2.323	0.106				
SMD 5q-	2.613	0.059				
Otros SMD	2.821	0.008				

**Tabla 1.3.** Análisis de la respuesta eritroide: univariante y multivariante (estudio SPRESAS)

### *Seguridad*

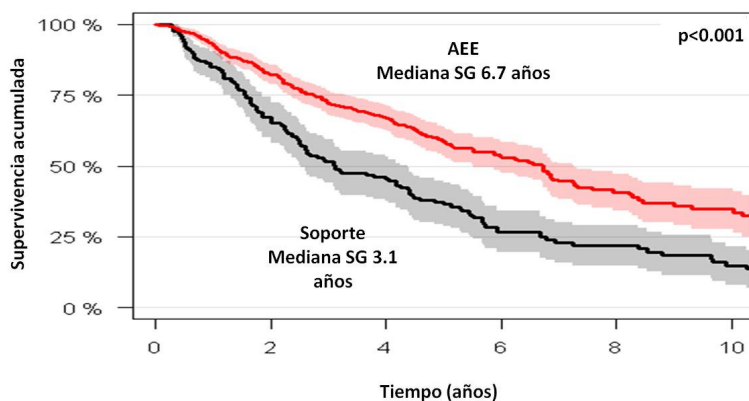
10 pacientes presentaron efectos adversos, ninguno de los cuales se relacionó con el tratamiento. En total, se reportaron 17 efectos adversos: crisis epiléptica, hemorragia postquirúrgica, síndrome anémico importante, fiebre, síndrome constitucional, hemorragia muco-cutánea, trombopenia, anorexia, diarrea, lumbalgia, astenia, vértigo, colecistitis, caída con traumatismo, erupción cutánea, insuficiencia cardíaca, hemorragia pre-retiniana y ACV. De ellos, sólo 3 se consideraron efectos adversos graves: fiebre, síndrome constitucional y caída con traumatismo. No se observó una mayor incidencia de LMA entre los pacientes tratados con AEE: 73 pacientes (13.7%) frente a 28 (15.8%) en el grupo de soporte.

### *Supervivencia global*

La mediana de SG desde el diagnóstico fue de 6.7 años (IC 95% 5.5-7.2) en el grupo de AEE y 3.1 años (IC 95% 2.6-4.4) en el de soporte ( $p < 0.001$ ). A 5 años, la SG fue

## CAPÍTULO 1

del 59% y el 37% en cada grupo, respectivamente. Entre los pacientes tratados con AEE, la mediana de SG fue de 9.0 años (CI 95% 7.3-NR) y del 70% a 5 años en los respondedores vs. 4.5 años (IC 95% 3.4-5.8) y 44% a 5 años en los no respondedores ( $p < 0.001$ ). (Figura 1.1)



**Figura 1.1.** Supervivencia global según el manejo: AEE vs. soporte (estudio SPRESAS)

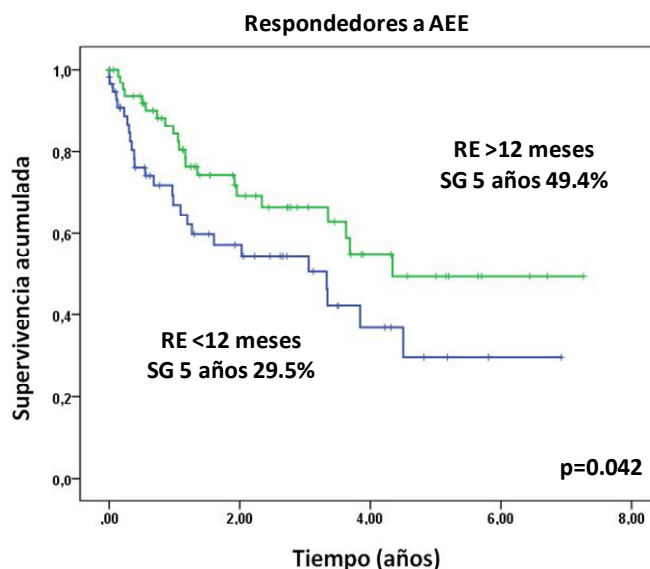
Las variables con impacto en la SG en el análisis univariante fueron la edad, el sexo, el IPSS, el porcentaje de blastos en médula ósea, la cifra de hemoglobina, la cifra de leucocitos y el tratamiento. En el análisis multivariante, las variables que retuvieron la significación estadística para una mayor SG fueron una menor edad (HR 1.05 IC 95% 1.008-1.039,  $p < 0.001$ ), el sexo femenino (HR 0.671 IC 95% 0.533-0.846), hemoglobina más alta (HR 0.874 IC 95% 0.804-0.951,  $p = 0.001$ ), leucocitos más bajos (HR 1.024 IC 95% 1.008-1.039,  $p = 0.003$ ), IPSS bajo vs. intermedio-1 (HR 1.91 IC 95% 1.514-2.411,  $p < 0.001$ ) y el tratamiento con AEE (HR 0.648 IC 95% 0.505-0.832,  $p < 0.001$ ). (Tabla 1.4)

	Univariante	Multivariante			
	p valor	HR	p valor	IC 95%	IC 95%
<b>Edad (continua)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.050</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.037</b>	<b>1.063</b>
<b>Sexo (mujer vs. hombre [ref])</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.671</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.533</b>	<b>0.846</b>
<b>Tratamiento (AEE vs. soporte [ref])</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.648</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.505</b>	<b>0.832</b>
<b>Hemoglobina (continua)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.874</b>	<b>0.001</b>	<b>0.804</b>	<b>0.951</b>
<b>Leucocitos (continua)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.024</b>	<b>0.003</b>	<b>1.008</b>	<b>1.039</b>
Blastos en MO (continua)	<0.001		no sig.		
<b>IPSS (intermedio-1 vs. bajo [ref])</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.910</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.514</b>	<b>2.411</b>

**Tabla 1.4.** Análisis de la supervivencia global: univariante y multivariante (estudio SPRESAS)

## CAPÍTULO 1

Los pacientes que no respondieron a los AEE tuvieron una supervivencia similar a aquellos con una duración de la respuesta inferior a 6 meses: mediana de SG desde el inicio del tratamiento de 3.093 años (IC 95% 2.418-3.769) y de 2.370 años (IC 95% 0.528-4.212,  $p=0.238$ ), respectivamente. Por el contrario, los que tuvieron respuestas  $\geq 6$  meses presentaron una SG, calculada a partir de los 6 meses desde el inicio del tratamiento, de 6.541 años (95% CI 5.265-7.817,  $p<0.001$ ). Se observó, asimismo, que los respondedores con una duración de la respuesta  $<12$  meses tenían también un SG similar a los no respondedores: mediana de 2.5 años vs. 6.2 años en pacientes con  $>12$  meses de duración de la respuesta, calculada a partir de los 12 meses desde el inicio del tratamiento ( $p<0.001$ ). Considerando solo a los pacientes que perdieron la RE, la mediana de supervivencia a partir de la fecha de pérdida de la respuesta fue de 2.027 años y 30.9% a 5 años en RE  $<6$  meses y de 4.34 años y 45.3% a 5 años en RE  $>6$  meses ( $p=0.029$ ), y de 3.332 años y 29.5% a 5 años en RE  $<12$  meses y de 4.34 años y 49.4% a 5 años en RE  $>12$  meses ( $p=0.042$ ). (Figura 1.2)



**Figura 1.2:** Supervivencia global desde la pérdida de respuesta eritroide en respondedores  $<12$  meses y respondedores de  $>12$  meses

La IA de LMA a 5 años desde el diagnóstico fue del 18% en el grupo de AEE y del 20% en el grupo de soporte ( $p=0.350$ ). Entre los pacientes que recibieron AEE la IA de LMA fue del 13% en los respondedores y del 28% en los no respondedores ( $p<0.001$ ). Las variables relacionadas con una mayor incidencia de IA de LMA en el análisis multivariante fueron el sexo masculino (HR 0.609 IC 95% 0.402-0.924,  $p=0.02$ ), un alto porcentaje de blastos (HR 1.229 IC 95% 1.131-1.334,  $p<0.001$ ) y el IPSS intermedio-1 (HR 1.995 IC 95% 1.205-3.303,  $p=0.007$ ). La IA de LMA a 5 años desde el inicio de



## CAPÍTULO 1

tratamiento con AEE fue del 20% en los respondedores vs. 37% en los no respondedores ( $p < 0.001$ ).

### Estudio de mutaciones

Entre los 65 pacientes con muestra analizada al diagnóstico por NGS, 23 (35.4%) eran respondedores (>365 días) y 42 (64.6%) no respondedores. Entre los respondedores, 13 (56.6%) mantuvieron la RE hasta la fecha de último seguimiento, mientras que 10 (43.5%) perdieron la respuesta. La mediana de duración de la RE fue de 4.6 años (p10-p90 1.254-11.41), con un rango de 1.01 a 11.9 años. La mediana de inicio de EPO desde el diagnóstico fue de 140 días (p10-p90 21.6-1210.6). 15 pacientes (23.1%) recibieron G-CSF concomitante con AEE.

La alteración citogenética fue la del(5)(q13q31), presente en 5 pacientes (7.7%), todos ellos categorizados como síndrome 5q-. Otras alteraciones citogenéticas fueron: -Y y +8 en 3 pacientes, del(11q) en 2 pacientes y del(20q), +17 e inv(9) en 1 paciente cada una. En solo 1 caso se detectó la del(7q) por FISH, pero no por cariotipo.

Las características clínicas de respondedores y no respondedores a AEE se resumen en la Tabla 1.5. Comparando los pacientes de la cohorte tratada con AEE del estudio SPRESAS con los pacientes del estudio de mutaciones, encontramos que ambos grupos fueron similares en cuanto a la distribución de la mayoría de variables.

	<b>Respondedores n=23 (35.4%)</b>	<b>No respondedores n=42 (64.6%)</b>	<b>p</b>
<b>Edad (mediana)</b>	76 años	76 años	0.422
<b>Sexo</b>	23	42	0.200
Hombre	9 (39.1%)	24 (57.1%)	
Mujer	14 (60.9%)	18 (42.9%)	
<b>Diagnóstico OMS 2008</b>	21	41	<b>0.042</b>
<5% blastos	20 (95.2%)	30 (73.2%)	
CRDU			
ARSA			
CRDM			
SMD-I			

## CAPÍTULO 1

>5% blastos y LMMC	1 (4.8%)	6 (14.5%)	
AREB-1			
AREB-2			
LMMC			
Otros SMD/NMP			
Síndrome 5q-	0 (0%)	5 (12.2%)	
No disponible	2	1	
<b>IPSS</b>	<b>23</b>	<b>40</b>	<b>0.781</b>
Bajo	17 (73.9%)	28 (70%)	
Intermedio-1	6 (26.1%)	12 (30%)	
No disponible	0	2	
<b>IPSS-R</b>	<b>23</b>	<b>37</b>	<b>0.157</b>
Muy bajo	9 (39.1%)	8 (20.5%)	
Bajo	13 (56.5%)	25 (64.1%)	
Intermedio	1 (4.3%)	6 (15.3%)	
No disponible	0	5	
<b>Hemoglobina (mediana)</b>	<b>9.8 g/dl</b>	<b>9.2 g/dl</b>	<b>0.033</b>
<b>Hemoglobina</b>	<b>23</b>	<b>42</b>	<b>0.188</b>
>8 g/dl	21 (91.3%)	32 (76.2%)	
<8 g/dl	2 (8.7%)	10 (23.8%)	
<b>Plaquetas (mediana)</b>	<b>270 x10<sup>9</sup>/l</b>	<b>230 x10<sup>9</sup>/l</b>	<b>0.244</b>
<b>Leucocitos (mediana)</b>	<b>5.76 x10<sup>9</sup>/l</b>	<b>4.62 x10<sup>9</sup>/l</b>	<b>0.144</b>
<b>Eritropoyetina (mediana)</b>	<b>47.9 U/l</b>	<b>110.5 U/l</b>	<b>0.027</b>
<b>Eritropoyetina</b>	<b>18</b>	<b>26</b>	<b>0.124</b>
<100 U/l	13 (72.2%)	12 (46.2%)	
>100 U/l	5 (21.7%)	14 (33.3%)	
No disponible	5	16	
<b>Ferritina (mediana)</b>	<b>449 ng/ml</b>	<b>368 ng/ml</b>	<b>0.652</b>
<b>Ferritina</b>	<b>18</b>	<b>35</b>	<b>1.000</b>
<500 ng/ml	12 (66.7%)	24 (68.6%)	
>500 ng/ml	6 (33.3%)	11 (31.4%)	
No disponible	5	7	
<b>Dependencia transfusional</b>	<b>23</b>	<b>42</b>	<b>0.000</b>
Sí	11 (47.8%)	39 (92.9%)	
No	12 (52.5%)	3 (7.1%)	
<b>Citogenética</b>	<b>23</b>	<b>39</b>	<b>0.034</b>
Normal	21 (91.3%)	26 (66.7%)	
Anormal	2 (8.7%)	13 (33.3%)	
No disponible	0	3	

## CAPÍTULO 1

Genes mutados	23	42	0.248
<3	19 (82.6%)	28 (66.7%)	
≥3	4 (17.4%)	14 (33.3%)	

**Tabla 1.5:** Características de los pacientes del estudio de mutaciones

El número de genes mutados fue: 0 genes mutados en 8 pacientes (12.3%), 1 gen mutado en 20 (30.8%), 2 genes mutados en 19 (29.2%), 3 genes mutados en 6 (9.2%), 4 genes mutados en 7 (10.8%) y 5 genes mutados en 5 pacientes (7.7%). La mediana de genes mutados por paciente fue 2. 57 pacientes (87.7%) presentaban al menos 1 mutación. Solo 3 pacientes tenían 2 mutaciones en un mismo gen: 2 en *SF3B1* y 1 en *TP53*. La VAF media fue de 32.5%, con una mediana de 34.6% (p10-p90 7.7-47.6). Para el análisis estadístico, se crearon 2 grupos de pacientes: <3 genes mutados y ≥3 genes mutados.

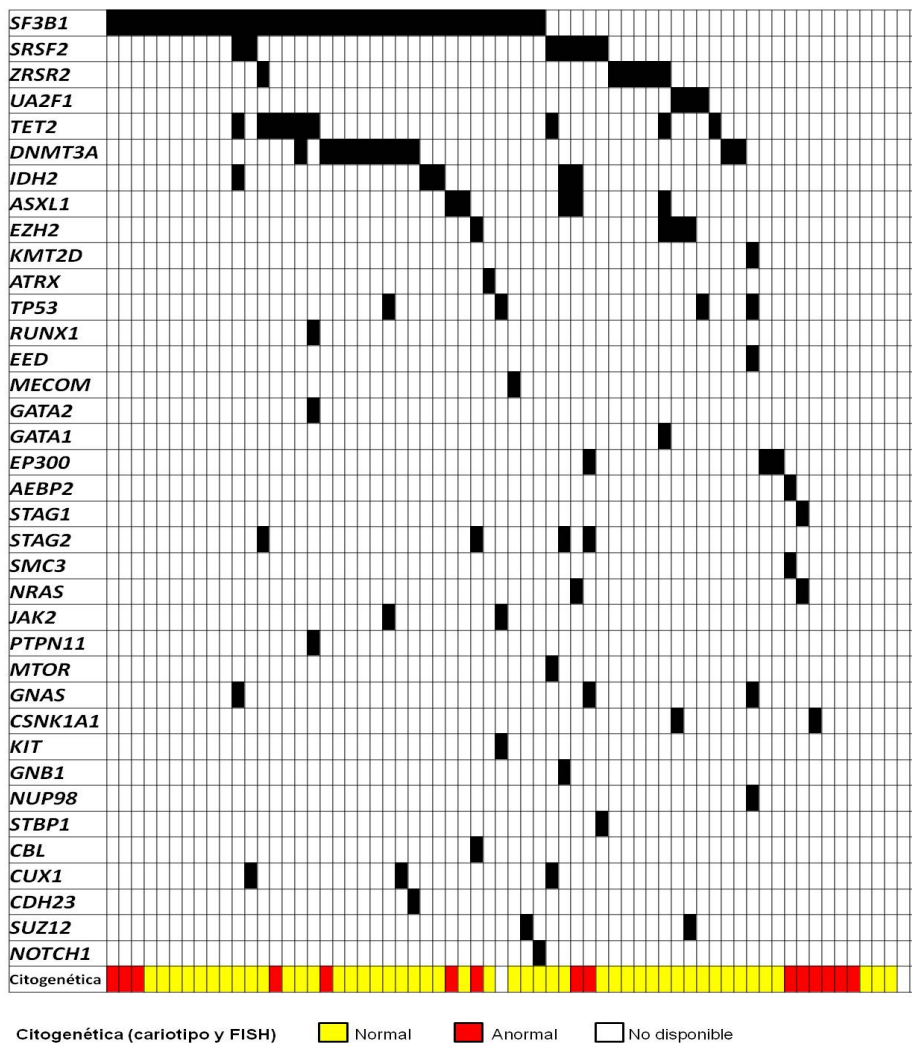
Los genes más frecuentemente mutados fueron: *SF3B1* 35 (54.8%), *DNMT3A* 11 (16.9%), *TET2* 9 (13.8%), *SRSF2* 7 (10.8%), *ZRSR2* 6 (9.2%), *ASXL1* 5 (7.7%), *IDH2* 5 (7.7%), *EZH2* 4 (6.2%), *STAG2* 4 (6.2%) y *TP53* 4 (6.2%). El resto de mutaciones se detectaron en menos del 5% de pacientes. Hubo 47 pacientes (72.3%) con mutaciones en genes de *splicing*, siendo éste el grupo de genes más frecuentemente mutados. De estos pacientes, casi todos ellos tenían una única mutación de *splicing*; solo 3 tenían 2 genes de *splicing* mutados simultáneamente: 2 con *SF3B1* y *SRSF2* y 1 con *SF3B1* y *ZRSR2*. Las mutaciones de *TET2* y *DNMT3A*, genes normalmente asociados con hematopoyesis clonal, se encontraron raramente aisladas: 8 de 9 pacientes con mutación de *TET2* y 9 de 11 pacientes con mutación de *DNMT3A* presentaban mutaciones en genes de *splicing*, principalmente *SF3B1* (6/9 y 9/11, respectivamente). (Figura 1.3)

### *Respuesta eritroide y mutaciones*

Observamos una correlación entre el número de mutaciones y la respuesta a los AEE, aunque sin alcanzar la significación estadística, siendo la RE del 40.4% entre pacientes con <3 genes mutados y del 22.2% en pacientes con ≥3 genes mutados (p=0.170). (Figura 1.4) Asimismo, la proporción de pacientes con <3 genes mutados fue del 82.6% entre respondedores y del 66.7% entre no respondedores. Ninguna mutación se relacionó con la RE; sin embargo, observamos una tendencia a una mayor probabilidad de respuesta en los pacientes con mutaciones de *TET2* vs. pacientes con *TET2* no mutado: 66.7% (6/9 pacientes) vs. 30.4% (p=0.057),

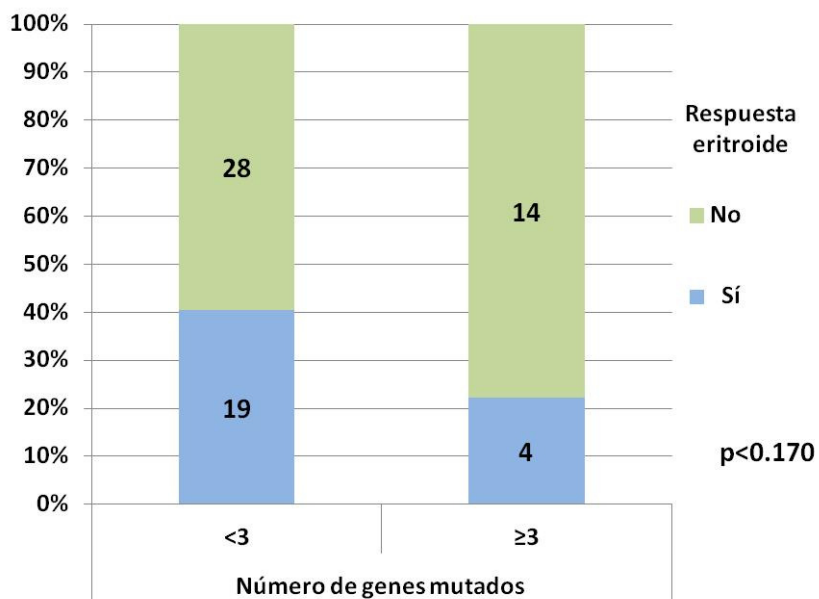
## CAPÍTULO 1

respectivamente. Las variables relacionadas con ausencia de respuesta eritroide en el análisis univariante fueron la dependencia transfusional ( $p < 0.001$ ), la presencia de alteraciones citogenéticas ( $p = 0.034$ ), EPO alta ( $p = 0.025$ ), hemoglobina baja ( $p = 0.032$ ) y un mayor porcentaje de blastos en médula ósea ( $p = 0.015$ ), ninguna de las cuales retuvo la significación estadística en el análisis multivariante. Entre los respondedores, solo 2 variables demostraron tener un impacto desfavorable en la RE en el análisis univariante, aunque no en el multivariante: dependencia transfusional ( $p = 0.043$ ) y número de genes mutados ( $\geq 3$ ) ( $p = 0.047$ ).



**Figura 1.3:** Pacientes con SMD tratados con AEE: mutaciones somáticas y citogenética

## CAPÍTULO 1



**Figura 1.4.** Respuesta eritroide según el número de genes mutados

### *Supervivencia global*

Tras una mediana de seguimiento en los vivos de 9.47 años (p10-p90 2.780-15.416), 50 pacientes (76.9%) habían muerto (14 respondedores y 36 no respondedores), siendo la mediana de SG desde el diagnóstico de 5.8 años (IC 95% 4.131-7.661): 7.9 años (IC 95% 6.981-8.975) en los respondedores y 4.4 años (IC 95% 2.177-6.686) en los no respondedores. (Figure 1.5A) En el análisis multivariante, las variables que se asociaron de forma significativa con una menor SG fueron la edad avanzada (HR 1.102 IC 95% 1.053-1.153,  $p<0.001$ ), el sexo masculino (HR 2.410 IC 95% 1.148-5.096,  $p=0.02$ ),  $\geq 3$  genes mutados (HR 2.804 IC 95% 1.223-6.425,  $p=0.015$ ), la dependencia transfusional (HR 3.490 IC 95% 1.417-8.599,  $p=0.007$ ) y el IPSS intermedio-1 (HR 2.827 IC 95% 1.279-6.251,  $p=0.01$ ). Las variables con intervalos de confianza desproporcionadamente altos en el univariante (diagnóstico WHO 2008, mutaciones de *STAG2* y mutaciones de *GNAS*) fueron excluidas del análisis multivariante. (Tabla 1.6)

## CAPÍTULO 1

	Univariante		Multivariante			
	HR	p valor	HR	p valor	IC 95%	IC 95%
<b>Edad (continua)</b>	<b>1.077</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.102</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.053</b>	<b>1.153</b>
<b>Sexo (hombre vs. mujer [ref])</b>	<b>1.869</b>	<b>0.036</b>	<b>2.419</b>	<b>0.020</b>	<b>1.148</b>	<b>5.096</b>
<b>Dependencia transfusional (sí vs. no [ref])</b>	<b>2.791</b>	<b>0.012</b>	<b>3.490</b>	<b>0.007</b>	<b>1.417</b>	<b>8.599</b>
<b>IPSS (int-1 vs. bajo [ref])</b>	<b>2.297</b>	<b>0.010</b>	<b>2.827</b>	<b>0.010</b>	<b>1.279</b>	<b>6.251</b>
Hemoglobina (continua)	0.786	0.055				
Hemoglobina (<8 vs. ≥8 g/dl [ref])	1.523	0.259				
Leucocitos (continua)	1.023	0.225				
Plaquetas (continua)	0.999	0.273				
<b>Blastos MO (continua)</b>	<b>1.257</b>	<b>0.004</b>	1.028	0.778	0.848	1.247
EPO (continua)	0.999	0.552				
EPO (≥100 vs. <100 U/l [ref])	0.846	0.631				
Ferritina (≥500 vs. <500 ng/ml [ref])	0.917	0.797				
<b>Citogenética (anormal vs. normal [ref])</b>	<b>1.969</b>	<b>0.045</b>	1.371	0.421	0.635	2.956
WHO 2008 (<5% blastos vs. 5q- [ref])	0.552	0.276				
≥5% blastos y LMMC vs. <5% blastos [ref]	5.632	0.012				
<b>Genes mutados (≥3 vs. &lt;3 [ref])</b>	<b>1.247</b>	<b>0.028</b>	<b>2.803</b>	<b>0.015</b>	<b>1.223</b>	<b>6.425</b>
<b>SRSF2 (mutado vs. wild type [ref])</b>	<b>3.914</b>	<b>0.001</b>	2.285	0.157	0.727	7.182
<b>STAG2 (mutado vs. wild type [ref])*</b>	<b>11.665</b>	<b>&lt;0.001</b>				
<b>GNAS (mutado vs. wild type [ref])*</b>	<b>6.550</b>	<b>0.003</b>				

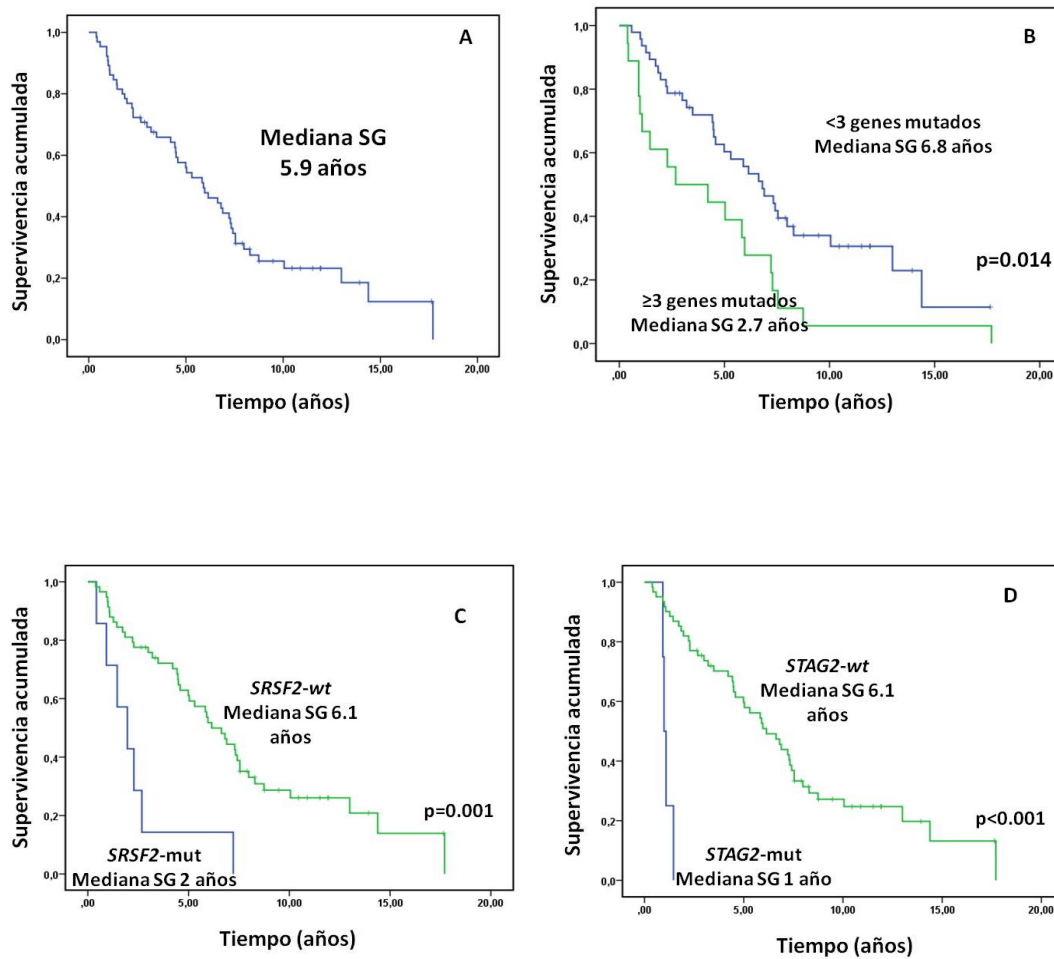
\*STAG2 y GNAS no fueron incluidos en el multivariante por presentar intervalos desproporcionadamente altos.

**Tabla 1.6.** Análisis de la supervivencia global: univariante y multivariante (estudio de mutaciones)

Los pacientes con <3 genes mutados presentaban una mayor SG frente a los que tenían ≥3 genes mutados: SG a 5 años de 60.3% (mediana de 6.805 años IC 95% 4.987-8.624) vs. 44.4% (mediana de 2.677 años IC 95% 0.000-6.675, p=0.014), respectivamente. (Figure 1.5B) Entre los respondedores a los AEE, el número de genes mutados conservó su mal pronóstico: SG a 5 años 83.9% para <3 genes mutados (mediana de 10.05 años IC 95% 7.211-12.893) vs. 75% para ≥3 genes mutados (mediana de 5.833 años IC 95% 2.882-8.781, p=0.012). Además, se observó una tendencia a una mejor SG, aunque no resultó significativa, entre <3 vs. ≥3 genes mutados en el grupo de no respondedores: SG a 5 años de 43.9% (mediana de 4.584

## CAPÍTULO 1

años IC 95% 3.692-5.475) vs. 35.7% (mediana de 1.460 IC 95% 2.177-6.684,  $p=0.175$ ), respectivamente.



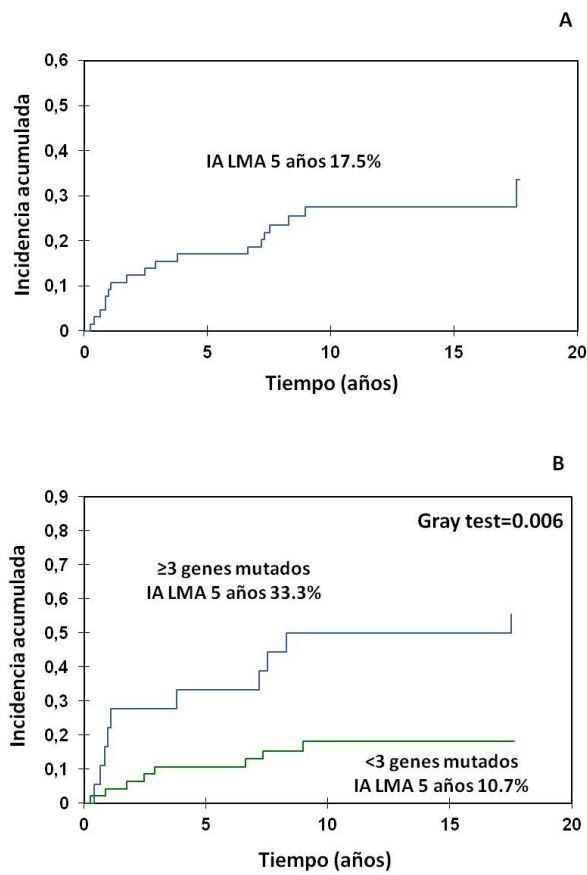
**Figura 1.5.** Supervivencia global: serie global (A), según el número de genes mutados <3 y ≥3 (B), según el estado mutacional de *SRSF2* (C) y según el estado mutacional de *STAG2* (D)

### *Incidencia acumulada de LMA*

18 pacientes (27.7%) presentaron transformación a LMA, 3 respondedores y 15 no respondedores. La IA de LMA, a 17.6 años de seguimiento, fue del 33.6% (IC 95% 21.7-51.9), con un 17% a 5 años (IC 95% 9.9-29.2). En pacientes con <3 genes mutados, la IA de LMA fue del 18.2% (IC 95% 9.7-34.4), con un 10.7% a 5 años (IC 95% 4.7-24.5) frente al 55.6% (IC 95% 37.3-82.7) y el 33.3% a 5 años (IC 95% 17.5-63.4, Gray test  $p=0.006$ ) en pacientes con ≥3 genes mutados. (Figure 1.6) No se observaron diferencias en la IA de LMA de los pacientes con mutaciones de *GNAS* y *SRSF2*. Sin embargo, entre los pacientes con mutaciones de *STAG2* la IA de LMA fue

## CAPÍTULO 1

del 75% (IC 95% 42.6-1.32) a 5 años en los respondedores y del 13.2% en los no respondedores (IC 95% 6.9-25.2, Gray test  $p < 0.001$ ).



**Figura 1.6.** Incidenca acumulada de recaída: serie global (A) y según el número de genes mutados  $< 3$  y  $\geq 3$  (B)



### 3.3. DISCUSIÓN

#### *Estudio SPRESAS*

Presentamos por primera vez los resultados del mayor estudio sobre el uso de AEE en pacientes con SMD de bajo riesgo llevado a cabo a partir del registro del GESMD. La proporción de pacientes que respondieron a AEE fue del 64.8%, superior en general a lo reportado por otros autores, que la sitúan en torno al 40-60%,(54,65–69,76) independientemente del uso de G-CSF adyuvante (118 pacientes en nuestro estudio, 16.3%). La mediana de duración de la RE fue de 1.78 años, similar a lo observado en estudios anteriores (17-24 meses). La única variable asociada de forma significativa con una mejor RE en el análisis multivariante fue la EPO <200 U/l, validando así los resultados de estudios previos, si bien existen diferencias entre éstos en cuanto al punto de corte que determina la mejor o peor respuesta: 500 U/l en el estudio de Hellström-Lindberg, 200 U/l en los de Park y Santini, y 100 U/l en los de Buckstein y Houston). Este mismo punto de corte ha sido seleccionado por la EMA para la aprobación de los AEE en SMD de bajo riesgo, en base a los resultados del ensayo clínico con epoteina- $\alpha$  llevado a cabo por *Fenaux et al.*,(214) habiéndose observado también que los pacientes con EPO <200 U/l responden mejor a luspatercept.(81) También confirmamos que los AEE son seguros (solo 3 pacientes desarrollaron algún efecto adverso grave, ninguno relacionado con el tratamiento), y que no se relacionan con progresión a LMA. Tanto el IPSS como el IPSS-R se han asociado sistemáticamente con la RE,(66,69,73,74) junto a los niveles de EPO y la dependencia transfusional; sin embargo, en nuestro estudio esta variable solo resultó significativa en el análisis univariante.

Observamos una mayor SG entre los respondedores a AEE que entre los no respondedores. Estas diferencias han sido reseñadas también por otros autores, si bien en nuestro estudio la SG resultó superior.(65,67,68,72) Esto podría explicarse por la menor proporción de pacientes con AREB tratados con AEE en nuestro estudio (3.8%) en comparación con otros (19-38%) y porque solo se incluyeron pacientes con IPSS bajo e intermedio-1, mientras que los otros estudios incluyeron también pacientes con IPSS intermedio-2 y alto (11-24%), lo que pudo limitar la supervivencia.

Entre los respondedores a los AEE, la SG fue inferior en los pacientes con respuestas más cortas (<6 meses y <12 meses), frente a aquellos con respuestas más prolongadas (>6 meses y >12 meses), incluso tras la pérdida de la RE, en consonancia con lo reportado por *Kelaidi et al.* (ver introducción).(71)

## CAPÍTULO 1

La transformación a LMA no fue más frecuente entre los pacientes tratados con AEE; sin embargo, observamos que los no respondedores tuvieron una mayor IA de LMA, incluso en comparación con los pacientes manejados con tratamiento de soporte. La menor incidencia de LMA entre los respondedores, más que deberse a un efecto favorecedor directo de los AEE, podría estar relacionada con las características basales de los pacientes, como el perfil mutacional, lo que podría explicar también la refractariedad a los AEE.

### *Estudio de mutaciones*

El porcentaje de pacientes con mutaciones somáticas fue similar al observado por *Kosmider et al.* (87%) en su estudio sobre el impacto de las mutaciones somáticas en pacientes con SMD de bajo riesgo.(156) En nuestro estudio, las mutaciones de *SF3B1*, el gen más frecuentemente mutado en SMD de bajo riesgo, fueron más frecuentes (54.8% vs. 40.5%), mientras que las mutaciones de otros genes se encontraron en una proporción menor. Esto podría ser debido a que nuestro estudio incluyó más pacientes con IPSS bajo que intermedio-1 (69% y 45%, respectivamente, en el estudio de *Kosmider*).

La mayoría de los pacientes tenían 2 o más mutaciones, lo que sugiere que la cooperación entre mutaciones podría ser, al menos parcialmente, necesaria para el desarrollo manifiesto de la enfermedad. Encontramos algunas asociaciones ya observadas por otros autores, como la de *SF3B1* y *DNMT3A*; también encontramos una asociación entre las mutaciones de *TET2* y las de *SF3B1* y otros genes de *splicing*. Las mutaciones en genes de vías de señalización y de factores de transcripción, descritos habitualmente en la literatura como asociados a progresión, fueron infrecuentes en comparación con otras “familias” de genes (16.9% y 26.2%, respectivamente) y en la mayoría de los casos coexistían con mutaciones en otros genes (9/11 pacientes con genes de transcripción mutados y 17/17 pacientes con genes de señalización mutados). En concreto, de los pacientes con mutaciones en genes de las vías de señalización, solo el 17.6% presentaba <3 genes mutados, frente a, por ejemplo, los pacientes con mutaciones en genes de *splicing*, de los que solo el 35.4% presentaba ≥3 genes mutados.

Varios estudios han relacionado la presencia, el tipo y el número de mutaciones somáticas en pacientes con SMD con la respuesta al tratamiento.(81,124,133,147,167,196,198–200) Nuestro trabajo evidencia que la presencia de un alto número de genes mutados (≥3) en pacientes con SMD de bajo

## CAPÍTULO 1

riesgo tiende a asociarse con una menor tasa de RE, aunque dicha asociación no resultó estadísticamente significativa, probablemente debido al tamaño de la muestra. La duración de la RE también parece relacionarse inversamente con el número de genes mutados, aunque, de nuevo, no se alcanzó la significación estadística. Estos hechos sostienen la idea de que una mayor complejidad genética se asocia con refractariedad al tratamiento y podría ser un factor predictivo de respuesta a los AEE, como los niveles de EPO, la dependencia transfusional o el IPSS. En este sentido, se necesitan estudios que incluyan a un mayor número de pacientes para confirmar estos resultados.

Los pacientes con  $\geq 3$  genes mutados presentaban una menor SG, incluso en el grupo de mejor pronóstico, el de los respondedores a AEE (entre no respondedores no se observaron diferencias, probablemente debido al número limitado de casos con  $\geq 3$  genes mutados en este grupo). Así, independientemente de la RE, cuyo impacto en la supervivencia fue confirmado por el estudio SPRESAS, el número de genes mutados retuvo su pronóstico desfavorable. Las mutaciones de 3 genes se asociaron también a una menor SG en el análisis univariante: *STAG2*, *GNAS* y *SRSF2* (Figuras 12C and 12D), todas ellas descritas previamente como asociadas a pronóstico adverso y características de alto riesgo,(139,140,162,215,216) a pesar de lo cual ninguna de ellas retuvo la significación en el multivariante. Además, no encontramos diferencias significativas en la SG respecto al estado mutacional de *SF3B1*, el único gen cuyas mutaciones han sido consideradas de forma unánime como de buen pronóstico en pacientes con SMD.

Los pacientes con  $\geq 3$  genes mutados presentaban también una mayor incidencia de transformación a LMA, al igual que los pacientes con mutaciones en el gen *STAG2*. Solo 4 pacientes presentaban mutaciones en dicho gen, pero todos ellos tenían mutaciones en al menos otros 3 genes; en todos los casos las mutaciones de *STAG2* eran subclonales. Estos hallazgos sostienen la idea de que la transformación a LMA está comúnmente causada por mutaciones secundarias o cooperativas, que emergen durante la evolución de la enfermedad sobre un clon previo no necesariamente “leucemógeno”, y confirman los resultados de un artículo publicado recientemente en este sentido sobre el papel de las mutaciones de la vía *RAS* y del complejo de las cohesinas en la evolución a LMA en pacientes con SMD de bajo riesgo.(216)

En resumen, los AEE en pacientes con SMD de bajo riesgo constituyen el tratamiento actual más eficiente y seguro en primera línea para el tratamiento de la anemia sintomática, mejorando no solo la cifra de hemoglobina, y con ello la calidad de vida,

## CAPÍTULO 1

sino probablemente también el pronóstico en los pacientes respondedores. Incluso en SMD de bajo riesgo, las mutaciones somáticas de alto riesgo o un número elevado de genes mutados ( $\geq 3$ ) tienen un impacto desfavorable en la supervivencia y la transformación a LMA. También hemos observado una tendencia a una menor probabilidad de RE en estos pacientes, que futuros estudios deberán confirmar. La ausencia de respuesta a los AEE, en probable relación con un perfil mutacional desfavorable, debería alertarnos sobre el aumento del riesgo de progresión a LMA en estos pacientes.

## **CAPÍTULO 2**

**Impacto de las mutaciones somáticas en  
pacientes con síndromes mielodisplásicos  
sometidos a trasplante alogénico de  
progenitores hematopoyéticos y papel de la  
enfermedad injerto contra receptor**



El presente trabajo ha sido publicado en forma de artículo en la revista *Annals of Hematology* con el título: *Chronic graft-versus-host disease could ameliorate the impact of adverse somatic mutations in patients with myelodysplastic syndromes and hematopoietic stem cell transplantation.*

Ann Hematol. 2019 Sep;98(9):2151-2162. doi: 10.1007/s00277-019-03751-6. Epub 2019 Jul 16.





## CAPÍTULO 2

### 4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### *Pacientes y muestras*

Analizamos retrospectivamente los resultados del TPH de 115 pacientes con SMD, incluyendo 6 pacientes con LMMC, procedentes de 5 centros españoles (Hospital Universitario de Salamanca, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Hospital Universitario Morales Meseguer de Murcia, Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona), trasplantados entre los años 1998 y 2015. Se seleccionaron muestras de médula ósea obtenidas antes del TPH con una mediana de 27 días y un rango de 1 a 1075 días; en 7 casos se empleó sangre periférica al no disponer de muestra de médula ósea.

#### *Estudio molecular*

Se extrajo ADN genómico de células mononucleadas de médula ósea, que se secuenció mediante NGS por amplicones empleando un panel de 54 genes *TruSight Myeloid Sequencing* con una plataforma *NextSeq* (Illumina©) en 99 pacientes, y un panel *AmpliSeq* de 39 genes con una plataforma *Ion Torrent* (Thermo Fisher Scientific©) en 16 pacientes, que incluían la mayoría de los genes mutados en neoplasias mieloides (Tabla 2.1). La secuenciación se llevó a cabo en los laboratorios del Hospital Universitario de Salamanca/Centro de Investigación del Cáncer y el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

<b>Panel <i>TruSight Myeloid Sequencing</i> (Illumina): 54 genes</b>
<b><i>ABL1, ASXL1, ATRX, BCOR, BCORL1, BRAF, CALR, CBL, CBLB, CBLC, CDKN2A, CEBPA, CSF3R, CUX1, DNMT3A, ETV6, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, JAK2, JAK3, KDM6A, KIT, KRAS, MLL, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PHF6, PTEN, PTPN11, RAD21, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZRSR2</i></b>
<b>Panel <i>AmpliSeq</i> (Thermo Fisher Scientific): 39 genes</b>
<b><i>ASXL1, BCOR, BRAF, CBL, CDKN2A, CEBPA, DNMT3A, ETV6, EZH2, FLT3, GNAS, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, LUC7L2, MPL, NPM1, NF1, NRAS, PHF6, PTPN11, RAD21, RPS14, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SF1, SF3A1, SMC3, SPARC, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZRSR2</i></b>

Los genes comunes a ambos paneles están resaltados en negrita.

**Tabla 2.1:** Paneles de genes empleados en el estudio

## CAPÍTULO 2

La preparación de bibliotecas para cada muestra fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante. El alineamiento con el genoma de referencia (hg19) y la detección de variables se realizaron con los programas *Variant Studio Data Analysis* e *Ion Reporter*, respectivamente. Sólo se consideraron aquellas variantes localizadas en regiones de splicing o exónicas que ocasionan cambios en la secuencia de aminoácidos. Los polimorfismos fueron excluidos. Se excluyeron del panel las regiones diana con una cobertura mínima mediana de 100 lecturas en al menos el 20% de los pacientes. La cobertura media por paciente fue de 10662 lecturas, con un rango de 19522 a 5109, y el límite inferior para la frecuencia alélica se fijó en el 3%.

### *Análisis de resultados*

La SG se calculó desde la fecha del TPH (fecha de infusión de los progenitores hematopoyéticos) hasta la fecha de la muerte por cualquier causa o del último seguimiento en los pacientes vivos. La recaída se definió como persistencia o recurrencia morfológica de SMD ( $\geq 5\%$  de blastos medulares, displasia significativa) o presencia de Enfermedad Mínima Residual (EMR) por citometría de flujo tras el TPH. La Supervivencia Libre de Recaída (SLR) se calculó desde la fecha del trasplante hasta la fecha de recaída, muerte o último seguimiento en los vivos. La EICRc fue evaluada solo en los pacientes vivos en el día +100 del TPH.

Las curvas de SG y SLR se crearon con el método de Kaplan-Meier y las comparaciones se hicieron con el test log-rank. Se empleó el modelo de Cox para ajustar por características clínicas o del trasplante. En la regresión de Cox se introdujo la variable EICRc como variable dependiente de tiempo para estimar el efecto de dicha variable en la supervivencia. Los modelos multivariantes se construyeron a partir de las variables con significación estadísticas del 95% ( $p < 0.05$ ) en el análisis univariante y de otras variables relevantes, como la edad y el sexo. La Incidencia Acumulada de Recaída (IAR) con o sin muerte se calculó usando riesgos competitivos y las comparaciones se llevaron a cabo con el test de Gray. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS 23.0, excepto la IAR, que fue calculada con Xlstat versión 2014.5.03.

## CAPÍTULO 2

### 4.2. RESULTADOS

La mediana de edad de los pacientes fue de 53 años (p25–p75 44.13-61.07). Las características relacionadas con la enfermedad y el trasplante se resumen en la Tabla 2.2.

	<b>≤2 genes mutados n = 86 (74.78%)</b>	<b>&gt;2 genes mutados n = 29 (25.22%)</b>	<b>p valor</b>
<b>Edad (continua)</b>	51.64 años	56.57 años	0.115
<b>Sexo</b>	86	29	0.198
Hombre	47 (54.70)	20 (69.00)	
Mujer	39 (35.30)	9 (31.00)	
<b>Clasificación WHO 2008</b>	84	29	0.338
CRDU	3 (3.60)	1 (3.40)	
ARSA	2 (2.40)	0 (0.00)	
CRDM	12 (14.30)	10 (34.50)	
AREB-1	22 (26.20)	6 (20.70)	
AREB-2	26 (31.00)	6 (20.70)	
SMD inclasificable	9 (10.70)	3 (10.30)	
LMMC	6 (7.10)	3 (10.30)	
LMA (AREB-T)	4 (4.80)	0 (0.00)	
No disponible	2	0	
<b>Cariotipo complejo</b>	77	24	0.669
Sí	5 (6.50)	2 (8.30)	
No	72 (93.50)	22 (91.70)	
No disponible	9	5	
<b>SMD primario vs. secundario</b>	86	29	0.428
Primario	66 (76.70)	25 (86.20)	
Secundario	20 (23.30)	4 (13.80)	
<b>Riesgo citogenético (IPSS-R)</b>	77	24	0.54
Muy bueno	1 (1.30)	0 (0.00)	
Bueno	37 (48.10)	16 (66.70)	
Intermedio	20 (26.00)	5 (20.80)	
Pobre	15 (19.50)	2 (8.30)	
Muy pobre	4 (5.20)	1 (4.20)	
No disponible	9	5	
<b>IPSS</b>	71	23	0.323
Bajo	6 (8.50)	3 (13.00)	
Intermedio 1	20 (28.20)	10 (43.50)	
Intermedio 2	33 (46.50)	5 (21.70)	

## CAPÍTULO 2

Alto	6 (8.50)	2 (8.70)	
LMMC*	6 (8.50)	3 (13.00)	
No disponible	15	6	
<b>IPSS revisado (IPSS-R)</b>	<b>66</b>	<b>19</b>	<b>0.180</b>
Muy bajo-Bajo-Intermedio	27 (40.90)	11 (57.9)	
Alto-Muy alto	33 (50.00)	5 (26.30)	
LMMC*	6 (9.10)	3 (15.80)	
No disponible	20	10	
<b>Tratamiento</b>	<b>86</b>	<b>29</b>	<b>0.151</b>
Azacitidina	32 (37.20)	16 (55.20)	
Quimioterapia	31 (36.00)	5 (17.20)	
Otros	3 (3.50)	0 (0.00)	
Sin tratamiento	20 (23.30)	8 (27.60)	
<b>Estado previo al trasplante</b>	<b>84</b>	<b>29</b>	<b>0.352</b>
Sin tratamiento	17 (20.20)	7 (24.10)	
Respuesta completa	29 (34.50)	6 (20.70)	
Respuesta parcial	14 (16.70)	5 (17.20)	
Enfermedad estable	13 (15.50)	7 (24.10)	
Progresión	10 (11.90)	2 (6.90)	
Aplasiado sin blastos	1 (1.20)	2 (6.90)	
No disponible	2	0	
<b>Fuente de progenitores</b>	<b>86</b>	<b>29</b>	<b>0.161</b>
Médula ósea	4 (4.70)	0 (0.00)	
Sangre periférica	71 (82.60)	28 (96.60)	
Cordón umbilical	11 (12.80)	1 (3.40)	
<b>Tipo de donante</b>	<b>86</b>	<b>29</b>	<b>0.164</b>
Emparentado	39 (45.30)	17 (58.60)	
No emparentado	34 (39.50)	8 (27.60)	
Cordón umbilical	10 (11.60)	1 (3.40)	
Haploidéntico	3 (3.50)	3 (10.30)	
<b>Tipaje HLA</b>	<b>86</b>	<b>29</b>	<b>0.346</b>
Idéntico	59 (68.60)	23 (79.30)	
No idéntico	27 (31.40)	6 (20.70)	
<b>Régimen de acondicionamiento</b>	<b>86</b>	<b>29</b>	<b>0.574</b>
Mieloablatoivo	33 (38.40)	11 (37.90)	
Intensidad reducida	53 (61.60)	18 (62.10)	
<b>EICR aguda</b>	<b>86</b>	<b>29</b>	<b>0.378</b>
Sí	54 (62.80)	21 (72.40)	
No	32 (37.20)	8 (27.60)	

## CAPÍTULO 2

<b>EICR crónica<sup>1</sup></b>	<b>83</b>	<b>29</b>	<b>0.074</b>
Sí	44 (53.01)	10 (34.50)	
No	26 (31.33)	16 (55.20)	
No evaluable (muerte <+100)	13 (15.66)	3 (10.30)	
No disponible	2	0	

\*El IPSS y el IPSS-R no se aplicaron a los pacientes con LMMC.

<sup>1</sup>Se consideró indistintamente EICRc limitada y extensa.

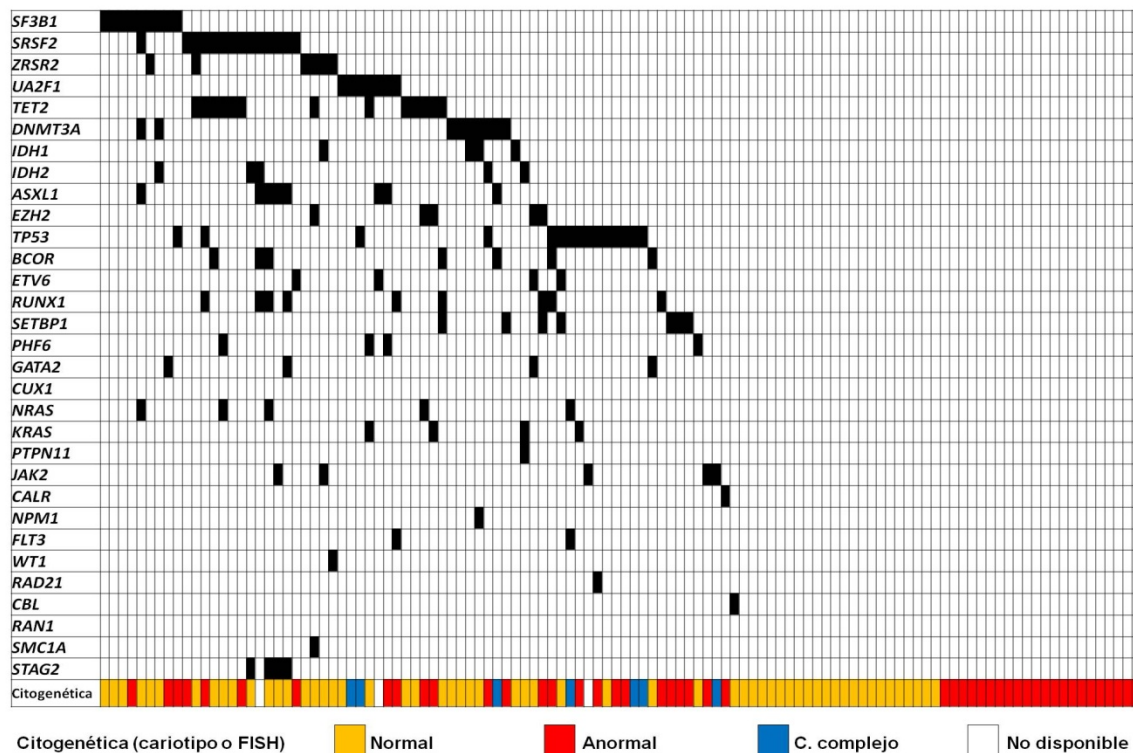
**Tabla 2.2:** Características clínicas de los pacientes y datos del trasplante

### *Perfil mutacional*

De 115 pacientes, 44 (38.3%) no tenían ninguna mutación somática. En los restantes 71 pacientes, observamos 1 gen mutado en 27 pacientes (23.5%), 2 genes mutados en 15 pacientes (13%), 3 genes mutados en 19 pacientes (16.5%), 4 genes mutados en 6 pacientes (5.2%), 5 genes mutados en 3 pacientes (2.6%) y 6 genes mutados en solo 1 paciente (0.9%). Los genes más frecuentemente mutados fueron *TP53* (15, 13%), *SRSF2* (14, 12.2%), *TET2* (13, 11.3%), *DNMT3A* (9, 7.8%), *RUNX1* (9, 7.8%), *SF3B1* (9, 7.8%) y *ASXL1* (8, 7%). La mediana de genes mutados por paciente fue de 1 (media de 1.38), con una VAF media del 35%. En la Figura 2.1 se representan los genes mutados y el perfil citogenético de cada paciente.

Encontramos una asociación significativa entre las mutaciones de *TET2* y el IPSS, siendo éstas más frecuentes en pacientes con IPSS bajo e intermedio-1 (18.4% vs. 0% en pacientes con IPSS intermedio-2 y alto,  $p=0.004$ ), y entre mutaciones de *SRSF2* y AREB (15.6% en AREB vs. 2.5% en pacientes con otros diagnósticos,  $p=0.048$ ). La LMMC se asoció a mutaciones de *TET2* (44.4% de pacientes con LMMC,  $p=0.005$ ), *SRSF2* (33.3%,  $p=0.02$ ), *KRAS* (22.2%,  $p=0.007$ ) y *EZH2* (22.2%,  $p=0.026$ ). También se observó una mayor proporción de pacientes con mutaciones de *TP53* entre los que tenían un cariotipo complejo (57.1%) en contraste con aquellos con cariotipo no complejo (de los que solo el 8.5% tenía mutaciones de *TP53*,  $p=0.003$ ).

## CAPÍTULO 2



**Figura 2.1:** Pacientes con SMD sometidos a trasplante alogénico: mutaciones somáticas y citogenética.

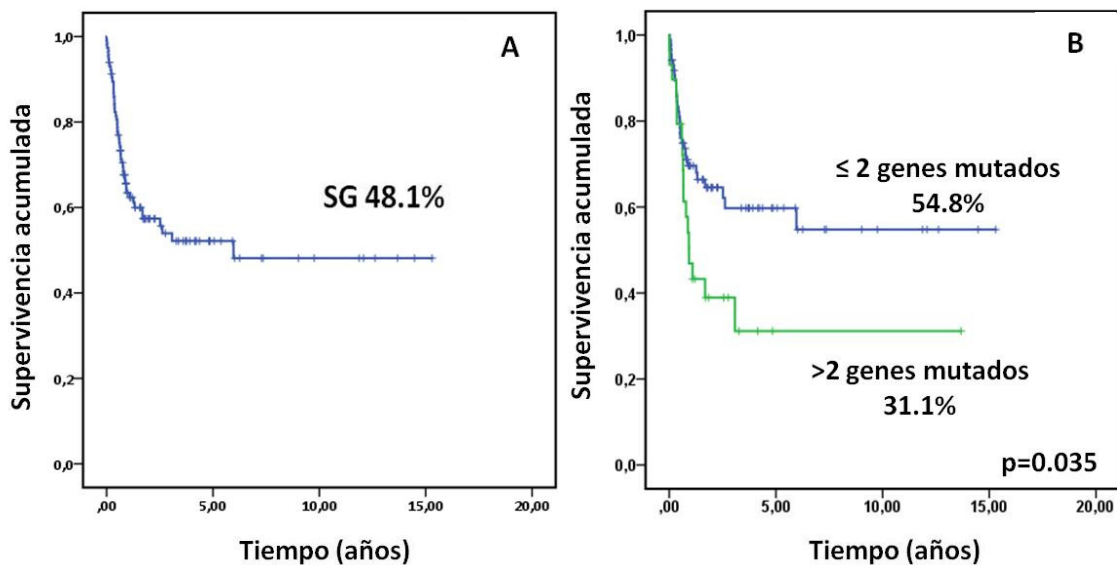
### *Supervivencia global y supervivencia libre de recaída*

A fecha de último seguimiento, el 48% de los pacientes estaban vivos. 19 pacientes recayeron (16.5%). Tras una mediana de seguimiento de 2.02 años en los vivos, la SG fue del 48.1% (63.4% al año, mediana de 5.96 años) (Figura 2.2A) y la SLR fue del 46.2% (59.7% al año, mediana de 5.92 años).

El análisis univariante para la SG incluyó las siguientes variables: todos los genes mutados, el número de mutaciones ( $\leq 2$  genes mutados vs.  $> 2$ ), la edad, el sexo, el diagnóstico WHO 2008, el IPSS, el IPSS-R, la categoría de riesgo citogenético, el cariotipo complejo, el tratamiento modificador, la respuesta terapéutica, el estado de la enfermedad al trasplante, el régimen de acondicionamiento, la fuente de progenitores hematopoyéticos, el tipo de donante, la compatibilidad HLA, la EICR aguda y la EICRc como variable tiempo-dependiente (solo en los pacientes vivos tras el día +100 del trasplante).

## CAPÍTULO 2

Observamos que los pacientes con  $\leq 2$  genes mutados (86/115, 74.5%) tenían mejor pronóstico que aquellos con  $>2$  genes mutados (29/115, 25.2%): SG a 2 años 64.5% (IC 95% 53.72-75.28, mediana no alcanzada) vs. 38.9% (IC 95% 20.48-57.32, mediana de 0.926 años, HR 1.875,  $p=0.035$ ), respectivamente (Figura 2.2B). La ausencia de EICRc (HR 0.101,  $p<0.001$ ), el cariotipo complejo (HR 2.914,  $p=0.028$ ) y las mutaciones de *TET2* (HR 2.824,  $p=0.005$ ) se asociaron también a una peor SG. En el análisis multivariante de la SG solo la EICRc (HR 0.046 IC 95% 0.016-0.138,  $p<0.001$ ) y las mutaciones de *TET2* (HR 2.562 IC 95% 1.018-6.447,  $p=0.046$ ) retuvieron la significación estadística (Tabla 2.3).



**Figura 2.2:** Supervivencia global (A) y supervivencia global según el número de genes mutados, agrupados en pacientes con  $\leq 2$  y  $>2$  genes mutados (B)

Los pacientes con  $\leq 2$  genes mutados tuvieron una SLR a 2 años del 60.5% (IC 95% 49.32-71.67, mediana no alcanzada) frente al 35.8% de los pacientes con  $>2$  genes mutados (IC 95% 17.77-53.83, mediana de 0.921 años, HR 2.04,  $p=0.014$ ).

### *Incidencia acumulada de recaída*

La IAR fue del 15% a 2 años (95% IC 9.5-23.6) (Figura 2.3A). Entre los pacientes con  $\leq 2$  genes mutados la IAR fue inferior (13.6% a 2 años, 95% IC 7.6-24.6) a la de aquellos con aquellos con  $>2$  (25.3% a 2 años, 95% IC 13.6-47.1,  $p=0.007$ ) (Figura 2.3B). Entre los genes mutados solo *TP53* se relacionó estadísticamente con una mayor IAR ( $p=0.006$ ). (Figura 2.3C)

## CAPÍTULO 2

	Univariante		Multivariante			
	HR	p valor	HR	p valor	IC 95%	IC 95%
Edad (continua)	1.023	0.094	1.004	0.808	0.975	1.033
Sexo (hombre vs.mujer [ref])	1.625	0.112	1.196	0.608	0.603	2.375
OMS 2008 (AREB vs. no AREB [ref])	0.953	0.880				
LMMC vs. no AREB [ref]	2.195	0.100				
IPSS (int-2/alto vs. bajo/int-1 [ref])	1.108	0.781				
IPSS-R (alto/muy alto vs. muy bajo/bajo/intermedio [ref])	0.917	0.833				
<b>Cariotipo (complejo vs. no complejo [ref])</b>	<b>2.914</b>	<b>0.028</b>	1.000	0.989	0.364	2.742
SMD secundario vs. primario [ref]	2.123	0.085				
Tratamiento (sí vs. no [ref])	1.166	0.647				
Respuesta (cualquier respuesta vs. no tratamiento [ref])	1.651	0.213				
No respuesta/progresión vs. no tratamiento [ref]	1.182	0.664				
Estado previo al TPH (cualquier respuesta vs. enfermedad activa sin tratamiento [ref])	0.968	0.934				
No respuesta/progresión vs. enfermedad activa sin tratamiento [ref]	1.312	0.502				
Fuente de progenitores (SP vs. MO [ref])	0.683	0.603				
Cordón umbilical vs. médula ósea [ref]	2.331	0.280				
Donante (emparentado vs. haploidéntico [ref])	1.488	0.698				
No emparentado vs. haploidéntico [ref]	1.789	0.572				
Cordón umbilical vs. haploidéntico [ref]	5.084	0.123				
HLA (no idéntico vs. idéntico [ref])	1.219	0.532				
Régimen de acondicionamiento (intensidad reducida vs. mieloablativo [ref])	1.234	0.486				
EICR aguda (sí vs. no [ref])	1.048	0.877				
<b>EICRc (sí vs. no [ref])</b>	<b>0.275</b>	<b>0.000</b>				
<b>EICRc tiempo-dependiente (sí vs. no [ref])</b>	<b>0.101</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.046</b>	<b>0.016</b>	<b>0.138</b>
<b>Genes mutados (&gt;2 vs. ≤2 [ref])</b>	<b>1.875</b>	<b>0.035</b>	1.436	0.381	0.645	3.196
<i>TP53</i> (mutado vs. <i>wild-type</i> [ref])	1.49	0.305				
<b><i>TET2</i> (mutado vs. <i>wild-type</i> [ref])</b>	<b>2.824</b>	<b>0.005</b>	<b>2.562</b>	<b>0.046</b>	<b>1.018</b>	<b>6.447</b>

**Tabla 2.3:** Supervivencia global: análisis univariante y multivariante



## CAPÍTULO 2

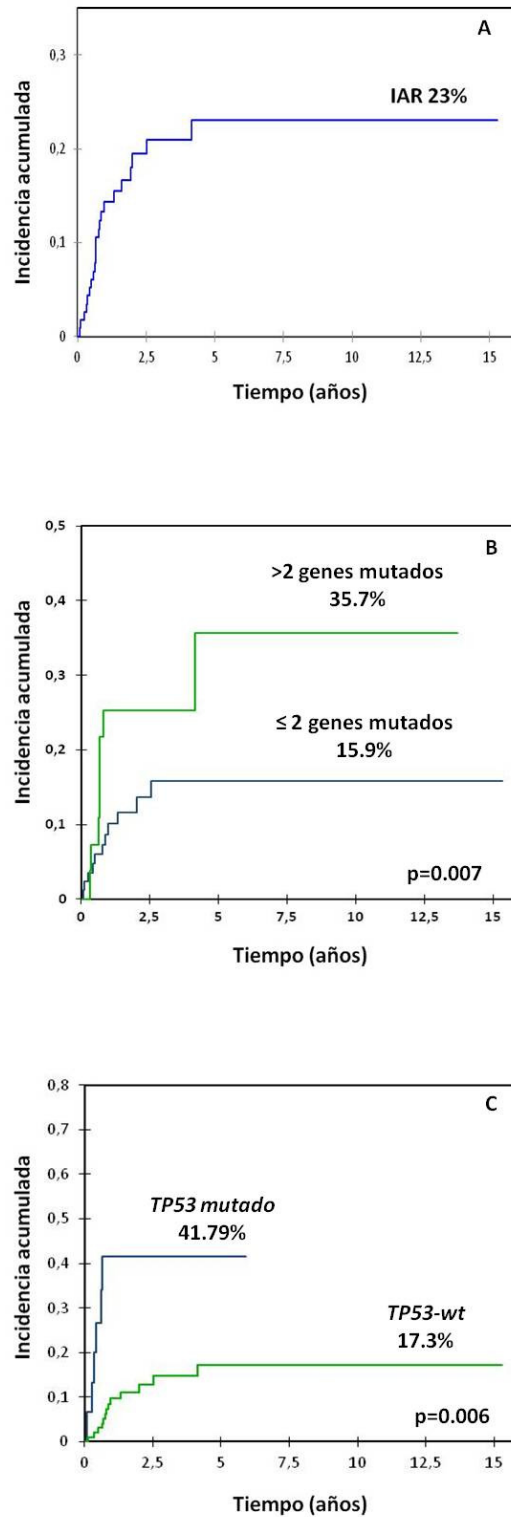
### *Mutaciones de TP53*

Los pacientes con mutaciones de *TP53* presentaban una SG a 2 años del 45% (mediana de 0.6 años) frente a un 59% (mediana de 5.9 años) en los pacientes no mutados (HR 1.49 IC 95% 0.695-3.191,  $p=0.3$ ). La SLR a 2 años fue del 46.7% en los pacientes con mutaciones de *TP53* (mediana de 0.5 años), mientras que en los no mutados fue del 54.6% (mediana de 5.9 años) (HR 1.389 IC 95% 0.652-2.961,  $p=0.4$ ). Además, la presencia de mutaciones de *TP53* se correlacionó significativamente con una mayor IAR: IAR a 2 años del 41.7% (95% IC 22.5-77.1) vs. 12.9% a 2 años en los pacientes no mutados (95% IC 7.4-22.6,  $p=0.006$ ) (Figura 2.3C).

Observamos que la VAF de las mutaciones de *TP53* parecía asociarse con un peor pronóstico. Considerando la VAF como variable continua, observamos que se asociaba significativamente a una peor SG (HR 1.039,  $p=0.033$ ) y SLR (HR 1.036,  $p=0.044$ ). Los pacientes con una VAF  $<10\%$  tuvieron una peor SG: 58.3% al año con VAF  $<10\%$  vs. 28.6% con  $\geq 10\%$  ( $p=0.068$ ), aunque el limitado número de individuos con mutaciones de *TP53* fue, probablemente, la causa de que no se encontraran diferencias significativas. De 6 pacientes con VAF  $<10\%$ , 3 desarrollaron EICRc y seguían vivos, mientras que los que no desarrollaron EICRc murieron; de 9 pacientes con VAF  $>10\%$ , 3 desarrollaron EICRc, de los que 2 continuaban vivos, mientras que los 6 restantes no desarrollaron EICRc y solo 2 de ellos sobrevivieron.

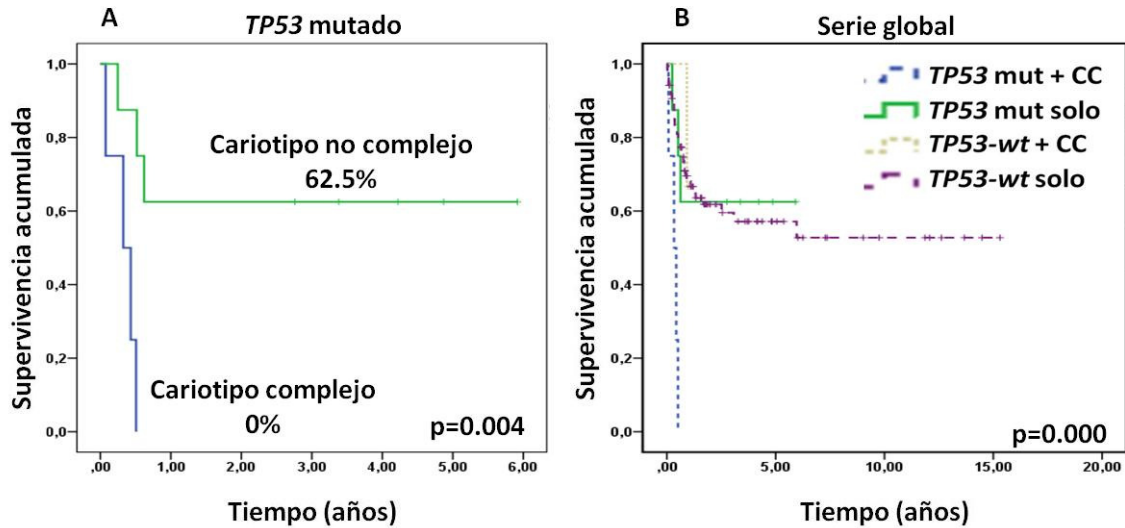
De 15 pacientes con mutaciones de *TP53* y 7 con cariotipo complejo, 4 presentaban ambas alteraciones simultáneamente. Cuando comparamos la SG en pacientes con cariotipo complejo en función de la presencia de mutaciones de *TP53*, observamos que la presencia de ambas alteraciones se asocia de forma significativa con un pronóstico ominoso: SG al año del 0% ( $p<0.001$ ). Por el contrario la SG fue del 62.5% entre los pacientes sin cariotipo complejo y *TP53* mutado, 66.7% entre los pacientes con cariotipo complejo y *TP53 wild-type* y 68.1% entre los pacientes sin cariotipo complejo y *TP53 wild-type* (Figura 2.4). Así pues, el impacto sobre la SG de las mutaciones de *TP53* parece explicarse en el contexto de su estrecha relación con el cariotipo complejo.

## CAPÍTULO 2



**Figura 2.3:** Incidenca Acumulada de Recaida global (A), segun el numero de genes mutados agrupados en pacientes con 2 y >2 genes mutados (B) y segun el estado mutacional de *TP53* (C)

## CAPÍTULO 2



**Figura 2.4.** *TP53* y cariotipo complejo. Supervivencia global en pacientes con mutaciones de *TP53* según el cariotipo (A) y en la muestra global según el estado mutacional de *TP53* y la presencia o ausencia de cariotipo complejo (B)

### *Enfermedad injerto contra receptor crónica*

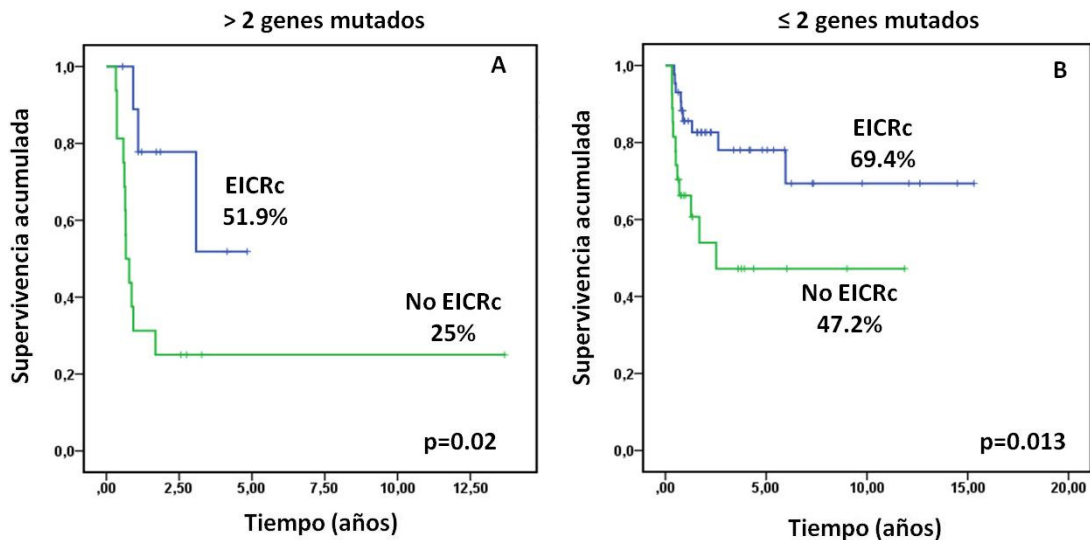
La EICRc fue la variable que más claramente influyó en el pronóstico: la mediana de la SG en los pacientes que desarrollaron EICRc no se alcanzó, mientras que fue de 1.268 años en aquellos que no desarrollaron EICRc ( $p < 0.001$ ).

Entre los pacientes con  $>2$  genes mutados, la SG fue del 77.8% a 2 años entre los que desarrollaron EICRc, frente al 25% entre los que no lo desarrollaron ( $p = 0.02$ ) (Figura 2.5A). De forma parecida, en el grupo de pacientes con  $\leq 2$  genes mutados, la SG fue del 82.6% a 2 años entre los que desarrollaron EICRc, y del 54% entre los que no lo desarrollaron ( $p = 0.013$ ) (Figura 2.5B).

La IAR a 2 años fue del 43.8% en pacientes con  $>2$  genes mutados sin EICRc vs. 0% en pacientes con EICRc ( $p = 0.064$ ). Entre aquellos con  $\leq 2$  genes mutados, la IAR a 2 años fue del 6.7% cuando desarrollaron EICRc y del 10.3% cuando no lo desarrollaron ( $p = 0.9$ ).

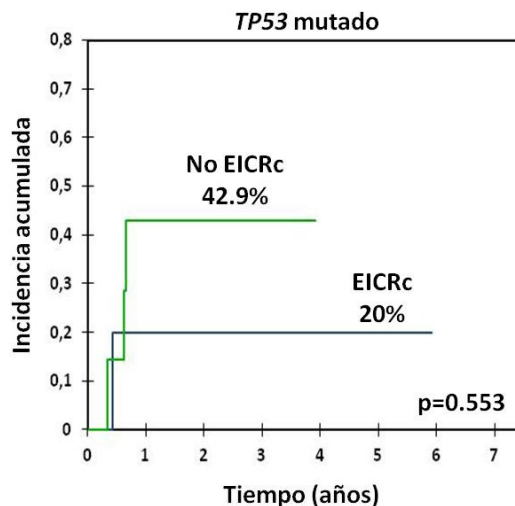
En cuanto a los 15 pacientes con mutaciones de *TP53*, 6 de ellos desarrollaron EICRc y 2 no se consideraron evaluables porque murieron antes del día +100 del TPH (Tabla 2.3).

## CAPÍTULO 2



**Figura 2.5** La EICRc mejora el pronóstico en pacientes con >2 genes mutados (A) y ≤ 2 genes mutados (B)

La EICRc mejoró el pronóstico de los pacientes con mutaciones de *TP53*, asociándose a una mejor SG, aunque no significativa (80% a 1 año vs. 28.6%;  $p=0.175$ ). Similares resultados se obtuvieron para la IAR, que fue inferior en pacientes con EICRc (20% vs. 42.9%,  $p=0.6$ ) (Figura 2.6). Los pacientes con mutaciones de *TP53* que desarrollaron EICRc tuvieron una IAR similar a los no mutados (17.3%).



**Figura 2.6:** La EICRc mejora el pronóstico en pacientes con mutaciones de *TP53*

CAPÍTULO 2

	WHO 2008	IPSS-R	TP53 VAF	Cariotipo	Tratamiento	5q-	Estado previo a TPH	Recaida	EICRc	Último seguimiento
1	AREB-1	Muy Alto	66	Complejo	Azacitidina	No	Enfermedad estable	Sí (+24)	No evaluable	Muerto (+28)
2	AREB-1	Muy Alto	35,7	Complejo	Sin tratamiento	No	Progresión	No	No	Muerto (+186)
3	CRDM	Desconocido	79,7	Complejo	Quimioterapia	Sí	RP	Sí (+91)	No	Muerto (+119)
4	AREB-1	Muy Alto	51	Complejo	Sin tratamiento	Sí	Enfermedad activa (sin tratamiento)	Sí (+104)	Sí (+104)	Muerto (+157)
5	AREB-1	Alto	35	Ano mal	Sin tratamiento	Sí	Enfermedad activa (sin tratamiento)	Sí (+59)	No evaluable	Muerto (+90)
6	AREB-2	Muy Alto	48,1	Ano mal	Azacitidina	No	RC	No	No	Vivo (+1007)
7	CRDM	Muy Bajo	7,8	Ano mal	Azacitidina	Sí	Progresión	No	No	Muerto (+189)
8	CRDM	Intermedio	2	Ano mal	Quimioterapia	No	Enfermedad estable	Sí (+99)	No	Muerto (+227)
9	LMMC	No aplicable	13,3	Ano mal	Azacitidina	No	RC	No	Sí (+225)	Vivo (+1541)
10	SMD-inc	Bajo	38,5	Ano mal	Sin tratamiento	No	Enfermedad activa (sin tratamiento)	No	Sí (+393)	Vivo (+1234)
11	AREB-1	Desconocido	20	Desconocido	Quimioterapia	No	RP	No	No	Vivo (+1427)
12	AREB-2	Desconocido	-	Desconocido	Azacitidina	No	RP	Sí (+112)	No	Muerto (+242)
13	SMD-inc	Desconocido	3	Desconocido	Sin tratamiento	No	RC	No	Sí (+147)	Vivo (+203)
14	SMD-inc	Alto	5	Normal	Otros	No	Progresión	No	Sí (+370)	Vivo (+2159)
15	AREB-1	Alto	4	Normal	Azacitidina	No	RP	No	Sí (+103)	Vivo (+1777)

Tabla 2.4: Pacientes con mutaciones de TP53

## CAPÍTULO 2

### 4.3. DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la EICRc en pacientes con SMD mejora la SG y la IAR, especialmente en aquellos que presentan un perfil mutacional de alto riesgo (mutaciones de *TP53*, >2 genes mutados). Además, en consonancia con lo que estudios anteriores han venido señalando, confirmamos el impacto del estado mutacional en la evolución de los pacientes trasplantados.

El 38.4% de nuestros pacientes no presentaba ninguna mutación previa al trasplante, lo que contrasta con otros estudios que evalúan el impacto de las mutaciones somáticas en pacientes con SMD trasplantados, en los que este porcentaje es claramente inferior: 8% en *Bejar et al.*, 21% en *Della Porta et al.* y 21% en *Lindsley et al.* (151,174,206) Además, mientras que algunos genes, como *TET2*, se encontraban mutados en una proporción similar a la reportada por estos autores (11% de pacientes con mutaciones de *TET2* en nuestra serie y 13%, 10% y 15% en las series de Bejar, Della Porta y Lindsley, respectivamente), la proporción de pacientes con mutación de genes normalmente asociados a pronóstico adverso como *TP53*, *ASXL1* o *RUNX1* fue, por el contrario, considerablemente inferior. Así, encontramos un 13% de pacientes con mutaciones de *TP53*, que coincide con lo observado por Della Porta, mientras que Bejar y Lindsey dan cifras del 21% y el 19%, respectivamente. Estas diferencias podrían explicarse debido a los distintos tipos de SMD incluidos en cada estudio (el estudio de Della Porta, por ejemplo, incluyó pacientes con LMA-s) y al tratamiento de inducción: agentes hipometilantes, quimioterapia intensiva o nada. Aunque el 60% de los pacientes de nuestra serie eran de alto riesgo al diagnóstico, tres de cada cuatro recibieron quimioterapia intensiva o agentes hipometilantes, lo que sin duda pudo haber disminuido la carga mutacional previa al trasplante, e incluso haber inducido respuestas moleculares completas, de ahí que el número de pacientes que no presentaba ninguna mutación en el momento del trasplante parezca inusualmente alto en comparación con lo que cabría esperar en pacientes con SMD de alto riesgo. El 36% de nuestros pacientes recibieron quimioterapia intensiva (proporción similar a la de los que fueron tratados con azacitidina), pero solo el 17.2% de los pacientes con  $\geq 2$  genes mutados pre trasplante la habían recibido, lo que sugiere que la quimioterapia podría ser eficaz para reducir la carga alélica previa al trasplante. No encontramos diferencias en la SG en cuanto al manejo terapéutico, por lo que lo verdaderamente importante no sería tanto el tipo de tratamiento, como la existencia o no de mutaciones detectables en el momento del TPH.

## CAPÍTULO 2

La presencia de cariotipo complejo, la ausencia de EICRc y el perfil mutacional adverso se asociaron a una menor supervivencia en el análisis univariante. En concreto, la presencia de >2 genes mutados y las mutaciones en *TET2* y *TP53* demostraron un pronóstico desfavorable, en consonancia con lo observado hasta ahora.(151,152,174,204–208) La asociación de mutaciones de *TP53* y cariotipo complejo se relacionó con mortalidad precoz post TPH: todos los pacientes con esta doble alteración fallecieron en el transcurso del primer año tras el trasplante, mientras que aquellos con una única alteración tuvieron una SG comparable a la de los pacientes que no tenían ninguna de ellas. Estos resultados confirman los hallazgos reportados por otros autores(151,169,204,217) y reflejan la necesidad de nuevas estrategias para este subgrupo de pacientes, con el fin de mejorar los resultados del TPH. *TET2* fue el único gen mutado que retuvo su pronóstico adverso en el análisis multivariante de la SG. A pesar de que en los SMD en general no parecen asociarse a pronóstico adverso, varios estudios apuntan a las mutaciones de *TET2* como factor de mal pronóstico en pacientes trasplantados.(151–153) Esto podría ser debido a la frecuente asociación de las mutaciones de *TET2* con mutaciones de otros genes, especialmente en pacientes de alto riesgo, que son la mayoría de los que se someten a trasplante. Algunas mutaciones consideradas por otros autores como de mal pronóstico, como las de *ASXL1*, *RUNX* y *DNMT3A*, no alcanzaron la significación estadística en el presente estudio, tal vez debido a su escasa representación en la serie.

En nuestro estudio el desarrollo de EICRc mejoró notablemente la SG (HR 0.046,  $p < 0.001$ ). Nuestros resultados muestran que la EICRc puede, al menos parcialmente, revertir el efecto deletéreo de las mutaciones somáticas. Así, los pacientes con >2 genes mutados presentaban una mejor SG en presencia de EICRc. Asimismo, la EICRc parece vencer el mal pronóstico de las mutaciones de *TP53*: casi todos los pacientes con mutaciones de *TP53* que desarrollaron EICRc sobrevivieron y no recayeron, que podría ser la razón por la que no observamos un impacto de las mutaciones de *TP53* en la SG entre pacientes mutados y no mutados, pero sí en la IAR (parece, por tanto, que mientras los pacientes con *TP53* que no desarrollan EICRc tienen un pronóstico muy desfavorable, pero los que sí la desarrollan consiguen eliminar el clon leucémico y evolucionan satisfactoriamente). De los 4 pacientes con mutaciones de *TP53* y cariotipo complejo 3 murieron precozmente (entre el día +28 y el +185) sin desarrollar EICRc, y el único que desarrolló EICRc murió en el día +157.

## CAPÍTULO 2

El pronóstico favorable que, según varios estudios, se atribuye a la EICRc, se ha relacionado con el EICL. Esto se puede intuir en nuestro estudio, ya que la IAR disminuyó en pacientes con características de alto riesgo que desarrollaron EICRc. Los pacientes con >2 genes mutados que desarrollaron EICRc tuvieron una IAR menor, similar a la de aquellos con  $\leq 2$  genes mutados. De igual modo, los pacientes con mutaciones de *TP53* tuvieron una menor IAR en presencia de EICRc, siendo ésta similar a la de los pacientes no mutados.

Observamos también que la VAF >10% en pacientes con mutaciones de *TP53* parece asociarse a peor pronóstico, tanto en SG como en SLR. Aunque los resultados son dispares, varios estudios parecen mostrar que la VAF de las mutaciones de *TP53* influye en el pronóstico, incluidos pacientes sometidos a TPH alogénico (ver introducción). En nuestro estudio, todos los pacientes con cariotipo complejo se encontraban en el grupo con VAF >10%. Varios estudios han evidenciado que la carga tumoral previa al TPH (medida por técnicas de EMR por citometría de flujo, PCR o NGS) se relaciona con una mayor probabilidad de recaída,(218–222) por lo que tratamientos que disminuyan significativamente la VAF de las mutaciones pre TPH podrían ser efectivos para lograr un mejor control de la enfermedad.

En resumen, el presente estudio confirma el impacto desfavorable de las mutaciones somáticas en el momento del trasplante, al tiempo que muestra que la EICRc puede amortiguar dicho impacto, especialmente en pacientes de alto riesgo (>2 genes mutados o mutaciones de *TP53*). Este beneficio en la SG y la IAR abre la puerta a la posibilidad de estrategias post TPH que estimulen el EICL, e incluso al uso de tratamientos preventivos (hipometilantes) en aquellos pacientes de más alto riesgo, a fin de reducir la carga tumoral. La supervivencia de los pacientes con mutaciones de *TP53* y cariotipo complejo resulta extremadamente limitada debido a la alta probabilidad de recaída precoz, por lo que deberían desarrollarse nuevas estrategias para este subgrupo de pacientes.



## **CAPÍTULO 3**

**Perfil mutacional en la recaída y evolución clonal de los pacientes con síndromes mielodisplásicos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos**



## CAPÍTULO 3

### 5.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### *Pacientes y muestras*

De una muestra inicial de 89 pacientes con SMD trasplantados en el Hospital Universitario de Salamanca entre 1998 y 2018, seleccionamos 71 pacientes, incluyendo 3 con LMMC y 4 con LMA/AREB-T de la FAB. Se descartaron 14 pacientes por ausencia de muestra en el pre trasplante, la recaída o el día +100; 1 paciente por presentar una LLC simultáneamente con el diagnóstico de SMD y 3 pacientes por haber muerto antes del día +100 sin evidencia de recaída. Se empleó ADN de células mononucleadas de médula ósea, y cuando no fue posible se utilizó sangre periférica. La extracción del ADN se llevó a cabo con el kit QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen©) y la cuantificación por fluorometría con Qubit 2.0 (Life Technologies©).

#### *Análisis de mutaciones*

Se secuenciaron mediante NGS muestras obtenidas en 3 momentos: pre-trasplante, en la recaída y en el día +100 en los pacientes que no habían recaído. Además, 16 pacientes fueron secuenciados en el momento del diagnóstico, todos los cuales habían recibido quimioterapia intensiva, excepto uno, que recibió azacitidina.

Pre trasplante 45 pacientes se secuenciaron empleando el panel comercial de amplicones de 54 genes descrito en el capítulo 2 (mutaciones en pacientes con SMD sometidos a TPH alogénico). Otros 23 pacientes se secuenciaron empleando el panel de captura de 117 genes propio descrito en el capítulo 1 (mutaciones en pacientes con SMD tratados con AEE) y en 3 pacientes se realizó secuenciación mediante amplicones de los genes mutados al diagnóstico. Al diagnóstico fueron secuenciados 16 pacientes con el panel de 117 genes.

De los pacientes que recayeron tras el trasplante (22) se secuenció la muestra de la recaída empleando el panel de captura de 117 genes mencionado y se realizó también secuenciación mediante amplicones de los genes mutados pre trasplante. En los pacientes que no presentaban mutaciones pre trasplante y no recayeron (28) no se realizó NGS en el día +100. En los pacientes que no recayeron, pero presentaban mutaciones pre trasplante (21), se realizó secuenciación mediante amplicones de dichas mutaciones en el día +100.

La secuenciación con el panel de amplicones de 54 genes y con el panel de 117 genes, así como el análisis de las variantes, ya han sido descritos en los capítulos

## CAPÍTULO 3

precedentes. En cuanto a la secuenciación mediante amplicones, todas las variantes detectadas en el pre-trasplante fueron resecuenciadas mediante amplicones con una cobertura mayor (5000-8000X). Las regiones genómicas de interés (500-800 pb) fueron amplificadas mediante PCR empleando cebadores de secuencias específicas purificados con AMPure Beads. Las bibliotecas fueron preparadas según el protocolo Nextera XT de Illumina y secuenciadas con un secuenciador MiSeq (Illumina).

### *Análisis de resultados*

La recaída se definió como persistencia o recurrencia morfológica de SMD ( $\geq 5\%$  de blastos medulares, displasia significativa) o presencia de EMR por citometría de flujo tras el TPH. La SG se calculó desde la fecha del TPH (fecha de infusión de los progenitores hematopoyéticos) hasta la fecha de la muerte por cualquier causa o del último seguimiento en los pacientes vivos. La SLR se calculó desde la fecha del trasplante hasta la fecha de recaída, muerte o último seguimiento en los vivos. El seguimiento fue actualizado el 30 de junio de 2020.

Las comparaciones de proporciones y rangos entre diferentes variables fueron efectuadas con el test Chi-cuadrado y el test exacto de Fisher. Las curvas de supervivencia se crearon con el método de Kaplan-Meier y las comparaciones se hicieron con el test log-rank. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS v23.0.

## CAPÍTULO 3

### 5.2. RESULTADOS

En la Tabla 3.1 se resumen las características de los pacientes.

La mediana de edad al trasplante fue de 53.78 años (p10-p90 39.96-67.25). De 71 pacientes, 22 recayeron tras el trasplante (31%), siendo la mediana de tiempo hasta la recaída de 108 días. Solo 7 pacientes recayeron después del día +150.

	<b>Recaídas n = 22 (31%)</b>	<b>No recaídas n = 49 (69%)</b>	<b>p valor</b>
<b>Edad (mediana)</b>	58.94 años	50.2 años	<b>0.049</b>
<b>Sexo</b>	22	49	0.801
Hombre	13 (59.1)	27 (55.1)	
Mujer	9 (40.9)	22 (44.9)	
<b>Clasificación OMS 2008</b>	22	49	0.152
CRDU	0 (0.0)	4 (8.2)	
CRDM	6 (27.3)	9 (18.4)	
AREB-1	8 (36.4)	12 (24.5)	
AREB-2	6 (27.3)	13 (26.5)	
SMD inclasificable	0 (0.0)	6 (12.2)	
LMA/AREB-T	0 (0.0)	4 (8.2)	
LMMC	2 (9.1)	1 (2.0)	
<b>Cariotipo (IPSS-R)</b>	17	39	0.082
Bueno	8 (47.1)	21 (53.8)	
Intermedio	3 (17.6)	12 (30.8)	
Pobre	2 (11.8)	5 (12.8)	
Muy pobre	4 (23.5)	1 (2.6)	
No disponible	5	10	
<b>IPSS-R</b>	18	32	0.452
Muy bajo	0 (0.0)	1 (3.1)	
Bajo	3 (16.7)	5 (15.6)	
Intermedio	3 (16.7)	10 (31.3)	
Alto	4 (22.2)	10 (31.3)	
Muy alto	6 (33.3)	5 (15.6)	
No aplica (LMMC)	2 (11.1)	1 (3.1)	
Desconocido	4	17	
<b>IPSS</b>	17	37	0.643
Bajo	1 (5.9)	4 (10.8)	
Intermedio-1	6 (35.3)	11 (29.7)	
Intermedio-2	7 (41.2)	17 (45.9)	

## CAPÍTULO 3

Alto	1 (5.9)	4 (10.8)	
No aplica (LMMC)	2 (11.8)	1 (2.7)	
Desconocido	5	12	
<b>Tratamiento</b>	22	49	0.287
Azacitidina	12 (54.5)	19 (38.8)	
Quimioterapia	7 (31.8)	13 (26.5)	
Otros	0 (0.0)	3 (6.1)	
No tratamiento	3 (13.6)	14 (28.6)	
<b>Situación al trasplante</b>	22	49	0.609
Respuesta completa	6 (27.3)	12 (24.5)	
Respuesta parcial	4 (18.2)	6 (12.2)	
Enfermedad estable	6 (27.3)	9 (18.4)	
Progresión	2 (9.1)	7 (14.3)	
Enfermedad activa sin tratamiento	3 (13.6)	13 (26.5)	
Aplasiado sin blastos	1 (0.0)	2 (4.1)	
<b>Acondicionamiento</b>	22	49	0.434
Mieloablativo	7 (31.8)	22 (44.9)	
Intensidad reducida	15 (68.2)	27 (55.1)	

**Tabla 3.1:** Características de los pacientes incluidos en el estudio

### *Mutaciones*

Por grupos de genes, el número de pacientes mutados pre trasplante fue el siguiente: genes de *splicing* 17 (23.9%), modificación de histonas 13 (18.3%), transcripción 15 (21.1%), señalización 14 (19.7%), metilación 11 (15.5%) y, finalmente, reparación del ADN 6 (8.5%) y genes del complejo de las cohesinas 5 (7%).

Los genes más frecuentemente mutados al trasplante fueron: *ASXL1* 9 pacientes (12.7%), *RUNX1* 7 (9.9%), *SETBP1* 7 (9.9%), *UA2F1* 6 (8.5%), *SRSF2* 5 (7%), *TET2* 5 (7%), *TP53* 6 (8.5%), *ZRSR2* 4 (5.6%), *EZH2* 4 (5.6%), *BCOR* 4 (5.6%) y *JAK2* 4 (5.6%). El resto de genes (*SF3B1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *ETV6*, *PHF6*, *STAG2*, *GATA2*, *NRAS*, *PTPN11*, *KMT2D*, *EP300*, *SH3B3*, *FLT3*, *RAD21*, *SMC1A1*) se encontraban mutados con una frecuencia inferior al 5%.

En 30 pacientes (42.3%) no se detectaron mutaciones por NGS al trasplante; 13 pacientes (18.3%) tenían 1 gen mutado, 11 (15.5%) tenían 2 genes mutados, 12 (16.9%) tenían 3 genes mutados, 4 (5.6%) tenían 4 genes mutados, 1 (1.4%) tenía 5 genes mutados y 1 (1.4%) tenía 6 genes mutados. La mediana de genes mutados al

### CAPÍTULO 3

trasplante fue de 1 (media de 1.41), siendo de 2.5 (media de 2.59) entre los pacientes que recayeron y de 0 (media 1.06) entre los que no recayeron. La mediana de la VAF de las mutaciones al trasplante fue del 30.16% (media 30.23%), mientras que en la recaída fue del 14.03% (media 24.49%).

De los pacientes que recayeron solo 2 no presentaban mutaciones al trasplante y ambos habían recibido quimioterapia previamente. En 11 casos se produjo ganancia de alguna mutación que no se encontraba antes del trasplante: *U2AF1* (2 mutaciones nuevas), *KMT2A* (2), *NRAS* (2), *RUNX1* (2), *TP53* (1), *SBDS* (1), *CTCF* (1), *GATA1* (1), *CUX1* (1), *PDGFRB* (1), *CEBPA* (1), *SF3B1* (1), *STAG2* (1) y *KRAS* (1). 8 pacientes presentaban en la recaída las mismas mutaciones que al trasplante. 6 pacientes perdieron alguna de las mutaciones previas, de los que 4 adquirieron alguna mutación nueva y 2 no adquirieron ninguna. Solo en 1 caso no se detectaron mutaciones en el momento de la recaída y sí en el pre trasplante.

En el momento de la recaída los genes más frecuentemente mutados fueron: *U2AF1* 6 pacientes (27.3%), *SETBP1* 4 (18.2%), *TET2* 3 (13.6%), *EZH2* 3 (13.6%), *KMT2D* 3 (13.6%), *RUNX1* 3 (13.6%), *TP53* 3 (13.6%), *NRAS* 3 (13.6%), *KRAS* 3 (13.6%), *ASXL1* 2 (9.1%), *PTPN11* 2 (9.1%), *JAK2* 2 (9.1%), *SF3B1* 2 (9.1%) y *ZRSR2* 2 (9.1%). El grupo de genes más frecuentemente mutado fue el de las vías de señalización (12 pacientes, 54.5%). En la tabla 3.2 se resume el perfil mutacional de los 22 pacientes que recayeron tras el TPH.

De los 49 pacientes que no recayeron, 21 (42.9%) presentaban alguna mutación previa al trasplante. En el día +100 la mayoría de ellos no presentaban ninguna mutación por NGS, excepto 2, que presentaban sendas mutaciones en *PHF6* y *ZRSR2*.

De los 15 pacientes que habían recibido quimioterapia intensiva (3+7 o FLAGIDA) secuenciados al diagnóstico, 11 presentaban alguna mutación. 6 pacientes “aclararon” las mutaciones tras el tratamiento y ninguno de ellos recayó, mientras que los 5 restantes mantuvieron alguna de las mutaciones del diagnóstico. De éstos, 2 se encontraban aplasiados sin blastos al trasplante (1 adquirió una nueva mutación bajo tratamiento y recayó tras el trasplante), 2 en progresión (1 adquirió una nueva mutación bajo tratamiento y recayó tras el trasplante) y 1 en RC con EMR negativa por citometría de flujo (no adquirió ninguna mutación bajo tratamiento y no recayó). Todas las mutaciones persistentes tras la quimioterapia eran mutaciones típicamente relacionadas con SMD (*splicing*, metilación, modificación de histonas), mientras que

### CAPÍTULO 3

las mutaciones de la vía RAS, como *NRAS* (3), *PTPN11* (1), *NF1* (1) o *CBL* (1), o las asociadas a LMA *de novo*, como *WT1* (2), *NPM1* (2) o *CEBPA* (1), se “aclararon” con el tratamiento quimioterápico.

Nº pac	Gen	Cromosoma	Mutación	Estado pre TPH	Día de recaída	VAF pre	VAF post
1	<i>ASXL1</i>	Cr 20	NM_015338:p.R725fs	RC	+122	7.43%	7.22%
	<i>NRAS</i>	Cr 1	NM_002524:p.G13D			0%	3.24%
2	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.S1286F	EA	+65	27.44%	40.63%
	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.R122fs			26.47%	45.65%
	<i>KRAS</i>	Cr 12	NM_004985:p.G13R			6.01%	1.61%
	<i>UAF1</i>	Cr 21	NM_001025203:p.S34F			31.2%	43.35%
	<i>PHF6</i>	Cr X	NM_001015877:p.R129X			9.43%	11.44%
3	<i>CUX1</i>	Cr 7	NM_001202543:p.R1462G	EE	+42	0%	34.51%
	<i>KMT2D</i>	Cr 11	NM_003482:p.V658E			0%	18.49%
4	<i>NRAS</i>	Cr 1	NM_002524:p.Q61K	RC	+363	0%	22.39%
	<i>EGFR</i>	Cr 7	NM_005228:p.S1070R			0%	18.89%
	<i>CTCF</i>	Cr 16	NM_006565:p.Y197C			0%	45.31%
	<i>GATA1</i>	Cr X	NM_002049:p.E67X			0%	27.32%
5	<i>SRSF2</i>	Cr 17	NM_001195427:p.95_103del	EE	+47	14.69%	3.56%
	<i>ETV6</i>	Cr 12	NM_001987:p.R433H			51.21%	0.6%
6	<i>SH2B3</i>	Cr 12	NM_001291424:p.W96X	RC	+334	10.66%	4.64%
	<i>SETBP1</i>	Cr 18	NM_015559:p.D868N			26.25%	4.85%
	<i>SETBP1</i>	Cr 18	NM_015559:p.G872R			9.68%	0%
	<i>ASXL1</i>	Cr 20	NM_015338:p.H630fs			12.73%	0%
	<i>U2AF1</i>	Cr 21	NM_001012478:p.190_195del			0%	8.08%
7	<i>IDH2</i>	Cr 15	NM_001290114:p.R10Q	RC	+108	43.46%	15.8%
	<i>KRAS</i>	Cr 12	NM_004985:p.G12V			34.03%	18.1%
	<i>PTPN11</i>	Cr 12	NM_002834:p.T73I			6.13%	0%
8	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.I1873T	RC	+84	1.52%	0%
	<i>U2AF1</i>	Cr 21	NM_001025203:p.S34F			0%	4.35%
9	<i>SF3B1</i>	Cr 2	NM_012433:p.K700E	ASB	+82	41.33%	8.91%
	<i>DNMT3A</i>	Cr 2	NM_153759:p.F662fs			44.14%	8.63%
	<i>DNMT3A</i>	Cr 2	NM_153759:p.542_543del			36.84%	7.48%
	<i>IDH2</i>	Cr 15	NM_001290114:p.R10Q			45.95%	9.08%
10	<i>U2AF1</i>	Cr 21	NM_001025203:p.R156H	EE	+24	45.46%	44.48%
	<i>KRAS</i>	Cr 12	NM_004985:p.D33E			0%	5.78%
11	<i>JAK2</i>	Cr 9	NM_004972:p.V617F	RP	+137	11.69%	4.0%
12	<i>RUNX1</i>	Cr 21	NM_001001890:p.R139X	EE	+99	11.97%	0%
	<i>RUNX1</i>	Cr 21	NM_001001890:p.S114P			30.27%	0%



### CAPÍTULO 3

	<i>BCOR</i>	Cr X	NM_001123384:p.R1323W			60.43%	0%
	<i>ASXL1</i>	Cr 20	NM_015338:p.L823X			6.93%	0%
	<i>SMC3</i>	Cr 10	NM_005445:p.G70S			0%	42.52%
<b>13</b>	<i>TP53</i>	Cr 17	NM_001126115:p.R43H	EA	+59	34.98%	68.66%
	<i>JAK2</i>	Cr 9	NM_004972:p.V617F			2.08%	25.88%
<b>14</b>	<i>UA2F1</i>	Cr 21	NM_001025203:p.S34F	PR	+584	29.06%	15.05%
	<i>RUNX1</i>	Cr 21	NM_001001890:p.R142fs			14.46%	21.95%
<b>15</b>	<i>SETBP1</i>	Cr 18	NM_015559:p.D868A	PR	+163	18.96%	39.41%
	<i>KRAS</i>	Cr 12	NM_004985:p.G12R			3.47%	0%
	<i>PTPN11</i>	Cr 12	NM_002834:p.A72T			3.17%	40.45%
	<i>JAK2</i>	Cr 9	NM_004972:p.V617F			2.44%	0%
	<i>U2AF1</i>	Cr 21	NM_001012478:p.190_195del			0%	19.16%
<b>16</b>	<i>TP53</i>	Cr 17	NM_001126118:p.Q13fs	RC	+151	9.92%	10.41%
	<i>EP300</i>	Cr 22	NM_001429:p.2336_2337del			33.09%	13.54%
	<i>TP53</i>	Cr 17	NM_001126115:p.P20fs			0%	10.91%
	<i>KMT2A</i>	Cr 11	NM_001197104:p.M2216T			0%	18.8%
<b>17</b>	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.C1193Y	RP	+112	22.47%	0%
	<i>SRSF2</i>	Cr 17	NM_001195427:p.P95_R103del			44.04%	0%
	<i>RUNX1</i>	Cr 21	NM_001001890:p.D133E			22.49%	0%
<b>18</b>	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.E1318D	EE	+60	32.24%	6.92%
	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.Q1466fs			39.69%	6.91%
	<i>ZRSR2</i>	Cr X	NM_005089:p.R295X			65.93%	8.31%
	<i>EZH2</i>	Cr 7	NM_001203249:p.Q514X			71.36%	13.21%
	<i>SMC1A</i>	Cr X	NM_006306:p.R586Q			61.11%	5.11%
<b>19</b>	<i>SETBP1</i>	Cr 18	NM_015559:p.G870S	EE	+154	4.32%	1%
	<i>SETBP1</i>	Cr 18	NM_015559:p.D868N			4.04%	0%
	<i>SETBP1</i>	Cr 18	NM_015559:p.I871T			2.11%	0%
	<i>RUNX1</i>	Cr 21	NM_001001890:p.L29S			44.86%	8.64%
	<i>ASXL1</i>	Cr 20	NM_015338:p.G642fs			20.83%	0%
<b>20</b>	<i>TP53</i>	Cr 17	NM_001126115:p.S109C	EA	+104	51%	61.97%
	<i>KMT2D</i>	Cr 11	NM_003482:p.V4985fs			20.33%	21.89%
	<i>SBDS</i>	Cr 7	NM_016038:p.K148N			0%	15.94%
<b>21</b>	<i>EZH2</i>	Cr 7	NM_152998:p.P218fs	RP	+533	21.43%	32.69%
	<i>SETBP1</i>	Cr 18	NM_015559:p.K459E			52.76%	50.07%
	<i>ASXL1</i>	Cr 20	NM_015338:p.Y591X			16.44%	18.45%
	<i>ZRSR2</i>	Cr X	NM_005089:p.K132fs			18.08%	26.6%
	<i>PDGFRB</i>	Cr 5	NM_002609:p.G39E			0%	29.21%
	<i>CEBPA</i>	Cr 19	NM_001285829:p.P78delinsHPP			0%	12.00%
	<i>RUNX1</i>	Cr 21	NM_001001890:p.H377fs			0%	7.93%
	<i>RUNX1</i>	Cr 21	NM_001001890:p.R139_S140delinsX			0%	7.58%
	<i>SF3B1</i>	Cr 2	NM_012433:p.K700E			0%	2.87%
	<i>STAG2</i>	Cr X	NM_006603:p.R259X			0%	21.72%

## CAPÍTULO 3

<b>22</b>	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.R1216Ter	RP	+125	43.4%	23.34%
	<i>TET2</i>	Cr 4	NM_001127208:p.F1901LfsTer4			40.24%	20.62%
	<i>EZH2</i>	Cr 7	NM_004456:p.R690H			89.12%	49.47%
	<i>NRAS</i>	Cr 1	NM_002524:p.G60E			15.27%	14.03%

RC: Respuesta Completa. RP: Respuesta Parcial. EA: Enfermedad Activa (sin tratamiento). EE: Enfermedad Estable (con tratamiento). ASB: Aplasiado sin blastos. PR: Progresión.

**Tabla 3.2:** Perfil mutacional de los pacientes que recaen, antes del trasplante y en el momento de la recaída

### *Evolución clonal*

Podemos distinguir 3 modelos (posibles) de evolución clonal en nuestros pacientes:

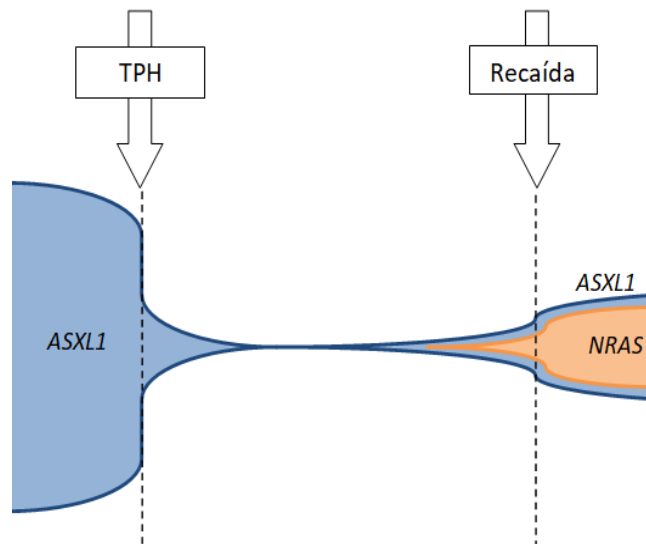
- a) *Modelo de evolución lineal.* Se trata del modelo más simple. A partir de un clon inicial, portador de una o varias mutaciones, van surgiendo subclones, cada uno de los cuales añade una mutación nueva al subclón anterior, de forma que cada nuevo subclón es portador de todas las mutaciones precedentes. Las mutaciones subclonales presentan una VAF decreciente, desde el clon inicial al subclón más “joven”. La recaída puede producirse a partir del clon principal o de alguno de los subclones; en este último caso las mutaciones que encontremos presentarán una VAF similar entre sí, debido a la expansión del subclón. La mutación del clon principal ha de estar siempre presente, ya que todos los subclones la portan.
  
- b) *Modelo de evolución ramificada.* En este modelo, a partir de un mismo clon o subclón pueden surgir subclones independientes que sigan líneas evolutivas separadas. Cada subclón será portador de, al menos, todas las mutaciones precedente, incluida la inicial; sin embargo, los subclones independientes portarán mutaciones adicionales distintas entre sí. Si uno de los subclones presenta una ventaja selectiva sobre el resto tenderá a expandirse a su costa, por lo que su VAF se incrementará progresivamente y los subclones menos competitivos tenderán a desaparecer (“barrido clonal”). Cuando la VAF es pequeña no resulta fácil determinar si distintas mutaciones subclonales forman parte de la misma rama evolutiva o pertenecen a ramas separadas; por ello resulta de gran interés realizar la NGS en distintos momentos de la evolución de la enfermedad.

## CAPÍTULO 3

- c) *Modelo de evolución en paralelo.* Este es el modelo más complejo y raro, e implica la existencia de clones independientes. Debido a la administración de tratamientos inmunosupresores, a la eliminación del clon principal y a los mecanismos de selección clonal, pequeños clones presentes pero no detectables al diagnóstico podrían emerger dando lugar a una progresión leucémica. Para poder demostrar la evolución en paralelo es necesario realizar secuenciación *single cell*, esto es, en colonias celulares separadas.

A continuación, realizamos una descripción de la evolución de las mutaciones en cada uno de los pacientes que recaen tras el trasplante. Se trata, no obstante, de hipótesis de evolución razonables, ya que no se ha hecho secuenciación *single cell* ni disponemos de información en muchos momentos de la evolución de la enfermedad, por lo que en algunos casos puede haber más de una explicación posible.

1. Este caso presenta una evolución lineal típica. Partiendo de un clon portador de una mutación de *ASXL1* al trasplante, en situación de RC con azacitidina, se produjo la recaída (+122) con ganancia de una mutación en *NRAS*. Dicha mutación podría ser de nueva adquisición, o estar ya presente con una carga alélica indetectable al trasplante.

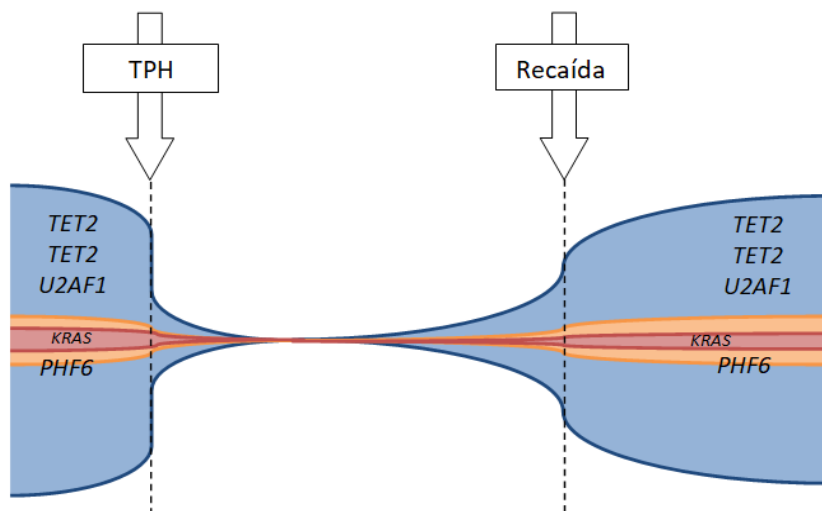


**Figura 3.1:** Modelo de evolución lineal (paciente 1) con emergencia de un subclon portador de una mutación que no se había detectado al trasplante

2. Al trasplante existía un clon dominante con tres mutaciones (*U2AF1*, *TET2* y *TET2* con *VAF* similar) y dos subclones, portadores de sendas mutaciones en

## CAPÍTULO 3

*PHF6* (9.43%) y *KRAS* (6.01%), aunque no podemos determinar si ambas se encuentran en la misma célula (evolución lineal) o se trata de subclones independientes (evolución ramificada). El paciente se encontraba en situación de Enfermedad Activa (EA) al trasplante, pues no había recibido tratamiento previo. En la recaída (+65) la expansión clonal se produjo a partir del clon principal, aunque sobrevivió una población minoritaria portadora de mutaciones en *KRAS* y *PHF6*.



**Figura 3.2.** Modelo de evolución lineal (paciente 2), con persistencia del clon principal y los subclones previos al trasplante

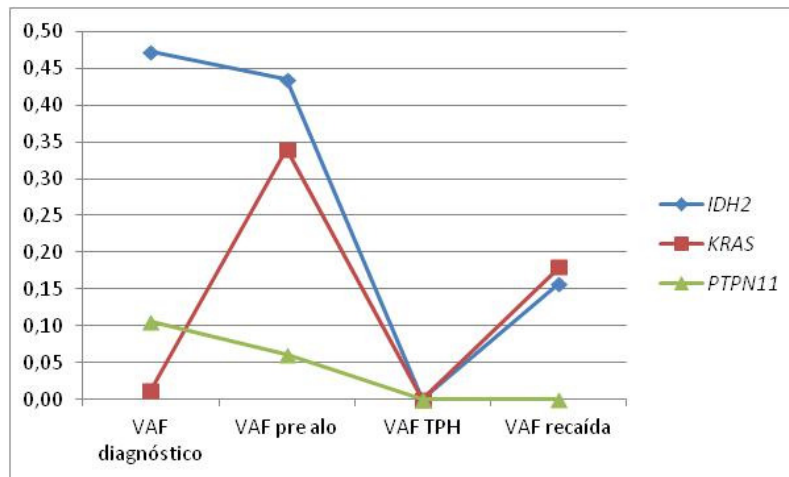
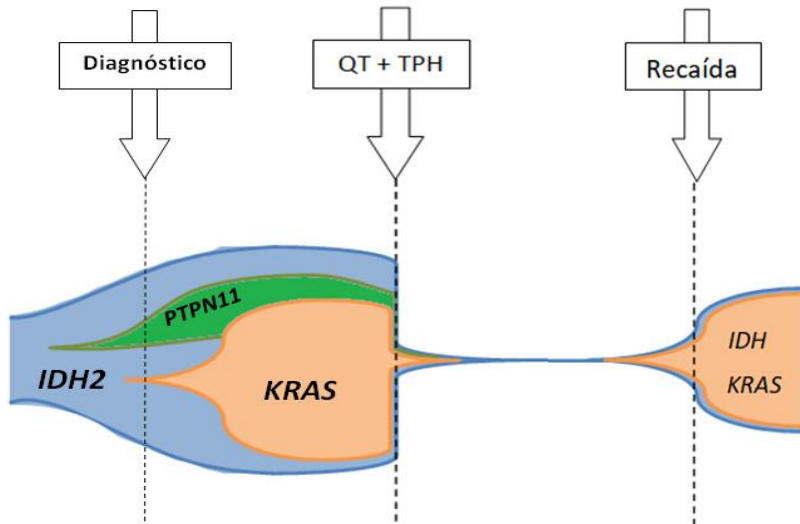
3. El paciente no presentaba mutaciones en el pre trasplante. Diagnosticado de AREB-1 (6% de blastos), recibió quimioterapia, sin respuesta. Recayó en el día +42 con un 7% de blastos por morfología y un quimerismo en médula ósea del 4% (receptor), detectándose mutaciones en *CUX1* (34.51%) y *KMT2D* (18.49%). La primera es una variante benigna y la segunda de significado incierto, por lo que podrían provenir del donante y no estar relacionadas con la recaída, ya que la VAF de ambas mutaciones es desproporcionadamente alta respecto del porcentaje de blastos y el quimerismo del receptor.
4. Paciente diagnosticado de AREB-2, tratado con quimioterapia intensiva, alcanzando RC. No presentaba mutaciones en la recaída y recayó como LMA en el día +363 con mutaciones en los genes *KRAS*, *EGFR*, *CTCF* y *GATA1*. Se trata de una recaída tardía en la que resulta imposible establecer la secuencia

### CAPÍTULO 3

de adquisición de las mutaciones, al no disponer de determinaciones intermedias o al diagnóstico.

5. Se detectaron 2 mutaciones al trasplante, en situación de Enfermedad Estable (EE) tras azacitidina: en *ETV6* (probable mutación germinal) y en *SRSF2*. En la recaída ambas mutaciones fueron detectadas mediante amplicones con una VAF mínima. El paciente presentó EMR positiva por citometría de flujo en el día +56 y en el +100, realizándose descenso del tratamiento inmunosupresor, sin llegar a presentar recaída franca.
6. En el pre trasplante (RC tras azacitidina) encontramos un clon principal portador de una mutación de *SETBP1* y tres subclones, de los que dos (*SETBP1* y *ASXL1*) desaparecieron en la recaída (+334), encontrando solo un subclón portador de *SH2B3* (VAF 4%) y *SETBP1* (VAF 4%). También detectamos una mutación en *U2AF1* con una VAF del 8%, que podría corresponder a un clon anterior no detectado en el pre trasplante (evolución en paralelo), a un nuevo clon con ventaja proliferativa independiente del clon principal (evolución en paralelo) o a una variante presente en la médula del donante. La diferencia observada en la VAF hace poco probable que la mutación de *U2AF1* corresponda a un subclón derivado de los anteriores. En el momento de la recaída el paciente presentaba un quimerismo mixto (22% del receptor en linfocitos y 4% en granulocitos), que había sido completo hasta el día +180. Tras suspender el tratamiento inmunosupresor y realizar ILD, alcanza RC con EMR negativa y quimerismo completo.
7. Este es un modelo de evolución ramificada con dos subclones independientes. Al diagnóstico, como AREB-2, presentaba tres mutaciones: *IDH2* (clon principal, VAF 47.3%), *PTPN11* (subclón, VAF 10.6%) y *KRAS* (subclón, VAF 1.26%). Tras recibir 1 ciclo de azacitidina, progresó a LMA, observándose una expansión del subclón portador de *KRAS* (VAF 40.4%), a costa del subclón *PTPN11* (VAF 5.34%). Tras el trasplante desapareció el subclón *PTPN11*, pero la persistencia del subclón *KRAS* dio lugar a la recaída de la LMA (+108).

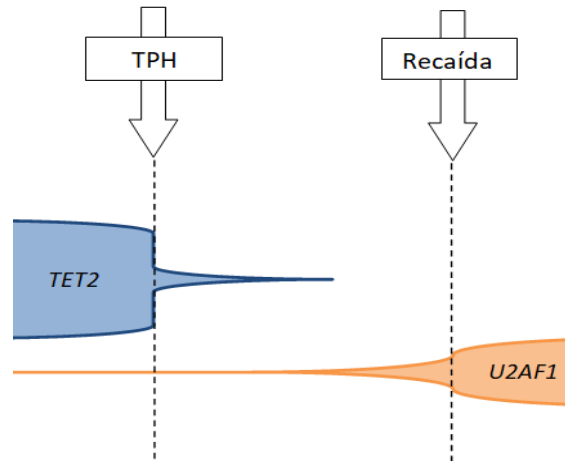
## CAPÍTULO 3



**Figura 3.3.** Modelo de evolución ramificada (paciente 7). A partir del clon inicial, se produce una expansión del subclón *KRAS* (rojo), a costa del subclón *PTPN11* (verde), que desaparece tras el trasplante. La recaída se produce a partir del subclón *KRAS*.

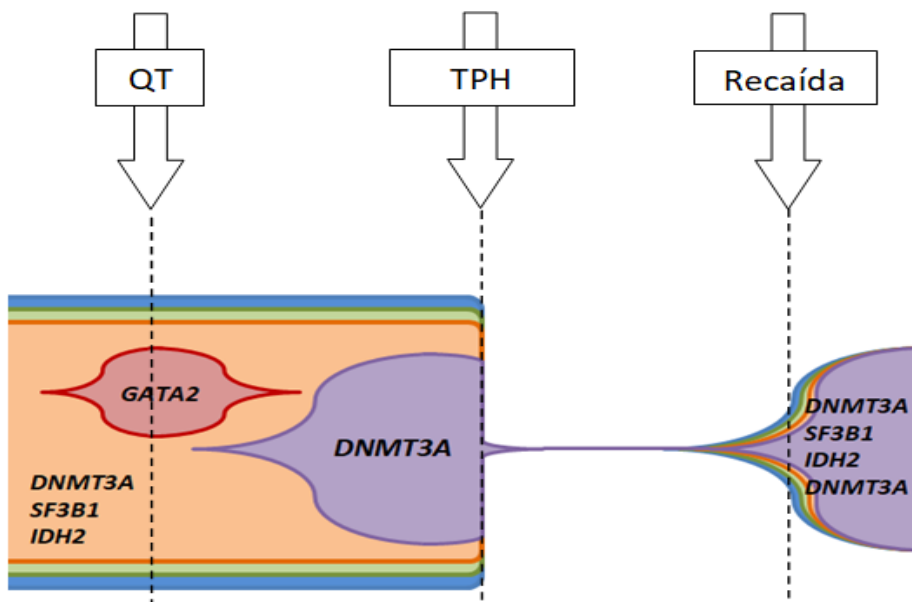
8. El paciente presentaba una mutación de *TET2* (1.52%) en el momento del trasplante; previamente había recibido 5 ciclos de azacitidina, alcanzando RC. Recayó en el día +84 con un 15% de blastos, detectándose una mutación de *U2AF1* (4.35%), que probablemente corresponde a un clon previo independiente cuya VAF, por efecto del tratamiento, se habría hecho indetectable en el pre trasplante y se habría expandido después. Podría tratarse de un caso de evolución en paralelo (es menos probable que se trate de un nuevo clon, dado el escaso tiempo transcurrido hasta la recaída).

### CAPÍTULO 3

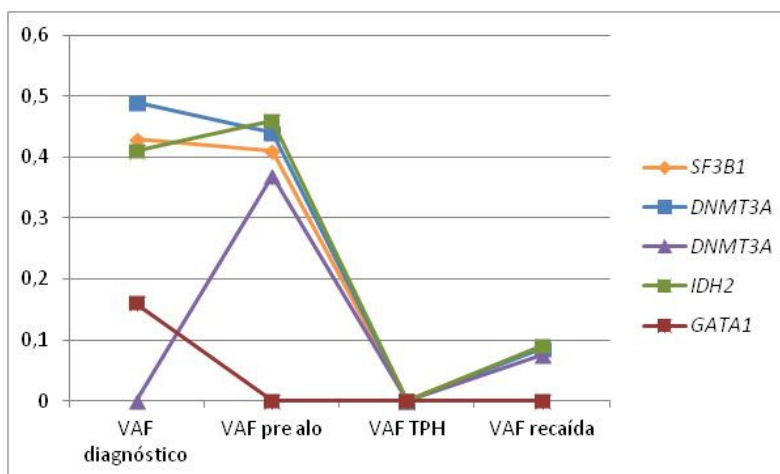


**Figura 3.4.** Modelo (posible) de evolución en paralelo (paciente 8).

9. Al diagnóstico el paciente presentaba un clon dominante con tres mutaciones (*DNMT3A*, *SF3B1* e *IDH2*) y un subclón portador de *GATA2* (15%), que desapareció con la administración de quimioterapia intensiva. Sin embargo, en el pre trasplante (aplasiado sin blastos), emergió un nuevo subclón portador de una segunda mutación de *DNMT3A*, que se volvió a detectar en la recaída.



### CAPÍTULO 3



**Figura 3.5.** Modelo de evolución ramificada (paciente 9). Con la administración del tratamiento, el subclón *GATA2* (rojo) desaparece, pero surge un subclón *DNMT3A* (morado), que emerge en la recaída.

10. Caso similar a p1, con ganancia de mutación de *KRAS* en la recaída (+24). El paciente se había diagnosticado de AREB-1 y había recibido azacitidina, permaneciendo con EE. Al no disponer de NGS al diagnóstico no podemos determinar si el subclón *KRAS* existía previamente.
11. Modelo lineal con mutación de *JAK2* al trasplante (RC con EMR positiva y mielofibrosis), presente también en la recaída (+137, EMR positiva). Al diagnóstico el paciente presentaba un cariotipo complejo y mutación de *TP53*. En la recaída, el panel no identificó mutaciones, aunque se detectó la presencia de una mutación de *JAK2* con una VAF del 4% mediante amplicones. Tras la recaída recibió 6 ciclos de decitabina e ILD, alcanzando RC, hasta que, varios años después, presentó una progresión franca a LMA.
12. CRDM al diagnóstico, recibió quimioterapia se trasplantó en situación de EE. “Aclaró” las mutaciones que presentaba al trasplante (*RUNX1*, *RUNX1*, *BCOR*, *ASXL1*), pero se detectó una nueva mutación en *SMC3* (VAF 43%) en la recaída (+99), que en realidad fue un fallo de injerto, y que probablemente corresponde a una mutación del donante, ya que presentaba un quimerismo mixto del 8% (del receptor). Cabe pensar que el clon neoplásico fue completamente eliminado por el tratamiento.



### CAPÍTULO 3

13. Al trasplante (EA) se detectaron 2 mutaciones, en *TP53* (clon principal) y *JAK2* (subclón), con aumento de la VAF en la recaída (+59). La VAF de *TP53* >55% sugiere la pérdida del alelo contrario.
14. En el momento del diagnóstico presentaba una mutación en *U2AF1* (23.85%); posteriormente recibió tratamiento con quimioterapia intensiva, sin respuesta. En el pre trasplante se objetivó un aumento de la VAF (29.06%) y se detectó una mutación en *RUNX1*. Se realizó un control post trasplante en el día +100, en que no presentaba ninguna de las mutaciones del pre trasplante. Sin embargo, recayó en el día +584, detectándose ambas mutaciones. En este momento la VAF de la mutación de *RUNX1* era casi un 7% mayor que la de *U2AF1*, por lo que nos inclinamos a pensar que la mutación de *RUNX1* corresponde a un clon independiente, y no a un subclón.
15. El paciente presentaba al trasplante (progresión) un clon principal con mutación de *SETBP1* y tres subclones minoritarios: *KRAS*, *JAK2* y *PTPN11*. En el momento de la recaída (+584) presentaba una expansión del subclón portador de la mutación de *PTPN11* (aumento de la VAF del 3.17% al 40.45%), portador a su vez, de un nuevo subclón con mutación de *U2AF1*.
16. El paciente presentaba un clon *EP300* y un subclón *TP53* al trasplante (RC). En la recaída (+151), con transformación a LMA, emergió el subclón *TP53* (portador también de la mutación de *EP300*), junto con un nuevo subclón portador de una mutación de *TP53* distinta (VAF 10.9%). Se detectó también una mutación de *KTM2A* con una VAF del 18%, que está descrita como benigna y que podría provenir del donante, ya que la recaída se produjo con >40% de blastos.
17. El paciente presentaba un clon *SRSF2* (VAF 44%) y un subclón con mutaciones en *TET2* (VAF 22%) y *RUNX1* (VAF 22%), o menos probablemente, dos subclones independientes. Extrañamente, en este caso no se detectó ninguna mutación en la recaída, que se produjo en el día +112 con EMR de 1.67% por CMF y quimerismo completo. Es probable que la VAF fuera <1%, lo que habría dificultado la detección de las variantes.

### CAPÍTULO 3

18. Caso similar a p2, con reducción de la VAF de todas las mutaciones, y conservación de la relación entre ellas, lo que indica que no se produjo expansión clonal.
19. Este paciente presentaba un clon portador de *RUNX1*, tres subclones *SETBP1* y un subclón *ASXL1*. La recaída se produjo a expensas del clon principal, con desaparición de todos los subclones, excepto un *SETBP1* que emergió con una VAF muy baja.
20. Caso similar a p1. Al trasplante presentaba un clon *TP53* (con probable pérdida del alelo contrario) y un subclón *KMT2D*. En la recaída, se observó una expansión del clon *TP53* y aparición de un subclón *SBDS* (la mutación de este gen se ha asociado a la presencia de mutaciones de *TP53* y progresión a LMA).
21. Modelo lineal/ramificado de gran complejidad con emergencia de numerosos subclones en la recaída (+533). Debido al tiempo transcurrido hasta la recaída y la ausencia de controles intermedios resulta imposible establecer el árbol genealógico de las mutaciones.
22. Caso similar a p2. Recibió azacitidina, alcanzando RP. Al trasplante presentaba un clon principal con mutación de *TET2* (2) y *EZH* (con probable pérdida del alelo contrario) y un subclón *NRAS*. En la recaída (+120) la VAF de las mutaciones del clon principal se había reducido a la mitad, pero la de *NRAS* se mantuvo estable, lo que refleja una mayor resistencia de dicha mutación al tratamiento.

A continuación, describimos la evolución de los 2 pacientes que no recayeron y tenían mutaciones en el día +100:

- a) CRDM al diagnóstico, recibió azacitidina, alcanzando RP. Mutación de *PHF6* al trasplante con VAF del 16.7%, que en el día +100 era del 3.57%, presentando quimerismo completo con hematopoyesis del receptor del 4.7%. Desarrolló EICRc.
- b) AREB-2 al diagnóstico, no recibió tratamiento. Presentaba al trasplante mutación de *SF3B1* con VAF 89% y de *ZRSR2* con VAF del 39.2%. En el día

## CAPÍTULO 3

+100 se detectó mutación de *ZRSR2* con VAF 3% y quimerismo completo. Desarrolló EICRc.

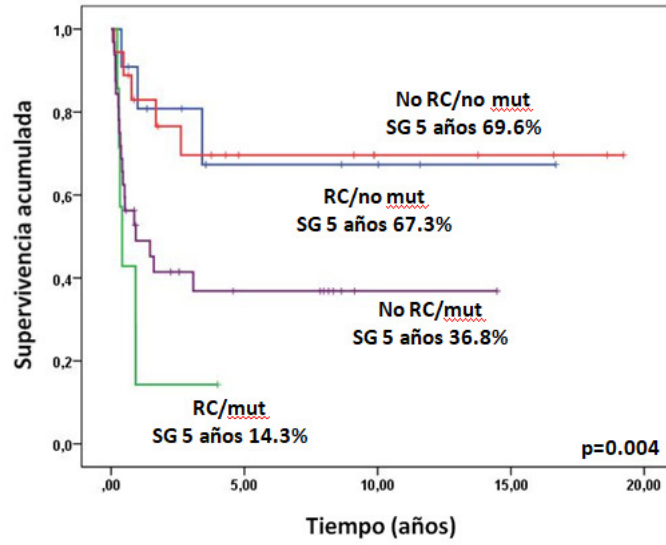
### *Mutaciones y recaída*

Descartando a 3 pacientes que se encontraban aplasiados sin blastos al trasplante, 11 pacientes (15.5%) se encontraban en RC morfológica y no presentaban mutaciones, 7 pacientes (9.9%) se encontraban en RC y presentaban mutaciones, 18 pacientes (25.4%) no se encontraban en RC y no presentaban mutaciones y 32 pacientes (45.1%) no se encontraban en RC y presentaban mutaciones. Según el tratamiento recibido, la proporción de pacientes mutados fue superior entre los que recibieron azacitidina (20, 66.7%) e inferior entre los que recibieron quimioterapia (42.9%) ( $p=0.266$ ). El número de recaídas fue significativamente mayor ( $p<0.001$ ) entre los pacientes mutados (20 recaídas, 90.9%) que entre los no mutados al trasplante (2 recaídas, 9.1%), con independencia de la respuesta. El porcentaje de recaídas según el estado previo al trasplante fue el siguiente:

- RC no mutados: 9.1%
- RC mutados: 71.4%
- No RC no mutados: 5.6%
- No RC mutados: 43.8%

La mediana de seguimiento desde el trasplante en los vivos fue de 4.51 años (p10-p90 0.86-15.97). La SG fue del 54.5% a los 5 años (mediana no alcanzada) y la SLR del 48.9% a los 5 años (mediana 3.416 años). Se observó una diferencia en la mediana de SLR según el estado previo al trasplante: mediana de 0.41 años (IC 95% 0.210-0.618 años) y 0.93 años (IC 95% 0.000-2.218) entre los pacientes mutados en RC y no RC, respectivamente vs. mediana no alcanzada en los pacientes no mutados, tanto en RC como no RC ( $p=0.004$ ) (Figura 3.6). No se observaron diferencias en la SLR entre pacientes en RC (mediana 3.42 años) y no RC (3.08,  $p=0.999$ ).

### CAPÍTULO 3



**Figura 3.6:** Supervivencia libre de recaída en función del estado previo al trasplante. Los pacientes con genes mutados al trasplante, independiente de la respuesta morfológica, presentaron un peor pronóstico

### 5.3. DISCUSIÓN

En el presente estudio describimos el perfil mutacional de un grupo de pacientes con SMD sometidos a TPH alogénico y su evolución en el tiempo, analizamos el efecto del tratamiento en el “aclaramiento” de las mutaciones y evaluamos el papel de la NGS antes y después del trasplante.

Alrededor del 40% de nuestros pacientes no presentaba ninguna mutación al trasplante, lo que probablemente guarda relación con el hecho de que >2/3 recibieron algún tipo de tratamiento modificador (azacitidina o quimioterapia intensiva). Diferentes autores han demostrado que la VAF de las mutaciones somáticas disminuye en presencia de lenalidomida, hipometilantes o quimioterapia, pudiendo llegar incluso a hacerse indetectable, y que existe una relación directa entre la disminución de la VAF y la calidad de la respuesta.(196,223–226) Nuestros resultados parecen apuntar en esta dirección, ya que la proporción de pacientes mutados fue superior entre los que no alcanzaron RC o no recibieron tratamiento modificador respecto a los que sí alcanzaron RC (64% vs. 38.9%). Entre los pacientes tratados con quimioterapia de los que conocíamos el perfil mutacional al diagnóstico, la mayoría de ellos “aclaró” las mutaciones, si no total, al menos parcialmente, o experimentó una reducción de la VAF, y solo en 2 casos se constató aumento de la VAF y ganancia de mutaciones nuevas. Este hecho pone de manifiesto el papel del tratamiento de inducción en la reducción de la carga tumoral, si bien se ha demostrado que éste puede propiciar la selección de subclones que eventualmente den lugar a una recaída posterior, tal y como observamos en los pacientes p7, p9 y p14.(212,223,224,226) La quimioterapia intensiva podría ser más eficaz que azacitidina a la hora de “aclarar” las mutaciones somáticas, pues la proporción de pacientes mutados entre los tratados con azacitidina fue superior en más de un 20% mayor respecto a los tratados con quimioterapia, aunque es probable que influya más en la selección de subclones resistentes, especialmente en aquellos pacientes que no alcanzan RC.(100) El tratamiento podría también favorecer la expansión de clones no relacionados, como sucede en la aplasia medular, o causar mutaciones nuevas.(212) Observamos también que mutaciones que suelen asociarse a progresión a LMA o que son típicas de LMA *de novo* (vía RAS, *NPM1*, *WT1*) parecen más sensibles al efecto de la quimioterapia que las mutaciones relacionadas con SMD o LMA-s. El perfil mutacional podría, así, ayudarnos a seleccionar el tratamiento de inducción óptimo para nuestros pacientes.

En la recaída observamos que la mayoría de los pacientes tenía las mismas mutaciones que al trasplante y en alrededor del 50% se detectó alguna mutación nueva. *U2AF1* fue el gen más frecuentemente mutado en la recaída, si bien

## CAPÍTULO 3

predominaban las mutaciones que afectaban a genes de las vías de señalización, cuya incidencia pasó del 36.4% pre trasplante al 54.5% post trasplante entre los pacientes en recaída, siendo su frecuencia en la serie global de un 19.7%, lo que está en consonancia con lo que se conoce sobre el papel desempeñado por este tipo de mutaciones en la transformación leucémica.(187,191,192) En general, las recaídas se produjeron a expensas de clones y subclones ya presentes en el momento del trasplante. Tan solo en un caso no se detectó ninguna mutación, probablemente debido a la baja carga tumoral en ese momento (p17), y en otros 2 casos las mutaciones detectadas probablemente provenían del donante (p3, p12). Las mutaciones vieron reducida su VAF en unos casos y aumentada en otros, si bien fue en los pacientes en los que la VAF aumentó o permaneció estable en los que, normalmente, se observó ganancia de mutaciones no detectadas previamente (p1, p10, p15, p20, p21). Las mutaciones adquiridas en la recaída, en general, correspondían a mutaciones previamente relacionadas con pronóstico adverso y riesgo de evolución a LMA (*NRAS*, *KRAS*, *U2AF1*, *RUNX1*, *TP53*, *SBDS*, *STAG2*). La recaída se produjo en unos casos a expensas del clon principal (p2, p19) y en otros a partir de alguno de los subclones previos al trasplante (p7, p15, p16); cabe pensar también que algunas mutaciones presentes al diagnóstico pudieron haberse “aclarado” con el tratamiento de inducción, razón por la cual no se detectaron en el pre trasplante, y haber emergido en la recaída (p1, p10). Resulta, pues, fundamental garantizar que la sensibilidad de la técnica sea lo suficientemente elevada, ya que un alto porcentaje de las mutaciones causantes de la recaída en pacientes con SMD trasplantados no se detectan previamente.(212) En nuestro estudio observamos que algunas mutaciones con una VAF muy baja que no fueron detectadas con el panel de captura en el pre trasplante sí lo fueron por amplicones.

En consonancia con los hallazgos expuestos en el capítulo 2, encontramos que la mediana del número de genes mutados es superior entre los pacientes que recaen que entre los que no recaen, lo que apunta a que una mayor diversidad clonal implica mayor riesgo de recaída. Descubrimos, sin embargo, que algunos pacientes que alcanzaron RC presentaban mutaciones al trasplante que, en ocasiones, fueron responsables de la recaída posterior. J.A. Martignoles afirma que la presencia de al menos una mutación en RC tras la inducción aumenta el riesgo de recaída post trasplante, especialmente cuando se descartan mutaciones en *TET2*, *DNMT3A* y *ASXL1*, que parecen relacionarse con hematopoyesis clonal, y cuyo pronóstico, por tanto, es menos claro.(227) E. Onecha también señala que pueden detectarse mutaciones en pacientes en RC tras la inducción con quimioterapia, especialmente

## CAPÍTULO 3

*TET2*, *DNMT3A* y *ASXL1*, aunque éstas no necesariamente se correlacionan con un peor pronóstico.(226) En nuestro estudio, de hecho, de 7 pacientes en RC mutados al trasplante, 5 recayeron y en 4 se detectó alguna mutación nueva (p1, p8, p16 y p6, aunque en este último caso el origen de la mutación es dudoso), lo que bien pudo deberse al efecto de selección de subclones por el tratamiento recibido. Al analizar el impacto sobre la SLR, hallamos que la presencia de mutaciones constituye un factor de mal pronóstico, independientemente de la situación previa al trasplante. Así, los pacientes que no habían recibido tratamiento o no habían alcanzado RC y no tenían mutaciones tenían una SLR similar a la de los pacientes no mutados en RC. Por el contrario, como hemos visto, los pacientes en RC mutados presentan una alta probabilidad de recaída, superior incluso a la de los mutados no tratados o que no alcanzaron RC. Numerosos estudios han demostrado el valor pronóstico de las técnicas de EMR en el pre trasplante, ya sea por citometría de flujo, PCR o, más recientemente, NGS.(228–231) En los SMD, la citometría y la PCR no resultan siempre útiles, por lo que la NGS podría desempeñar un papel importante en el futuro. Nuestros resultados avalan el uso de la NGS como técnica de EMR previa al trasplante en pacientes mutados, especialmente aquellos que reciben tratamiento de inducción.

De los pacientes en recaída, solo en 2 no se detectaron mutaciones al trasplante; ambos habían recibido quimioterapia intensiva, lo que pudo haber contribuido al “aclaramiento” de las mutaciones presentes al diagnóstico. Alrededor del 50% de los pacientes mutados al trasplante no recayó; en casi todos ellos no detectamos mutaciones en el día +100. Tan solo 2 pacientes que no recayeron presentaban enfermedad residual por NGS, lo que pone de manifiesto la capacidad del trasplante para controlar la enfermedad a través del EICL (de hecho, ambos pacientes desarrollaron EICRc). Si bien el TPH parece capaz de eliminar el clon primario, con lo que se logra curar la enfermedad, parece que no todas las mutaciones se “aclaran” con la misma facilidad. Así, según J.M. Klco, mientras que las mutaciones de *FLT3*, *NRAS* y *KRAS*, tienden a desaparecer en el día +30, las mutaciones de *TET2* y *DNMT3A* suelen persistir. Los estudios de M.A. Jacoby, J.M. Klco y E.J. Duncavage han demostrado que la presencia de mutaciones en el día +30 (VAF >2.5% en el estudio de Klco y >0.5% en el de Duncavage) conlleva un alto riesgo de recaída. Duncavage determinó, además, que la presencia de mutaciones en el día +100 se correlaciona con una probabilidad de recaída al año del 67%.(210–212) En nuestro estudio, la mayoría de las recaídas se produjeron precozmente, por lo que consideramos que evaluar el estado mutacional antes de este momento puede

## CAPÍTULO 3

proporcionarnos información adicional sobre la evolución de la enfermedad, especialmente en casos con EMR negativa por otras técnicas o quimerismo completo. En tales casos, se podrían llevar a cabo intervenciones precoces a fin de evitar una recaída franca. La VAF de las mutaciones puede también ayudar en la toma de decisiones: si es baja, reducir la inmunosupresión puede ser suficiente, pero si es mayor, se requerirían medidas más contundentes, como iniciar tratamiento precoz con hipometilantes.

El modelo de evolución clonal que con mayor frecuencia observamos en nuestra serie es el lineal, aunque también encontramos casos que presentan una evolución ramificada. Ambos modelos han sido avalados por numerosos investigadores.(120,187,223,227) Ahora bien, en ocasiones pueden coexistir varios clones independientes al diagnóstico, en lugar de uno solo, como demuestran los estudios de secuenciación *single-cell*.(187,223) En estos casos, la supresión del clon dominante por efecto del tratamiento daría lugar a la expansión del clon silente, probablemente un clon de hematopoyesis clonal. En al menos uno de los casos analizados, la mutación detectada en la recaída podría corresponder a un clon anterior independiente (p8), lo que sería un ejemplo de evolución en paralelo, aunque, como hemos dicho, no estamos en condiciones de poder demostrarlo con los datos de que disponemos. Estudios recientes han demostrado que existe una gran heterogeneidad clonal a nivel de la célula *stem*, de la que derivan subclones independientes de SMD y LMA con distinto perfil mutacional, de tal forma que la progresión leucémica no siempre se produce necesariamente por evolución a partir de un clon SMD, como sugiere el modelo tradicional, sino que puede ocurrir a partir de subclones independientes portadores de mutaciones de tipo LMA.(232)

Como hemos visto, la interpretación de los resultados de la NGS resulta compleja. Debemos tener en cuenta la existencia de variantes benignas, tanto del receptor como del donante (las primeras serían detectables antes del trasplante, pero las segundas no, pudiendo presentar una VAF <50% en casos con quimerismo mixto, lo que puede ser motivo de confusión con variantes patógenas), así como la existencia de alteraciones citogenéticas que pueden afectar a la VAF de un determinado gen, por aumento o disminución del número de copias del mismo. En general, el valor de la VAF se correlaciona aceptablemente bien con el tamaño del clon (la carga tumoral) y nos ayuda a deducir la secuencia de adquisición de las mutaciones, aunque para ello es importante disponer de información en varios momentos de la evolución de la enfermedad. En ocasiones, la VAF es tan baja, especialmente después de haber recibido tratamiento, que puede llegar a ser indetectable, de ahí la importancia de



## CAPÍTULO 3

emplear una técnica con la suficiente sensibilidad para realizar el seguimiento de mutaciones ya conocidas. También debe tenerse en cuenta que existen genes que pueden no estar incluidos en los paneles empleados en la detección de variantes.

El presente estudio cuenta con algunas limitaciones. En primer lugar, en la mayoría de los casos no disponemos del estado mutacional de los pacientes en el momento del diagnóstico. Salvo en un caso, en los pacientes en recaída no se realizó NGS en el día +100 o antes, de tal forma que no podemos determinar el impacto sobre la incidencia de recaída de la presencia o ausencia de mutaciones en el post trasplante inmediato. Otra limitación es que al no haber realizado NGS *single-cell*, no podemos afirmar con seguridad si existen casos de evolución en paralelo. Todos los ejemplos de evolución clonal que mostramos son, como hemos dicho, hipótesis probables; en cada caso hemos optado por la opción más razonable deducible a partir de los datos de que disponíamos, sin que por ello excluyamos otras alternativas posibles.

En resumen, podemos extraer algunas conclusiones relevantes del presente estudio. En primer lugar, que la evolución clonal de los SMD sometidos a TPH alogénico es un proceso complejo y dinámico. Que tanto el tratamiento de inducción como el propio trasplante influyen en el curso natural de la enfermedad, haciendo que desaparezcan unos subclones y emerjan otros; probablemente no todas las mutaciones exhiben la misma sensibilidad a los distintos tipos de tratamiento. Que la respuesta morfológica previa al trasplante no se correlaciona necesariamente con la respuesta molecular por NGS, y que ésta última parece tener un valor predictivo de recaída superior. Que las recaídas suelen producirse a partir de clones y subclones con mutaciones ya conocidas, pero a menudo aparecen mutaciones nuevas, que podían existir previamente con una VAF indetectable o haberse originado tras el trasplante. Que pueden detectarse mutaciones en el día +100 en pacientes con EMR negativa y quimerismo completo, lo que posee un innegable valor pronóstico. Por último, y como resumen de lo anterior, concluimos que la NGS es una técnica que debería ser empleada en todos los pacientes que vayan a ser sometidos a un trasplante alogénico al menos al diagnóstico, al trasplante si tienen mutaciones y han recibido tratamiento modificador, y en el post trasplante inmediato si tienen mutaciones al diagnóstico y/o pre trasplante, probablemente antes del día +100, con el objetivo de prevenir una recaída franca de la enfermedad favoreciendo el EICL o administrando un tratamiento citorrreductor. El panel de NGS empleado al diagnóstico debería ser lo suficientemente amplio y contener al menos los genes más frecuentemente mutados, y en estadios posteriores probablemente deberían secuenciarse las mutaciones conocidas con

## CAPÍTULO 3

estrategias que permitan una profundidad de cobertura mayor, y así poder evitar que pasen inadvertidas variantes con una VAF muy baja.

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. Los agentes estimulantes de la eritropoyesis son fármacos eficaces y seguros y mejoran el pronóstico de los pacientes con síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo y anemia sintomática.
2. Las mutaciones somáticas en pacientes con síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo tratados con agentes estimulantes de la eritropoyesis se asocian a menor supervivencia global y a mayor incidencia de transformación leucémica y podrían también ayudar a predecir la respuesta a dicho tratamiento.
3. Las mutaciones somáticas en pacientes con síndromes mielodisplásicos sometidos a trasplante alogénico se asocian a menor supervivencia global y a mayor incidencia de recaída. La enfermedad injerto contra receptor crónica puede atenuar el mal pronóstico de las mutaciones somáticas, por lo que en aquellos pacientes con un perfil mutacional desfavorable deberían maximizarse las medidas encaminadas a favorecer el efecto injerto-contra-leucemia y a prevenir la recaída.
4. El perfil mutacional de los pacientes con síndromes mielodisplásicos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es dinámico y cambia con los tratamientos recibidos. Una parte significativa de los pacientes “aclara” las mutaciones tras el trasplante y no recaen; los que recaen lo hacen normalmente con las mutaciones que tenían previamente, aunque muchos presentan mutaciones nuevas. Aun en pacientes que no recaen pueden detectarse mutaciones en el día +100, por lo que la NGS podría ser útil como técnica de enfermedad mínima residual tras el trasplante.
5. La respuesta morfológica previa al trasplante no se correlaciona necesariamente con la presencia o ausencia de mutaciones somáticas. Los pacientes mutados al trasplante, independientemente de la respuesta morfológica, recaen con más frecuencia que los no mutados. La NGS podría aportar información de gran valor en la evaluación de la situación de la enfermedad previa al trasplante.
6. Dadas las implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas de las mutaciones somáticas en los pacientes con síndromes mielodisplásicos sometidos a distintas modalidades de tratamiento, consideramos que debe seguir profundizándose en su conocimiento y que la NGS debería emplearse al menos en aquellos pacientes que sean candidatos a recibir un trasplante

## CONCLUSIONES

alogénico, tanto al diagnóstico, como en el pre trasplante y el post trasplante inmediato, con el fin de optimizar el manejo terapéutico y evitar la recaída.

## **BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editores. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4.<sup>a</sup> ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. Valent P, Horny H-P, 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. *Leukemia Research*. junio de 2007;31(6):727-36.
3. Rhoads CP. Refractory anemia: analysis of one hundred cases. *JAMA*. 12 de marzo de 1938;110(11):794.
4. Steensma DP. Good riddance to the term "refractory anemia" in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. diciembre de 2016;51:22-6.
5. Block M. Preleukemic Acute Human Leukemia. *JAMA*. 11 de julio de 1953;152(11):1018.
6. Koefler HP, Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia*. marzo de 2017;31(3):534-42.
7. Vilter RW, Jarrold T, Will JJ, Mueller JF, Friedman BI, Hawkins VR. Refractory anemia with bone marrow hyperplasia. *Blood*. enero de 1960;15(1):1-29.
8. Jenkins DE, Hartmann RC. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Terminating in Acute Myeloblastic Leukemia. *Blood*. febrero de 1969;33(2):274-82.
9. Holden D, Lichtman H. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria with Acute Leukemia. *Blood*. febrero de 1969;33(2):283-6.
10. Manganaro F. Aplastic anemia preceding acute myeloblastic (histiocytic) leukemia. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. agosto de 1960;6(173):1559-62.
11. Rheingold J, Kaufman R, Adelson E, Lear A. Smoldering acute leukemia. *New England Journal of Medicine*. abril de 1963;11(268):812-5.
12. Rowley J, Blaisdell R, Jacobson L. Chromosome studies in preleukemia. I. Aneuploidy of group C chromosomes in three patients. *Blood*. junio de 1966;27(6):782-99.
13. Fisher WB, Armentrout SA, Weisman R, Graham RC. «Preleukemia». A Myelodysplastic Syndrome Often Terminating in Acute Leukemia. *Arch Intern Med*. agosto de 1973;132(2):226-32.
14. Gilbert H, Dameshek W. The myeloproliferative disorders. *Disease-a-Month*. octubre de 1970;16(10):1-52.
15. Saarni I, Linman W. The Hematologic Syndrome Preceding Acute Leukemia. *The American Journal of Medicine*. 1973;55:38-48.
16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *British Journal of Haematology*. agosto de 1976;33(4):451-8.
17. Bennett JM, Catovskym D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 1982;51(2):189-99.
18. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and

## BIBLIOGRAFÍA

- Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *JCO*. diciembre de 1999;17(12):3835-49.
19. Knapp RH, Dewald GW, Pierre RV. Cytogenetic Studies in 174 Consecutive Patients With Preleukemic or Myelodysplastic Syndromes. *Mayo Clinic Proceedings*. agosto de 1985;60(8):507-16.
  20. Bowen D, Culligan D, Jowitt S, Kelsey S, Mufti G, Oscier D, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. enero de 2003;120(2):187-200.
  21. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
  22. Nowel P. The minute chromosome (Ph) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. abril de 1962;8:65-6.
  23. Hungerford D, Nowell P. Chromosome Studies in Human Leukemia. III. Acute Granulocytic Leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*. septiembre de 1962;29:545-65.
  24. Streuli R, Testa J, Vardiman J, Mintz U, Golomb H, Rowley J. Dysmyelopoietic syndrome: sequential clinical and cytogenetic studies. *Blood*. abril de 1980;55(4):636-44.
  25. Van den Berghe H, Cassiman J, David G, Fryns J, Michaux J, Sokal G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature*. octubre de 1974;251(5474):437-8.
  26. Nowell PC. Marrow chromosome studies in «preleukemia»: Further correlation with clinical course. *Arch Pathol*. 1965;80:205-8.
  27. Yunis J, Rydell R, Oken M, Arnesen M, Mayer M, Lobell M. Refined Chromosome Analysis as an Independent Prognostic Indicator in De Novo Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. junio de 1986;67(6):1721-30.
  28. Jacobs R, Cornbleet M, Vardiman J, Larson R. Prognostic Implications of Morphology and Karyotype in Primary Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. junio de 1986;67(6):1765-72.
  29. Sokal G, Michaux J, Van Den Berghe H, Cordier A, Rodhain J, Ferrant A, et al. A new hematologic syndrome with a distinct karyotype, the 5q- chromosome. *Blood*. octubre de 1975;46(4):519-33.
  30. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz G, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. septiembre de 2005;90(9):1168-78.
  31. 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*. 15 de diciembre de 2007;110(13):4385-95.
  32. 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. *JCO*. 10 de marzo de 2012;30(8):820-9.
  33. Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, et al. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia*. 1993;7(4):499-508.

## BIBLIOGRAFÍA

34. Mikhail FM, Heerema NA, Rao KW, Burnside RD, Cherry AM, Cooley LD. Section E6.1–6.4 of the ACMG technical standards and guidelines: chromosome studies of neoplastic blood and bone marrow–acquired chromosomal abnormalities. *Genet Med*. junio de 2016;18(6):635-42.
35. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 15 de marzo de 1997;89(6):2079-88.
36. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 20 de septiembre de 2012;120(12):2454-65.
37. Tefferi A, Vardiman J. Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*. noviembre de 2009;361(19):1872-85.
38. Sekeres MA. The Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. abril de 2010;24(2):287-94.
39. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, Starý J, Hasle H, Masetti R, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood*. 17 de marzo de 2016;127(11):1387-97.
40. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic Syndromes — Coping with Ineffective Hematopoiesis. *N Engl J Med*. 10 de febrero de 2005;352(6):536-8.
41. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD). Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. *Haematologica*. abril de 2012;97(Suplemento 5).
42. Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5.<sup>a</sup> ed. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia; 2006.
43. Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R, Schwarzingler I, Müllauer L, Sperr WR, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: The diagnostic interface. *Leukemia Research*. noviembre de 2007;31(11):1461-8.
44. Malcovati L, Gallì A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*. 22 de junio de 2017;129(25):3371-8.
45. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *JCO*. 10 de agosto de 2007;25(23):3503-10.
46. de Swart L, Smith A, Haase D, Fenaux P, Symeonidis A, Cermak J, et al. Prognostic impact of a suboptimal number of analyzed metaphases in normal karyotype lower-risk MDS. *Leukemia Research*. abril de 2018;67:21-6.
47. Fenaux P, Platzbecker U, Ades L. How we manage adults with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. junio de 2020;189(6):1016-27.
48. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical Relevance of Bone Marrow Fibrosis and CD34-Positive Cell Clusters in Primary Myelodysplastic Syndromes. *JCO*. 10 de febrero de 2009;27(5):754-62.
49. Shenoy N, Vallumsetla N, Rachmilewitz E, Verma A, Ginzburg Y. Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 7 de agosto de 2014;124(6):873-81.

## BIBLIOGRAFÍA

50. Tricot G, Boogaerts MA. The role of aggressive chemotherapy in the treatment of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. julio de 1986;63(3):477-83.
51. Armitage J, Dich F, Needleman S, Burns C. Effect of chemotherapy for the dysmyelopoietic syndrome. *Cancer Treat Rep*. 1981;65(7-8):601-5.
52. Witte TD, Zwaan F, Hermans J, Vernant J, Kolb H, Vossen J, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for secondary leukaemia and myelodysplastic syndrome: a survey by the Leukaemia Working Party of the European Bone Marrow Transplantation Group (EBMTG). *Br J Haematol*. febrero de 1990;74(2):151-5.
53. Tricot - 1992 - Complications and treatment of the myelodysplastic.pdf.
54. Negrin RS, Stein R, Vardiman J, Doherty K, Cornwell J, Krantz S, et al. Treatment of the Anemia of Myelodysplastic Syndromes Using Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Combination With Erythropoietin. :7.
55. 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. *The Lancet Oncology*. marzo de 2009;10(3):223-32.
56. Castelli R, Schiavon R, Rossi V, Deliliers GL. Management of anemia in low-risk myelodysplastic syndromes treated with erythropoiesis-stimulating agents newer and older agents. *Med Oncol*. mayo de 2018;35(5):76.
57. Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, Martinez I, Nomdedeu B, Pereira A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia: RBC IMMUNIZATION IN MDS/CMML. *Transfusion*. abril de 2013;53(4):710-5.
58. Angelucci E, Li J, Greenberg P, Wu D, Hou M, Montaña Figueroa E, et al. Iron Chelation in Transfusion-Dependent Patients With Low- to Intermediate-1–Risk Myelodysplastic Syndromes. *Ann Intern Med*. 2020;172(8):513-22.
59. Platzbecker U, Symeonidis A, Oliva EN, Goede JS, Delforge M, Mayer J, et al. A phase 3 randomized placebo-controlled trial of darbepoetin alfa in patients with anemia and lower-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. septiembre de 2017;31(9):1944-50.
60. Fenaux P, Santini V, Aloe Spiriti M, Giagounidis A, Schlag R, Radinoff A, et al. A phase 3 randomized, placebo-controlled study assessing the efficacy and safety of epoetin- $\alpha$  in anemic patients with low-risk MDS. *Leukemia*. marzo de 2018;32(12):2648-58.
61. Germing U, Oliva EN, Hiwase D, Almeida A. Treatment of Anemia in Transfusion-Dependent and Non-Transfusion-Dependent Lower-Risk MDS: Current and Emerging Strategies. *HemaSphere*. diciembre de 2019;3(6):e314.
62. Cheson BD. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 15 de julio de 2006;108(2):419-25.
63. Hellstrom-Lindberg E, Negrin R, Stein R, Krantz S, Lindberg G, Vardiman J, et al. Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *Br J Haematol*. noviembre de 1997;99(2):344-51.
64. Casadevall N. Health, economic, and quality-of-life effects of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of myelodysplastic syndromes: a randomized, controlled trial. *Blood*. 15 de julio de 2004;104(2):321-7.

## BIBLIOGRAFÍA

65. Jädersten M, Malcovati L, Dybedal I, Giovanni Della Porta M, Invernizzi R, Montgomery SM, et al. Erythropoietin and Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment Associated With Improved Survival in Myelodysplastic Syndrome. *JCO*. 20 de julio de 2008;26(21):3607-13.
66. Park S, Grabar S, Kelaidi C, Beyne-Rauzy O, Picard F, Bardet V, et al. Predictive factors of response and survival in myelodysplastic syndrome treated with erythropoietin and G-CSF: the GFM experience. *Blood*. 15 de enero de 2008;111(2):574-82.
67. Greenberg PL, Sun Z, Miller KB, Bennett JM, Tallman MS, Dewald G, et al. Treatment of myelodysplastic syndrome patients with erythropoietin with or without granulocyte colony-stimulating factor: results of a prospective randomized phase 3 trial by the Eastern Cooperative Oncology Group (E1996). *Blood*. 17 de septiembre de 2009;114(12):2393-400.
68. Musto P, Villani O, Martorelli MC, Pietrantuono G, Guariglia R, Mansueto G, et al. Response to recombinant erythropoietin alpha, without the adjunct of granulocyte-colony stimulating factor, is associated with a longer survival in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. agosto de 2010;34(8):981-5.
69. Buckstein R, Balleari E, Wells R, Santini V, Sanna A, Salvetti C, et al. ITACA: A new validated international erythropoietic stimulating agent-response score that further refines the predictive power of previous scoring systems: BUCKSTEIN et al. *Am J Hematol*. octubre de 2017;92(10):1037-46.
70. Messa E, Gioia D, Masiera E, Castiglione A, Ceccarelli M, Salvi F, et al. Effects of erythropoiesis-stimulating agents on overall survival of International Prognostic Scoring System Low/Intermediate-1 risk, transfusion-independent myelodysplastic syndrome patients: a cohort study. *Haematologica*. enero de 2019;104(1):e4-8.
71. Kelaidi C, Park S, Sapena R, Beyne-Rauzy O, Coiteux V, Vey N, et al. Long-term outcome of anemic lower-risk myelodysplastic syndromes without 5q deletion refractory to or relapsing after erythropoiesis-stimulating agents. *Leukemia*. junio de 2013;27(6):1283-90.
72. Park S, Fenaux P, Greenberg P, Mehta B, Callaghan F, Kim C, et al. Efficacy and safety of darbepoetin alpha in patients with myelodysplastic syndromes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*. septiembre de 2016;174(5):730-47.
73. Santini V, Schemenau J, Levis A, Balleari E, Sapena R, Adès L, et al. Can the revised IPSS predict response to erythropoietic-stimulating agents in patients with classical IPSS low or intermediate-1 MDS? *Blood*. 26 de septiembre de 2013;122(13):2286-8.
74. Houston BL, Jayakar J, Wells RA, Lenis M, Zhang L, Zhu N, et al. A predictive model of response to erythropoietin stimulating agents in myelodysplastic syndrome: from the Canadian MDS patient registry. *Ann Hematol*. diciembre de 2017;96(12):2025-9.
75. Park S, Kelaidi C, Meunier M, Casadevall N, Gerds AT, Platzbecker U. The prognostic value of serum erythropoietin in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: a review of the literature and expert opinion. *Ann Hematol*. enero de 2020;99(1):7-19.
76. Hellstrom-Lindberg E, Gulbrandsen N, Lindberg G, Ahlgren T, Dahl IMS, Dybedal I, et al. A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. *Br J Haematol*. marzo de 2003;120(6):1037-46.
77. Alan L, Gordon D, John B, Aristotle G, Azra R, Eric F, et al. Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *n engl j med*. 2006;10.

## BIBLIOGRAFÍA

78. Komrokji RS, List AF. Role of Lenalidomide in the Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *Seminars in Oncology*. octubre de 2011;38(5):648-57.
79. Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, Beyne-Rauzy O, Mufti G, Mittelman M, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*. 6 de octubre de 2011;118(14):3765-76.
80. Santini V, Almeida A, Giagounidis A, Gröpper S, Jonasova A, Vey N, et al. Randomized Phase III Study of Lenalidomide Versus Placebo in RBC Transfusion-Dependent Patients With Lower-Risk Non-del(5q) Myelodysplastic Syndromes and Ineligible for or Refractory to Erythropoiesis-Stimulating Agents. *JCO*. 1 de septiembre de 2016;34(25):2988-96.
81. Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, Garcia-Manero G, Buckstein R, Santini V, et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 9 de enero de 2020;382(2):140-51.
82. Vicente A, Patel BA, Gutierrez-Rodrigues F, Groarke E, Giudice V, Lotter J, et al. Eltrombopag monotherapy can improve hematopoiesis in patients with low to intermediate risk-1 myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 21 de mayo de 2020;haematol.2020.249995.
83. de Witte T, Bowen D, Robin M, Malcovati L, Niederwieser D, Yakoub-Agha I, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 30 de marzo de 2017;129(13):1753-62.
84. Baccarani M, Zaccaria A, Bandini G, Cavazzini G, Fanin R, Tura S. Low-dose arabinosyl cytosine for treatment of myelodysplastic syndromes and subacute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 1983;7:539-45.
85. Cheson BD. Standard and low-dose chemotherapy for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. mayo de 1998;22:S17-21.
86. Hiddemann W, Jahns-Streubel G, Verbeek W, Wörmann B, Haase D, Schoch C. Intensive therapy for high-risk myelodysplastic syndromes and the biological significance of karyotype abnormalities. *Leukemia Research*. mayo de 1998;22:S23-6.
87. Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Turlure P, et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood*. 13 de enero de 2011;117(2):403-11.
88. Scott LJ. Azacitidine: A Review in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukaemia. *Drugs*. mayo de 2016;76(8):889-900.
89. Prebet T, Fenaux P, Vey N, on behalf of the Groupe Francophone des Myelodysplasies. Predicting outcome of patients with myelodysplastic syndromes after failure of azacitidine: validation of the North American MDS consortium scoring system. *Haematologica*. 1 de octubre de 2016;101(10):e427-8.
90. Lim Z, Brand R, Martino R, van Biezen A, Finke J, Bacigalupo A, et al. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Patients 50 Years or Older With Myelodysplastic Syndromes or Secondary Acute Myeloid Leukemia. *JCO*. 20 de enero de 2010;28(3):405-11.
91. Deeg HJ, Shulman HM, Anderson JE, Bryant EM, Gooley TA, Slattery JT, et al. Allogeneic and syngeneic marrow transplantation for myelodysplastic syndrome in patients 55 to 66 years of age. *Blood*. 15 de febrero de 2000;95(4):1188-94.

## BIBLIOGRAFÍA

92. Sierra J, Bredeson CN, Marks DI, Canals C, Boogaerts MA, Goldman J, et al. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia. *2002;100(6):9*.
93. Festuccia M, Baker K, Gooley TA, Sandmaier BM, Deeg HJ, Scott BL. Hematopoietic Cell Transplantation in Myelodysplastic Syndromes after Treatment with Hypomethylating Agents. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. septiembre de 2017;23(9):1509-14.
94. Koreth J, Pidala J, Perez WS, Deeg HJ, Garcia-Manero G, Malcovati L, et al. Role of Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Older Patients With De Novo Myelodysplastic Syndromes: An International Collaborative Decision Analysis. *JCO*. 20 de julio de 2013;31(21):2662-70.
95. Tricot GJ. Complications and treatment of the myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. enero de 1992;16(1):117-21.
96. Damaj G, Duhamel A, Robin M, Beguin Y, Michallet M, Mohty M, et al. Impact of Azacitidine Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: A Study by the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myélodysplasies. *JCO*. 20 de diciembre de 2012;30(36):4533-40.
97. Alessandrino EP, Della Porta MG, Pascutto C, Bacigalupo A, Rambaldi A. Should Cytoreductive Treatment Be Performed Before Transplantation in Patients With High-Risk Myelodysplastic Syndrome? *JCO*. 20 de julio de 2013;31(21):2761-2.
98. Murakami K, Ueno H, Okabe T, Kagoo T, Boku S, Yano T, et al. Bridging-to-transplant with azacitidine for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia, reduces the incidence of acute graft-versus-host disease. *Hematol Rep*. 15 de junio de 2017;9(2).
99. Gerds AT, Gooley TA, Estey EH, Appelbaum FR, Deeg HJ, Scott BL. Pretransplantation Therapy with Azacitidine vs Induction Chemotherapy and Posttransplantation Outcome in Patients with MDS. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. agosto de 2012;18(8):1211-8.
100. Schroeder T, Wegener N, Lauseker M, Rautenberg C, Nachtkamp K, Schuler E, et al. Comparison between Upfront Transplantation and different Pretransplant Cytoreductive Treatment Approaches in Patients with High-Risk Myelodysplastic Syndrome and Secondary Acute Myelogenous Leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. agosto de 2019;25(8):1550-9.
101. Weisdorf D, Zhang M-J, Arora M, Horowitz MM, Rizzo JD, Eapen M. Graft-versus-Host Disease Induced Graft-versus-Leukemia Effect: Greater Impact on Relapse and Disease-Free Survival after Reduced Intensity Conditioning. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. noviembre de 2012;18(11):1727-33.
102. Cho B-S, Kim Y-J, Cho S-G, Kim S-Y, Eom K-S, Kim H-J, et al. The Beneficial Effect of Chronic Graft-versus-Host Disease on the Clinical Outcome of Transplantation with Fludarabine/Busulfan-Based Reduced-Intensity Conditioning for Patients with De Novo Myelodysplastic Syndrome. *International Journal of Hematology*. 1 de junio de 2007;85(5):446-55.
103. Valcárcel D, Martino R, Caballero D, Martín J, Ferrá C, Nieto JB, et al. Sustained Remissions of High-Risk Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome After Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Transplantation: Chronic Graft-Versus-Host Disease Is the Strongest Factor Improving Survival. *JCO*. 1 de febrero de 2008;26(4):577-84.
104. Martino R, Caballero MD, Pérez Simón JA, Canals C, Solano C, Urbano-Ispizua A, et al. Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell

## BIBLIOGRAFÍA

- transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 15 de septiembre de 2002;100(6):2243-5.
105. Platzbecker U, Wermke M, Radke J, Oelschlaegel U, Seltmann F, Kiani A, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. marzo de 2012;26(3):381-9.
  106. Craddock C, Jilani N, Siddique S, Yap C, Khan J, Nagra S, et al. Tolerability and Clinical Activity of Post-Transplantation Azacitidine in Patients Allografted for Acute Myeloid Leukemia Treated on the RICAZA Trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. febrero de 2016;22(2):385-90.
  107. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*. 12 de diciembre de 2013;122(25):4021-34.
  108. Pon JR, Marra MA. Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 24 de enero de 2015;10(1):25-50.
  109. Jarvie T. Next generation sequencing technologies. *Drug Discovery Today: Technologies*. septiembre de 2005;2(3):255-60.
  110. Spaulding TP, Stockton SS, Savona MR. The evolving role of next generation sequencing in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. enero de 2020;188(2):224-39.
  111. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD). Guía de aplicación clínica de la secuenciación masiva en Síndromes mielodisplásicos y Leucemia mielomonocítica crónica. 2017.
  112. Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, Hagiwara K, Maru Y, Omine M, et al. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature*. 327(6121):430-2.
  113. Lyons J, Janssen J, Bartram C, Layton M, Mufti G. Mutation of Ki-ras and N-ras oncogenes in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 71(6):1707-12.
  114. Sugimoto K, Hirano N, Toyoshima H, Chiba S, Mano H, Takaku F, et al. Mutations of the p53 Gene in Myelodysplastic Syndrome (MDS) and MDS-Derived Leukemia. *Blood*. enero de 1993;81(11):3022-6.
  115. Jonveaux P, Fenaux P, Quiquandon I, Pignon J, Laï J, Loucheux-Lefebvre M, et al. Mutations in the p53 gene in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 6(12):2243-7.
  116. 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*. abril de 1995;85(8):2189-93.
  117. Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1 de junio de 2014;99(6):956-64.
  118. 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*. febrero de 2014;28(2):241-7.
  119. 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*. 21 de noviembre de 2013;122(22):3616-27.
  120. Walter MJ, Shen D, Shao J, Ding L, White BS, Kandoth C, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. junio de 2013;27(6):1275-82.



## BIBLIOGRAFÍA

121. 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*. 28 de agosto de 2014;124(9):1513-21.
122. Cargo CA, Rowbotham N, Evans PA, Barrans SL, Bowen DT, Crouch S, et al. Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression. *Blood*. 19 de noviembre de 2015;126(21):2362-5.
123. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *JCO*. 20 de marzo de 2017;35(9):968-74.
124. Montalban-Bravo G, Takahashi K, Patel K, Wang F, Xingzhi S, Noguerras 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*. 9 de febrero de 2018;9(11):9714-27.
125. Xu S, Luk K, Yao Q, Shen A, Zeng J, Wu Y, et al. Editing aberrant splice sites efficiently restores b-globin expression in b-thalassemia. *Blood*. enero de 2019;133(21):2255-62.
126. Larsson CA, Cote G, Quintás-Cardama A. The Changing Mutational Landscape of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Mol Cancer Res*. agosto de 2013;11(8):815-27.
127. Lindsley RC, Ebert BL. Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 24 de enero de 2013;8(1):21-47.
128. 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*. 5 de abril de 2012;119(14):3203-10.
129. Pellagatti A, Armstrong RN, Steeples V, Sharma E, Repapi E, Singh S, et al. Impact of spliceosome mutations on RNA splicing in myelodysplasia: dysregulated genes/pathways and clinical associations. *Blood*. 20 de septiembre de 2018;132(12):1225-40.
130. Pellagatti A, Boulwood J. Splicing factor mutant myelodysplastic syndromes: Recent advances. *Advances in Biological Regulation*. enero de 2020;75:100655.
131. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic *SF3B1* Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med*. 13 de octubre de 2011;365(15):1384-95.
132. 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*. 9 de julio de 2015;126(2):233-41.
133. 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. *JCO*. 20 de septiembre de 2012;30(27):3376-82.
134. Lin C-C, Hou H-A, Chou W-C, Kuo Y-Y, Wu S-J, Liu C-Y, et al. *SF3B1* mutations in patients with myelodysplastic syndromes: The mutation is stable during disease evolution: *SF3B1* Mutations in MDS. *Am J Hematol*. agosto de 2014;89(8):E109-15.
135. 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*. 12 de enero de 2012;119(2):569-72.
136. Mian SA, Smith AE, Kulasekararaj AG, Kizilers A, Mohamedali AM, Lea NC, et al. Spliceosome mutations exhibit specific associations with epigenetic modifiers and proto-

## BIBLIOGRAFÍA

- oncogenes mutated in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 1 de julio de 2013;98(7):1058-66.
137. Nazha A, Narkhede M, Radivoyevitch T, Seastone DJ, Patel BJ, Gerds AT, et al. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. noviembre de 2016;30(11):2214-20.
  138. Wu S-J, Kuo Y-Y, Hou H-A, Li L-Y, Tseng M-H, Huang C-F, et al. The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. *Blood*. 11 de octubre de 2012;120(15):3106-11.
  139. Zheng X, Zhan Z, Naren D, Li J, Yan T, Gong Y. Prognostic value of SRSF2 mutations in patients with de novo myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. Hills RK, editor. *PLoS ONE*. 27 de septiembre de 2017;12(9):e0185053.
  140. Thol F, Kade S, Schlarman C. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. 2012;119(15):7.
  141. Wang H, Zhang N, Wu X, Zheng X, Ling Y, Gong Y. Prognostic value of U2AF1 mutant in patients with de novo myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Ann Hematol*. diciembre de 2019;98(12):2629-39.
  142. Esteller M (editor). *Epigenética e hipermetilación*. Editores médicos S.A.; 2011.
  143. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med*. 20 de noviembre de 2003;349(21):2042-54.
  144. Jones PA. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*. 10 de agosto de 2001;293(5532):1068-70.
  145. 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. 2009;113(6):12.
  146. 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*. 30 de junio de 2011;364(26):2496-506.
  147. 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*. julio de 2011;25(7):1147-52.
  148. Lin T-L, Nagata Y, Kao H-W, Sanada M, Okuno Y, Huang C-F, et al. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations. *Haematologica*. 1 de enero de 2014;99(1):28-36.
  149. 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*. 11 de noviembre de 2010;116(19):3923-32.
  150. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 8 de octubre de 2009;114(15):3285-91.
  151. 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. *JCO*. 1 de septiembre de 2014;32(25):2691-8.

## BIBLIOGRAFÍA

152. Kim M, Yahng S-A, Kwon A, Park J, Jeon Y-W, Yoon J-H, et al. Mutation in TET2 or TP53 predicts poor survival in patients with myelodysplastic syndrome receiving hypomethylating treatment or stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* agosto de 2015;50(8):1132-4.
153. Goel S, Hall J, Pradhan K, Hirsch C, Przychodzen B, Shastri A, et al. High prevalence and allele burden-independent prognostic importance of p53 mutations in an inner-city MDS/AML cohort. *Leukemia.* agosto de 2016;30(8):1793-5.
154. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* julio de 2011;25(7):1153-8.
155. Visconte V, Tiu RV, Rogers HJ. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res.* 2014;49(4):216.
156. Kosmider O, Passet M, Santini V, Platzbecker U, Andrieu V, Zini G, et al. Are somatic mutations predictive of response to erythropoiesis stimulating agents in lower risk myelodysplastic syndromes? *Haematologica.* 1 de julio de 2016;101(7):e280-3.
157. Jin J, Hu C, Yu M, Chen F, Ye L, Yin X, et al. Prognostic Value of Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Myelodysplastic Syndromes: A Retrospective Cohort Study and Meta-Analysis. Zuo Z, editor. *PLoS ONE.* 17 de junio de 2014;9(6):e100206.
158. Lin C-C, Hou H-A, Chou W-C, Kuo Y-Y, Liu C-Y, Chen C-Y, et al. *IDH* mutations are closely associated with mutations of *DNMT3A*, *ASXL1* and *SRSF2* in patients with myelodysplastic syndromes and are stable during disease evolution: IDH mutation in MDS. *Am J Hematol.* febrero de 2014;89(2):137-44.
159. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica.* 1 de octubre de 2010;95(10):1668-74.
160. Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, et al. Prognostic Significance of *ASXL1* Mutations in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *JCO.* 20 de junio de 2011;29(18):2499-506.
161. Tobiasson M, McLornan DP, Karimi M, Dimitriou M, Jansson M, Azenkoud AB, et al. Mutations in histone modulators are associated with prolonged survival during azacitidine therapy. :13.
162. Thota S, Viny AD, Makishima H, Spitzer B, Radivoyevitch T, Przychodzen B, et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood.* 11 de septiembre de 2014;124(11):1790-8.
163. Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, Wendland N, Weiss T, Kern W, et al. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia.* agosto de 2010;24(8):1528-32.
164. Elena C, Galli A, Such E, Meggendorfer M, Germing U, Rizzo E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 8 de septiembre de 2016;128(10):1408-17.
165. Hou H-A, Kuo Y-Y, Tang J-L, Chou W-C, Yao M, Lai Y-J, et al. Clinical implications of the *SETBP1* mutation in patients with primary myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression: Clinical implications of the *SETBP1* mutation in patients. *Am J Hematol.* febrero de 2014;89(2):181-6.

## BIBLIOGRAFÍA

166. Jiang L, Luo Y, Zhu S, Wang L, Ma L, Zhang H, et al. Mutation status and burden can improve prognostic prediction of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci.* febrero de 2020;111(2):580-91.
167. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. *TP53* Mutations in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes With del(5q) Predict Disease Progression. *JCO.* 20 de mayo de 2011;29(15):1971-9.
168. Gerstung M, Pellagatti A, Malcovati L, Giagounidis A, Porta MGD, Jädersten M, et al. Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun.* mayo de 2015;6(1):5901.
169. Montalban-Bravo G, Kanagal-Shamanna R, Benton CB, Class CA, Chien KS, Sasaki K, et al. Genomic context and TP53 allele frequency define clinical outcomes in TP53-mutated myelodysplastic syndromes. *Blood Advances.* 11 de febrero de 2020;4(3):482-95.
170. Al-Issa K, Sekeres M, Nielsen A, Jha B, Przychodzen B, Aly M, et al. TP53 mutations and outcome in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood.* 2016;128(22):4336.
171. Belickova M, Vesela J, Jonasova A, Pejsova B, Votavova H, Merkerova MD, et al. *TP53* mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget.* 14 de junio de 2016;7(24):36266-79.
172. Sallman DA, Komrokji R, Vaupel C, Cluzeau T, Geyer SM, McGraw KL, et al. Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* marzo de 2016;30(3):666-73.
173. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, Devlin SM, Tuechler H, Medina-Martinez JS, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med [Internet].* 3 de agosto de 2020 [citado 6 de septiembre de 2020]; Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-1008-z>
174. Della Porta MG, Gallì A, Bacigalupo A, Zibellini S, Bernardi M, Rizzo E, et al. Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *JCO.* 20 de octubre de 2016;34(30):3627-37.
175. Gangat N, Mudireddy M, Lasho TL, Finke CM, Nicolosi M, Szuber N, et al. Mutations and prognosis in myelodysplastic syndromes: karyotype-adjusted analysis of targeted sequencing in 300 consecutive cases and development of a genetic risk model. *Am J Hematol.* mayo de 2018;93(5):691-7.
176. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2 de julio de 2015;126(1):9-16.
177. Champion KM, Gilbert JGR, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology.* junio de 1997;97(4):920-6.
178. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood.* 15 de mayo de 2005;105(10):3848-54.
179. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med.* 25 de diciembre de 2014;371(26):2488-98.

## BIBLIOGRAFÍA

180. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 25 de diciembre de 2014;371(26):2477-87.
181. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood.* 10 de agosto de 2017;130(6):742-52.
182. Kwok B, Hall JM, Witte JS, Xu Y, Reddy P, Lin K, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood.* 19 de noviembre de 2015;126(21):2355-61.
183. Zheng G, Chen P, Pallavajjala A, Haley L, Gondek L, Dezern A, et al. The diagnostic utility of targeted gene panel sequencing in discriminating etiologies of cytopenia. *Am J Hematol.* octubre de 2019;94(10):1141-8.
184. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1 de octubre de 1976;194(4260):23-8.
185. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med.* 2 de julio de 2015;373(1):35-47.
186. Kulasekararaj AG, Jiang J, Smith AE, Mohamedali AM, Mian S, Gandhi S, et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood.* 23 de octubre de 2014;124(17):2698-704.
187. Mossner M, Jann J-C, Wittig J, Nolte F, Fey S, Nowak V, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood.* 1 de septiembre de 2016;128(9):1246-59.
188. Bejar R, Abdel-Wahab O. The importance of subclonal genetic events in MDS. *Blood.* 21 de noviembre de 2013;122(22):3550-1.
189. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 12 de febrero de 2015;372(7):601-12.
190. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood.* 26 de febrero de 2015;125(9):1367-76.
191. Pellagatti A, Roy S, Di Genua C, Burns A, McGraw K, Valletta S, et al. Targeted resequencing analysis of 31 genes commonly mutated in myeloid disorders in serial samples from myelodysplastic syndrome patients showing disease progression. *Leukemia.* enero de 2016;30(1):248-50.
192. 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.* septiembre de 2018;182(6):830-42.
193. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* febrero de 2017;49(2):204-12.
194. Janssen J, Buschle M, Layton M, Drexler H, Lyons J, Van Den Berghe H, et al. Clonal Analysis of Myelodysplastic Syndromes: Evidence of Multipotent Stem Cell Origin. *Blood.* 1989;73(1):248-54.

## BIBLIOGRAFÍA

195. Mossner M, Jann J-C, Nowak D, Platzbecker U, Giagounidis A, Götze K, et al. Prevalence, clonal dynamics and clinical impact of TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome with isolated deletion (5q) treated with lenalidomide: results from a prospective multicenter study of the german MDS study group (GMDS). *Leukemia*. septiembre de 2016;30(9):1956-9.
196. Chesnais V, Renneville A, Toma A, Lambert J, Passet M, Dumont F, et al. Effect of lenalidomide treatment on clonal architecture of myelodysplastic syndromes without 5q deletion. *Blood*. 11 de febrero de 2016;127(6):749-60.
197. 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*. 23 de octubre de 2014;124(17):2705-12.
198. Du M, Zhou F, Jin R, Hu Y, Mei H. Mutations in the DNA methylation pathway predict clinical efficacy to hypomethylating agents in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Leukemia Research*. mayo de 2019;80:11-8.
199. Traina F, Visconte V, Elson P, Tabaroki A, Jankowska AM, Hasrouni E, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia*. enero de 2014;28(1):78-87.
200. Martín I, Navarro B, Serrano A, Villamón E, Calabuig M, Solano C, et al. Impact of clinical features, cytogenetics, genetic mutations, and methylation dynamics of CDKN2B and DLC-1 promoters on treatment response to azacitidine. *Ann Hematol*. marzo de 2020;99(3):527-37.
201. 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*. 22 de marzo de 2016;7(12):14172-87.
202. Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O'Laughlin M, Fulton RS, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 24 de noviembre de 2016;375(21):2023-36.
203. Kuendgen A, Müller-Thomas C, Lauseker M, Haferlach T, Urbaniak P, Schroeder T, et al. Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics - an analysis of 128 patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature. *Oncotarget*. 12 de junio de 2018;9(45):27882-94.
204. Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, Shiozawa Y, Iijima-Yamashita Y, Yoshida K, et al. Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood*. 27 de abril de 2017;129(17):2347-58.
205. Kharfan-Dabaja MA, Komrokji RS, Zhang Q, Kumar A, Tsalatsanis A, Perkins J, et al. TP53 and IDH2 Somatic Mutations Are Associated With Inferior Overall Survival After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndrome. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. noviembre de 2017;17(11):753-8.
206. Lindsley RC, Saber W, Mar BG, Redd R, Wang T, Haagenson MD, et al. Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 9 de febrero de 2017;376(6):536-47.
207. Heuser M, Gabdoulline R, Löffeld P, Dobbernack V, Kreimeyer H, Pankratz M, et al. Individual outcome prediction for myelodysplastic syndrome (MDS) and secondary acute myeloid leukemia from MDS after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol*. agosto de 2017;96(8):1361-72.

## BIBLIOGRAFÍA

208. Kim Y-J, Jung S-H, Hur E-H, Choi E-J, Lee K-H, Yim S-H, et al. TP53 mutation in allogeneic hematopoietic cell transplantation for de novo myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*. noviembre de 2018;74:97-104.
209. Fu Y, Schroeder T, Zabelina T, Badbaran A, Bacher U, Kobbe G, et al. Postallogeneic monitoring with molecular markers detected by pretransplant next-generation or Sanger sequencing predicts clinical relapse in patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*. marzo de 2014;92(3):189-94.
210. Duncavage EJ, Jacoby MA, Chang GS, Miller CA, Edwin N, Shao J, et al. Mutation Clearance after Transplantation for Myelodysplastic Syndrome. *N Engl J Med*. 13 de septiembre de 2018;379(11):1028-41.
211. Klco JM, Miller CA, Griffith M, Petti A, Spencer DH, Ketkar-Kulkarni S, et al. Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA*. 25 de agosto de 2015;314(8):811.
212. Jacoby MA, Duncavage EJ, Chang GS, Miller CA, Shao J, Elliott K, et al. Subclones dominate at MDS progression following allogeneic hematopoietic cell transplant. *JCI Insight*. 8 de marzo de 2018;3(5):e98962.
213. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*. noviembre de 2016;30(11):2160-8.
214. Fenaux - A phase 3 randomized, placebo-controlled study assessing the efficacy and safety of epoetin- $\alpha$  in anemic patients with low-risk MDS.pdf.
215. Di Giacomo D, Lema Fernandez AG, Pierini T, Crescenzi B, Brandimarte L, Matteucci C, et al. The GNAS1 gene in myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia Research*. julio de 2014;38(7):804-7.
216. Martín-Izquierdo M, Abáigar M, Hernández-Sánchez JM, Tamborero D, López-Cadenas F, Ramos F, et al. Co-occurrence of cohesin complex and Ras signaling mutations during progression from myelodysplastic syndromes to secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 16 de julio de 2020;haematol.2020.248807.
217. Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, Maciejewski JP, Nazha A, Sekeres MA, et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia*. julio de 2019;33(7):1747-58.
218. Blum W, Bolwell BJ, Phillips G, Farag SS, Lin TS, Avalos BR, et al. High Disease Burden Is Associated with Poor Outcomes for Patients with Acute Myeloid Leukemia Not in Remission Who Undergo Unrelated Donor Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. enero de 2006;12(1):61-7.
219. Buckley SA, Wood BL, Othus M, Hourigan CS, Ustun C, Linden MA, et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Haematologica*. mayo de 2017;102(5):865-73.
220. Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With *NPM1* Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *JCO*. 10 de enero de 2017;35(2):185-93.
221. Zhao X, Wang Z, Ruan G, Liu Y, Wang Y, Zhang X, et al. Impact of pre-transplantation minimal residual disease determined by multiparameter flow cytometry on the outcome of AML patients with FLT3-ITD after allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. junio de 2018;97(6):967-75.

## BIBLIOGRAFÍA

222. Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, Klement P, Schiller J, Kandziora C, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. *Blood*. 18 de octubre de 2018;132(16):1703-13.
223. da Silva-Coelho P, Kroeze LI, Yoshida K, Koorenhof-Scheele TN, Knops R, van de Locht LT, et al. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. abril de 2017;8(1):15099.
224. Calleja A, Yun S, Moreilhon C, Karsenti JM, Gastaud L, Mannone L, et al. Clonal selection in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia under azacitidine treatment. *Eur J Haematol*. mayo de 2020;104(5):488-98.
225. Uy GL, Duncavage EJ, Chang GS, Jacoby MA, Miller CA, Shao J, et al. Dynamic changes in the clonal structure of MDS and AML in response to epigenetic therapy. *Leukemia*. abril de 2017;31(4):872-81.
226. Onecha E, Rapado I, Morales ML, Carreño-Tarragona G, Martínez-Sánchez P, Gutiérrez X, et al. Monitoring of clonal evolution of acute myeloid leukemia identifies the leukemia subtype, clinical outcome and potential new drug targets for post-remission strategies or relapse. *Haematologica*. 30 de julio de 2020;haematol.2020.254623.
227. Martignoles J-A, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease. *IJMS*. 3 de diciembre de 2018;19(12):3850.
228. Shapiro RM, Kim DDH. Next-generation sequencing-based minimal residual disease monitoring in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome: Current Opinion in Hematology. *noviembre de 2018;25(6):425-32*.
229. Press RD, Eickelberg G, Froman A, Yang F, Stentz A, Flatley EM, et al. Next-generation sequencing-defined minimal residual disease before stem cell transplantation predicts acute myeloid leukemia relapse. *Am J Hematol*. agosto de 2019;94(8):902-12.
230. Balagopal V, Hantel A, Kadri S, Steinhardt G, Zhen CJ, Kang W, et al. Measurable residual disease monitoring for patients with acute myeloid leukemia following hematopoietic cell transplantation using error corrected hybrid capture next generation sequencing. Navarro A, editor. *PLoS ONE*. 28 de octubre de 2019;14(10):e0224097.
231. Lee J-M, Kim Y-J, Park S-S, Han E, Kim M, Kim Y. Simultaneous Monitoring of Mutation and Chimerism Using Next-Generation Sequencing in Myelodysplastic Syndrome. *JCM*. 28 de noviembre de 2019;8(12):2077.
232. Chen J, Kao Y-R, Sun D, Todorova TI, Reynolds D, Narayanagari S-R, et al. Myelodysplastic syndrome progression to acute myeloid leukemia at the stem cell level. *Nat Med*. enero de 2019;25(1):103-10.



# **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEBP2</b>	AE Binding Protein 2
<b>AEE</b>	Agentes estimulantes de la eritropoyesis
<b>EP300</b>	E1A binding protein p300
<b>AR</b>	Anemia refractaria
<b>AREB</b>	Anemia refractaria con exceso de blastos
<b>AREB-T</b>	Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARSA</b>	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo
<b>ASXL1</b>	ASXL transcriptional regulator 1
<b>BCOR</b>	BCL6 corepressor
<b>BCORL</b>	BCL6 corepressor like 1
<b>CALR</b>	Calreticulin
<b>CBL</b>	CBL proto-oncogene
<b>CCUS</b>	Citopenia Clonal de Significado Incierto
<b>CDH23</b>	Cadherin related 23
<b>CFU</b>	Colonias formadoras de granulocitos
<b>CPSS</b>	Sistema de puntuación pronóstica para la leucemia mieloide crónica
<b>CRDM</b>	Citopenia refractaria con displasia multilínea
<b>CSFR3</b>	Colony stimulating factor 3 receptor
<b>CSNK1A1</b>	Casein Kinase 1 Alpha 1
<b>CUX1</b>	Cut like homeobox 1
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferasa
<b>DNMT3A</b>	DNA Methyltransferase 3 Alpha
<b>EA</b>	Enfermedad activa sin tratamiento
<b>EE</b>	Enfermedad estable
<b>EED</b>	Embryonic ectoderm development

## ABREVIATURAS

<b>EICL</b>	Enfermedad injerto contra leucemia
<b>EICR</b>	Enfermedad injerto contra receptor
<b>EICRc</b>	Enfermedad injerto contra receptor crónica
<b>EMA</b>	Agencia europea del medicamento
<b>EMR</b>	Enfermedad mínima residual
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>ETV6</b>	ETS variant 6
<b>EZH2</b>	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
<b>FAB:</b>	Grupo cooperativo Franco-Américo-Británico
<b>FISH:</b>	Hibridación in situ fluorescente
<b>FLT3:</b>	Fms related tyrosine kinase 3
<b>GATA1:</b>	GATA binding protein 1
<b>GATA2:</b>	GATA binding protein 2
<b>GNAS</b>	GNAS complex locus
<b>GNB1</b>	G protein subunit beta 1
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias granulocíticas
<b>GESMD</b>	Grupo español de síndromes mielodisplásicos
<b>GMSI</b>	Gammapatía monoclonal de significado incierto
<b>HPN</b>	Hemoglobinuria paroxística nocturna
<b>IA</b>	Incidencia acumulada
<b>IAR</b>	Incidencia acumulada de recaída
<b>ICUS</b>	Citopenia idiopática de pronóstico indeterminado
<b>IDH</b>	Isocitrato deshidrogenasa
<b>ILD</b>	Infusión de linfocitos del donante
<b>IPSS</b>	Sistema de puntuación pronóstica internacional
<b>IPSS-R</b>	Sistema de puntuación pronóstica internacional revisado
<b>IWG</b>	International working group
<b>JAK2</b>	Janus kinase 2

## ABREVIATURAS

<b><i>KIT</i></b>	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
<b><i>KMT2A</i></b>	Lysine Methyltransferase 2A
<b><i>LBM</i></b>	Linfocitosis B monoclonal
<b><i>LMA</i></b>	Leucemia aguda mieloblástica
<b><i>LMA-s</i></b>	Leucemia aguda mieloblástica secundaria a síndrome mielodisplásico
<b><i>LMC</i></b>	Leucemia mieloide crónica
<b><i>LMMC</i></b>	Leucemia mielomonocítica crónica
<b><i>LNC</i></b>	Leucemia neutrofílica crónica
<b><i>MECOM</i></b>	MDS1 and EVI1 complex locus
<b><i>MTOR</i></b>	Mechanistic target of rapamycin kinase
<b><i>NGS</i></b>	Secuenciación de última generación o secuenciación masiva
<b><i>NOTCH1</i></b>	Notch homolog 1
<b><i>NPM1</i></b>	Nucleophosmin 1
<b><i>NUP98</i></b>	Nucleoporin 98 and 96 precursor
<b><i>OMS</i></b>	Organización mundial de la salud
<b><i>PIGA</i></b>	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A
<b><i>PHF6</i></b>	PHD finger protein 6
<b><i>PTPN11</i></b>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
<b><i>RAD21</i></b>	RAD21 cohesin complex component
<b><i>RE</i></b>	Respuesta eritroide
<b><i>RESMD</i></b>	Registro español de síndromes mielodisplásicos
<b><i>RUNX1</i></b>	RUNX family transcription factor 1
<b><i>SETBP1</i></b>	SET binding protein 1
<b><i>SF3B1</i></b>	Splicing Factor 3b Subunit 1
<b><i>SG</i></b>	Supervivencia global
<b><i>SH2B3</i></b>	SH2B adapter protein 3
<b><i>SLP</i></b>	Supervivencia libre de progresión

## ABREVIATURAS

<b>SMC3</b>	Structural maintenance of chromosomes 3
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SMD-DU</b>	Síndrome mielodisplásico con displasia unilínea
<b>SMD-DM</b>	Síndrome mielodisplásico con displasia multilínea
<b>SMD-EB</b>	Síndrome mielodisplásico con exceso de blastos
<b>SMD-SA</b>	Síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido único
<b>snRNP</b>	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
<b>SPRESAS</b>	Spanish registry of erythropoietic stimulating agents study
<b>SRSF2</b>	Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2
<b>STAG2</b>	Stromal antigen 2
<b>SUZ12</b>	SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
<b>TET2</b>	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
<b>TGF-beta</b>	Transforming grow factor-beta
<b>TP53</b>	Tumor protein p53
<b>TPH</b>	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
<b>U2AF1</b>	U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1
<b>VAF</b>	Frecuencia de variante alélica
<b>VPN</b>	Valor predictivo negativo
<b>VPP</b>	Valor predictivo positivo
<b>WPSS</b>	Sistema de puntuación pronóstica basado en la clasificación OMS
<b>ZRSR2</b>	Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2

## **LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS**





## TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

**Tabla I.** Criterios diagnósticos de SMD

**Tabla II.** IPSS

**Tabla III.** IPSS-R

**Tabla 1.1:** Panel de genes empleado en el estudio

**Tabla 1.2:** Características de los pacientes del estudio SPRESAS

**Tabla 1.3.** Análisis de la respuesta eritroide: univariante y multivariante (estudio SPRESAS)

**Tabla 1.4.** Análisis de la supervivencia global: univariante y multivariante (estudio SPRESAS)

**Tabla 1.5:** Características de los pacientes del estudio de mutaciones

**Tabla 1.6.** Análisis de la supervivencia global: univariante y multivariante (estudio de mutaciones)

**Tabla 2.1:** Paneles de genes empleados en el estudio

**Tabla 2.2:** Características clínicas de los pacientes y datos del trasplante

**Tabla 2.3:** Supervivencia global: análisis univariante y multivariante

**Tabla 2.4:** Pacientes con mutaciones de *TP53*

**Tabla 3.1:** Características de los pacientes incluidos en el estudio

**Tabla 3.2:** Perfil mutacional de los pacientes que recaen, antes del trasplante y en el momento de la recaída

## TABLAS Y FIGURAS

### FIGURAS

**Figura 1.1.** Supervivencia global según el manejo: AEE vs. soporte (estudio SPRESAS)

**Figura 1.2:** Supervivencia global desde la pérdida de respuesta eritroide en respondedores <12 meses y respondedores de >12 meses

**Figura 1.3:** Pacientes con SMD tratados con AEE: mutaciones somáticas y citogenética

**Figura 1.4.** Respuesta eritroide según el número de genes mutados

**Figura 1.5.** Supervivencia global: serie global (A), según el número de genes mutados <3 y  $\geq$ 3 (B), según el estado mutacional de *SRSF2* (C) y según el estado mutacional de *STAG2* (D)

**Figura 1.6.** Incidencia acumulada de recaída: serie global (A) y según el número de genes mutados <3 y  $\geq$ 3 (B)

**Figura 2.1:** Pacientes con SMD sometidos a trasplante alogénico: mutaciones somáticas y citogenética

**Figura 2.2:** Supervivencia global (A) y supervivencia global según el número de genes mutados, agrupados en pacientes con  $\leq$  2 y >2 genes mutados (B)

**Figura 2.3:** Incidencia Acumulada de Recaída global (A), según el número de genes mutados agrupados en pacientes con 2 y >2 genes mutados (B) y según el estado mutacional de *TP53* (C)

**Figura 2.4.** *TP53* y cariotipo complejo.

**Figura 2.5** La EICRc mejora el pronóstico en pacientes con >2 genes mutados (A) y  $\leq$  2 genes mutados (B)

**Figura 2.6:** La EICRc mejora el pronóstico en pacientes con mutaciones de *TP53*

**Figura 3.1:** Modelo de evolución lineal (paciente 1)

**Figura 3.2.** Modelo de evolución lineal (paciente 2)

## TABLAS Y FIGURAS

**Figura 3.3.** Modelo de evolución ramificada (paciente 7).

**Figura 3.4.** Modelo (posible) de evolución en paralelo (paciente 8).

**Figura 3.5.** Modelo de evolución ramificada (paciente 9)

**Figura 3.6:** Supervivencia libre de recaída en función del estado previo al trasplante.

