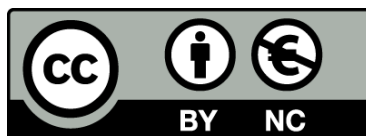




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Caracterización de los síndromes mielodisplásicos mediante secuenciación masiva y análisis de single cell

Pamela Acha González



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License](#).

Caracterización de los síndromes mielodisplásicos mediante secuenciación masiva y análisis de single cell

Pamela Acha González
Barcelona, 2020



Programa de Doctorado en Biomedicina



Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

Caracterización de los síndromes mielodisplásicos mediante secuenciación masiva y análisis de *single cell*

Memoria presentada por

Pamela Acha González

Para optar al grado de

Doctora en Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Francesc Solé Ristol y la tutoría del
Dr. Pablo Menéndez Buján

Pamela Acha González
La doctoranda

Francesc Solé Ristol
El director de tesis

Pablo Menéndez Buján
El tutor de tesis

Barcelona, 2020

El Dr. Francesc Solé Ristol, director de la Plataforma de Citogenética e Investigador principal del grupo de Síndromes Mielodisplásicos del Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras.

CERTIFICA

Que la tesis doctoral titulada “Caracterización de los síndromes mielodisplásicos mediante secuenciación masiva y análisis de *single cell*”, presentada por Pamela Acha González, para acceder al título de Doctora en Biomedicina, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida delante del tribunal correspondiente.

El trabajo ha sido realizado en el Grupo de Investigación en Síndromes Mielodisplásicos del Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras.

Barcelona, 2020

Dr. Francesc Solé Ristol

Agradecimientos

Después de varios años de trabajo y de unas últimas semanas de tensión, finalmente aquí está LA TESIS. Creo que se puede decir que “resumida” en unas páginas, porque en realidad va más allá de lo que pueda reflejarse en este trabajo. Han sido años de aprendizaje en muchos sentidos: laboratorio, redacción, presentaciones y sobre todo de trabajo en equipo.

Hay mucha gente dentro y fuera del laboratorio que ha hecho posible este trabajo y de verdad espero no olvidarme de nadie.

Creo que debería comenzar por agradecer a mi director de tesis, a **Kiko**. Gracias por haberme dado la oportunidad de aprender en tu grupo, por hacerme ver que puedo más allá de lo que a veces pienso, por ser una persona cercana, comprensiva, conciliadora, dispuesta a escuchar y a ayudar, y sobre todo por creer en mí. Gracias por darme oportunidades más allá de la tesis, porque no cualquiera te confía otros proyectos o presentaciones y por darme la oportunidad de seguir en el lab por más que el trabajo que concierne a esta tesis haya finalizado. Gracias por estar pendiente de todos en el grupo, por intentar buscar siempre lo mejor para cada uno de nosotros. Y si, espero que aún quede tequila para unas margaritas, jeje.

Sin duda, te lo dije hace unos días: **Laura**, sin ti, esta tesis no hubiese quedado como tal. De verdad, mil gracias por tanto. Gracias por estar siempre, por sacar un momento siempre que alguien te necesita. Gracias por tus enseñanzas en el laboratorio, por confiar en mí, por las correcciones de la tesis, por hacerme ver más allá. También gracias por escucharme, por apoyar mis ideas, por tenerme en cuenta en nuevos proyectos. Gracias por ser una persona con la que puedo contar dentro y fuera del lab. Por ser un ejemplo a seguir. Say thanks to Madison for me, jajaja!

Mar, gracias por ayudarme con los arrays, el análisis y la interpretación. Gracias por ayudarme a mejorar mis presentaciones, un poster o en lo que sea que te haya pedido ayuda alguna vez. Gracias por haberte convertido en una amiga con la que sé que puedo contar a cualquier hora. Gracias por confiar en mí y contar conmigo.

Gracias a las dos personas con las que estoy día a día en el lab: Francisco y Ana. **Francisco**, gracias por escucharme, por los cafés con desahogo incluido. Gracias por todos los análisis y reanálisis de WES y paneles. Gracias por “el script”, que en realidad es lo que ha facilitado el análisis de copy number. Gracias por los aguacates y por aguantarme con Rick, jeje. **Ana**, has llegado hace poco más de un año, pero en este tiempo nos has ayudado un montón! Gracias por estar siempre predispuesta a ayudar, a aprender, por estar siempre sonriente y de buen humor.

A **Rocío**, **Jessi** y **Paula**. Sin vuestro trabajo, no serían posible ninguno de nuestros proyectos. Gracias por estar día a día con las muestras! Paula, gracias por tus “clases de paneles”, por cuidar hasta el más mínimo detalle cuando enseñas un protocolo o explicas algo. Gracias por tu apoyo, por tus ocurrencias y risas. Gracias **Jessica**, si bien te has incorporado hace poco, puedo decir que siempre estás dispuesta a echar una mano, gracias por ello, por pensar diferente, por defender tus ideas y generar debates interesantes.

Jordi, Dr Ribera! La inconfundible voz desde el otro lado del edificio, jeje. Gracias por todas esas tardes de charlas y risas de regreso a casa. Gracias por escucharme, por las reflexiones y por tus palabras de aliento: “ánimo valiente”, jeje. **Celia** y **Miriam**, gracias por el apoyo. Aunque llevemos poco tiempo conociéndonos, gracias por el buen humor y las risas a la hora de la

comida o el desayuno. Gracias **Joao** por tus consejos, por tus preguntas que me hacían reflexionar, gracias por las alícuotas de Taq, jeje.

Al grupo de **Jordi Petríz**, muchas gracias por todos vuestros consejos para mejorar los experimentos sobre todo en cuestiones de viabilidad y pureza. Sobre todo, a ti **Laura**, gracias por todos los CD3 y CD34! Gracias a ti y a Jordi por vuestra implicación y consejos. Gracias **Jorge** y **Àngel** y ánimos con la tesis que sois los siguientes y estoy segura que lo haréis genial.

Al **laboratorio de hematología de Can Ruti**. Gracias! Porque vuestro trabajo va más allá del trabajo asistencial y tenéis un compromiso con la investigación. Especialmente al **lab de biología molecular y al lab de citogenética** que son con los que más he estado en contacto, gracias! Gracias **Lurdes** por tus consejos, por tu ayuda y por la predisposición de siempre para colaborar en los proyectos de SMD. Gracias **Natalia** por tu ayuda con las bases de datos, por ser mi compañera en la EHA! Estocolmo y Ámsterdam no hubiesen sido iguales sin ti. A la **Dra Blanca Xicoy**, por sus enseñanzas, por sus disertaciones, por colaborar en nuestros proyectos, especialmente cuando hay un 5q de por medio, jeje. Por estar siempre para cualquier duda/consulta vía mail o en persona.

Como bien dice mi jefe, es importante el trabajo en equipo, ayudarnos entre todos... Por eso, gracias al **Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD)** y al laboratorio del **Prof. Detlef Haase** en Göttingen, especialmente a **Christina** y **Roman**. Gracias a vuestra colaboración fue posible, sobre todo, el Trabajo I de esta tesis.

Gracias a **Jose, Adri** y todos los de **IT**. Gracias por vuestra ayuda, sobre todo en los últimos meses en que se tuvo que “poner de moda” el teletrabajo. Gracias **Juan, Joselin** y **Judit**. Por estar pendiente de los pedidos, por la ayuda con la compra de las sondas, reactivos y material en general.

Gracias a **Alejandra Sanjuan**, por tus enseñanzas a lo largo del master e incluso después. Por preguntarme siempre por la tesis e invitarme a que te cuente un poco más de los proyectos. Gracias porque sé que vas liada, pero aun así te haces un hueco para escucharme. Gracias **Pablo Menéndez**, por haberme abierto las puertas para hacer las prácticas del máster en tu lab, porque ese fue el primer paso, el primer contacto con el IJC. Gracias a los dos por la confianza que tuvisteis en mí, por incentivar a razonar sobre los resultados de mis experimentos, por escucharme y dejar probar mis hipótesis en el lab.

También hay gente fuera del lab a la que tengo que agradecer. Podría comenzar por “mi medio cerebro”, por **Irma**, mi compañera en la carrera... con la que compartimos sobre todo los últimos años en la uni y que se ha convertido en una de mis mejores amigas. Gracias por tu apoyo, por encontrar la forma de enviarme un detalle, una nota... por las notas de voz infinitas y por hacerte de un momento SIEMPRE que lo he necesitado. Gracias a **Eli, Vero, Lili, Vilma, Moni...** gracias por estar siempre, por el apoyo a pesar de la distancia y por hacer geniales nuestros reencuentros. A los monotemáticos: **Sari, José, Lady** y **Gracie**, por el apoyo y por tenerme en cuenta a pesar de la distancia. **Miguel**, gracias!... la vida se ha encargado de hacernos coincidir incluso del otro lado del mundo. Gracias por tu apoyo y tus risas.

A los amigos que encontré en Barcelona: a mi francesa **Laura**! Gracias por tus risas, por decirme que vas a estar el día que presente la tesis, que tú quieres estar ahí. Gracias por ser incondicional,

por ser de las primeras en estar cuando lo he necesitado. Gracias por el apoyo y también por confiar y contar conmigo. **Sarah!** Aunque nos conocemos hace poco, sé que eres una persona genial y con un corazón enorme, gracias por ser parte del “council”. Gracias **Uri..!** por tus ocurrencias, por tus risas, pero también por tus conversaciones filosóficas y por ser mi referencia en el mundo de las finanzas, jeje. Gracias a **Marga y Manel**, la meva família catalana! Por vuestro apoyo, por hacerme sentir una más de la familia.

A **Lucía y Jon...** gracias por las noches de burgers, por tenerme en cuenta, por vuestra amistad y consejos. **Alba**, pequeña! Gracias por esa alegría que transmites!

David, gracias por tu apoyo sobre todo en estos últimos meses. Gracias por confiar en mí y decirme que yo puedo. Por prestar atención e interés cuando te cuento lo que hago en el lab, por darme clases básicas de física nuclear, jeje. Gracias por ser mi cómplice. Gracias a **Pepi y Xavier**, por el apoyo y el cariño.

Finalmente, pero no menos importante, gracias a mi familia. Gracias a **mamá y papá** que siempre me han apoyado en todo lo que me he propuesto. Gracias a los dos por los valores que nos habéis inculcado y por buscar siempre lo mejor para mí y para mi hermano. A **Luis**, por sus risas, por su cariño y por defenderme como nadie, jeje. Tú y yo podemos discutir, pero eso sí, no dejarías que nadie me toque un pelo, jaja. A los tres, por estar presentes a pesar de la distancia. Gracias a mi abue **Ilda**, porque tiene una fe única e incondicional en mí. A mi abuelo **Oscar**, por haber enseñado con tu ejemplo de dedicación y perseverancia. A mis **tíos y primos**, gracias por el apoyo, por preguntar por la tesis, el laboratorio, la vida en Barcelona, por vuestros mensajes de apoyo, gracias! Gracias especialmente a **Karla** por plasmar un tu talento en el diseño de la portada de esta tesis, me ha encantado!

A todos, SIMPLEMENTE GRACIAS!

Índice

Índice.....	I
Abreviaturas	VI
Introducción.....	1
1. Neoplasias hematológicas.....	2
1.1. Hematopoyesis	2
1.2. Neoplasias hematológicas.....	2
1.3. Neoplasias mieloides.....	3
2. Síndromes Mielodisplásicos (SMD).....	5
2.1. Epidemiología y etiología de los SMD.....	5
2.2. Características clínicas.....	6
2.3. Diagnóstico y clasificación de los SMD	6
2.3.1. Criterios mínimos para el diagnóstico de los SMD.....	6
2.3.2. Estudios en sangre periférica y médula ósea	10
2.3.3. Clasificación de los SMD	11
2.4. SMD con del(5q) aislada	17
2.5. Alteraciones citogenéticas en los SMD.....	20
2.6. Pronóstico de los SMD.....	21
2.6.1. <i>Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R)</i>	21
2.7. Tratamiento de los SMD.....	22
2.8. Mutaciones somáticas en los SMD	24
2.8.1. Implicación en el diagnóstico	30
2.8.2. Implicación en el pronóstico	30
2.8.3. Implicación en el tratamiento	31
2.9. Heterogeneidad intratumoral y arquitectura clonal de los SMD	32
3. Técnicas de análisis genético en los SMD	34
3.1. Citogenética convencional	34
3.2. Hibridación fluorescente in situ (FISH)	35
3.3. <i>Microarrays</i> genómicos	36
3.4. Técnicas de secuenciación de ADN	37
3.4.1. Secuenciación clásica de Sanger	38
3.4.2. <i>Next Generation Sequencing (NGS)</i>	38
3.5. Estudios genómicos en <i>single cell</i>	40
3.5.1. Instrumentos disponibles para la captura de SC	42
Hipótesis y objetivos	46
Materiales y métodos.....	49

Trabajo I	50
1. Pacientes y diseño del estudio	51
2. Procesamiento general de muestras	51
2.1. Procesamiento de la MO	51
2.2. Procesamiento de la SP	52
2.3. Extracción de ADN	53
3. <i>Single nucleotide polymorphism arrays (SNP-A)</i>	53
3.1. Procesamiento de muestras	53
3.2. Análisis de los resultados de SNP-A	55
4. Secuenciación masiva dirigida	55
4.1. Preparación de librerías	55
4.2. Secuenciación masiva dirigida (<i>Targeted deep sequencing, TDS</i>)	59
5. Análisis estadístico	61
Trabajo II	62
1. Pacientes incluidos en el estudio	63
2. Diseño del estudio y muestras	63
2.1. Procesamiento de la MO	64
2.2. Procesamiento de la SP	64
2.3. Extracción de ADN	65
3. Técnicas moleculares y selección de las alteraciones genéticas a estudiar en <i>single cell</i>	65
3.1. <i>Single nucleotide polymorphism arrays (SNP-A)</i>	65
3.2. Secuenciación del exoma (WES)	65
3.3. Secuenciación masiva dirigida	66
3.3.1. Preparación de librerías	66
3.3.2. Secuenciación y análisis	67
4. Análisis en SC	68
4.1. Diseño y validación de ensayos	68
4.1.1. Ensayos de SNVs	68
4.1.2. Ensayo de CNAs	68
4.1.3. Ensayos control	69
4.2. Captura y procesamiento de SCs	69
4.3. Estudio mediante qPCR de las alteraciones genéticas en SC mediante la plataforma Biomark™ HD de Fluidigm®	70
4.4. Análisis de datos	72
4.4.1. Análisis de los SNVs a partir de los resultados de qPCR	72
4.4.2. Análisis de <i>copy number</i> a partir de los resultados de qPCR	72

4.4.3. Filtrado de las poblaciones obtenidas e identificación de subclones presentes en cada muestra estudiada	73
5. Análisis estadístico	73
Resultados.....	74
Trabajo I	75
1. Características de los pacientes	76
2. Aplicación combinada de la citogenética convencional, SNP-A y TDS	80
3. Aplicación de la TDS	80
3.1. Perfil mutacional de los pacientes	80
3.2. Cantidad relativa de alteraciones de acuerdo al subtipo de la OMS y al recuento de blastos en MO	81
3.3. Detección cualitativa de mutaciones en función de la muestra utilizada	82
3.4. Detección cuantitativa de mutaciones	86
Trabajo II	88
1. Características de los pacientes	89
2. Perfil mutacional de las pacientes	91
2.1. Detección de mutaciones mediante WES y TDS	91
2.2. Detección de CNAs mediante SNP-A.....	94
3. Arquitectura clonal en HSPC CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD45 ⁺ CD19 ⁻ a partir del análisis de SC	94
3.1. Arquitectura clonal de la paciente 1	95
3.2. Arquitectura clonal de la paciente 2	97
3.3. Arquitectura clonal de la paciente 3	99
3.4. Arquitectura clonal de la paciente 4	100
Discusión	102
1. Utilidad de la CC y SNP-A en el estudio de los SMD	103
2. Secuenciación masiva en el estudio de los SMD	104
2.1. Perfil mutacional	104
2.2. Utilidad de la SP como muestra alternativa a la MO	106
2.2.1. Detección cualitativa de mutaciones en función de la muestra utilizada	106
2.2.2. Detección cuantitativa de mutaciones somáticas	107
2.3. Utilidad de la muestra control pareada en los estudios de secuenciación	108
2.4. Retos en la introducción de la secuenciación masiva en la práctica clínica	109
3. Estudios de SC.....	111
3.1. Análisis de la HIT mediante estudios de SC	111
3.2. Limitaciones de los estudios en SC y perspectivas futuras	114
Conclusiones	117

Bibliografía	119
Anexos	137
Anexo I: Metodología Suplementaria	138
Anexo II: Presentación en congresos de los trabajos de esta tesis	144
Anexo III: Publicaciones elaboradas durante la realización de la tesis doctoral	146

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARSA: Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

CC: Citogenética convencional

cCN: *Calculated copy number* (valor calculado de número de copias)

CDR: *Commonly deleted region* (región comúnmente delecionada)

cfDNA: *Cell-free DNA* (ADN libre circulante)

CNN-LOH: *Copy number neutral-loss of heterozygosity* (perdida de heterocigosidad sin alteración del número de copias)

CRDM: Citopenia refractaria con displasia multilínea

CCUS: *Clonal cytopenia of undetermined significance* (citopenia clonal de significado indeterminado)

CHIP: *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential* (hematopoyesis clonal de potencial indeterminado)

CNA: *Copy number alteration* (alteración en el número de copias)

ctADN: ADN tumoral circulante

del(5q): deleción del brazo largo del cromosoma 5

DX/PRE: Diagnóstico o cualquier momento previo a recibir tratamiento

EMA: *European Medicines Agency* (Agencia Europea de Medicamentos)

FDA: *Food and Drug Administration*

FISH: *Fluorescence in situ hybridization* (Hibridación in situ fluorescente)

HIT: heterogeneidad intratumoral

HMA: Agentes hipometilantes.

HSPC: *Hematopoietic stem progenitor cells* (células madre progenitoras hematopoyéticas)

ICUS: *Idiopathic cytopenia of undetermined significance* (Citopenia idiopática de significado indeterminado)

IDUS: *Idiopathic dysplasia of undetermined significance* (Displasia Idiopática de significado indeterminado)

Indels: Inserciones/deleciones

IPSS-R: *Revised International Prognostic Scoring System*

ISCN: *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMAs: Leucemia mieloide aguda secundaria

LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica

MAF: *Minor allele frequency* (frecuencia del alelo menor)

MO: Médula ósea

NGS: *Next generation sequencing* (secuenciación de nueva generación/secuenciación masiva)

NMP: Neoplasias mielproliferativas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: *Phosphate buffered saline* (tampón fosfato salino)

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa)

SA: Sideroblastos en anillo

SC: *Single cell* (célula única)

sEPO: niveles de eritropoyetina sérica

SG: Supervivencia global

SMD: Síndromes mielodisplásicos

SMD/NMP: Síndromes mielodisplásicos/Neoplasias mielproliferativas

SMD-DML: SMD con displasia multilínea

SMD-DU: SMD con displasia unilínea

SMD-EB1: SMD con exceso de blastos tipo 1

SMD-EB2: SMD con exceso de blastos tipo 2

SMD-SA: SMD con sideroblastos en anillo

SNP-A: *Single nucleotide polymorphism arrays*

SNV: *Single nucleotide variant* (variación de un único nucleótido)

SP: Sangre periférica

SP-CD3+: Linfocitos T-CD3+ de sangre periférica

SP-CD34+: Células CD34+ aisladas de sangre periférica

SP-MC: Células mononucleadas de sangre periférica

SP-PMNC: Células polimorfonucleares de sangre periférica

TDS: *Targeted deep sequencing* (secuenciación masiva dirigida)

TLE: Tampón de lisis eritrocitaria

UMIs: *Unique molecular identifiers* o *barcodes* moleculares

VAF: *Variant allele frequency* (frecuencia alélica de la variante)

wCN: *Weighted copy number* (media ponderada de los valores del número de copias)

WES: *Whole exome sequencing* (secuenciación masiva del exoma)

WGS: *Whole genome sequencing* (secuenciación del genoma)

Introducción

1. Neoplasias hematológicas

1.1. Hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso continuo que implica la formación, desarrollo y maduración de las diferentes células sanguíneas. Inicia en el saco vitelino a partir de la segunda semana de gestación, continúa en el hígado y bazo durante la vida embrionaria y, a partir del cuatro mes y durante toda la vida, tiene lugar en la médula ósea (MO).

Es un proceso jerárquico, ya que a partir de una célula madre pluripotente y con capacidad de autorrenovación se van generando células cada vez más diferenciadas y comprometidas hacia un linaje específico. Finalmente, a partir de la célula progenitora linfoide y la célula progenitora mieloide se originarán los elementos maduros de la sangre tal como se ilustra en la figura 1 (1).

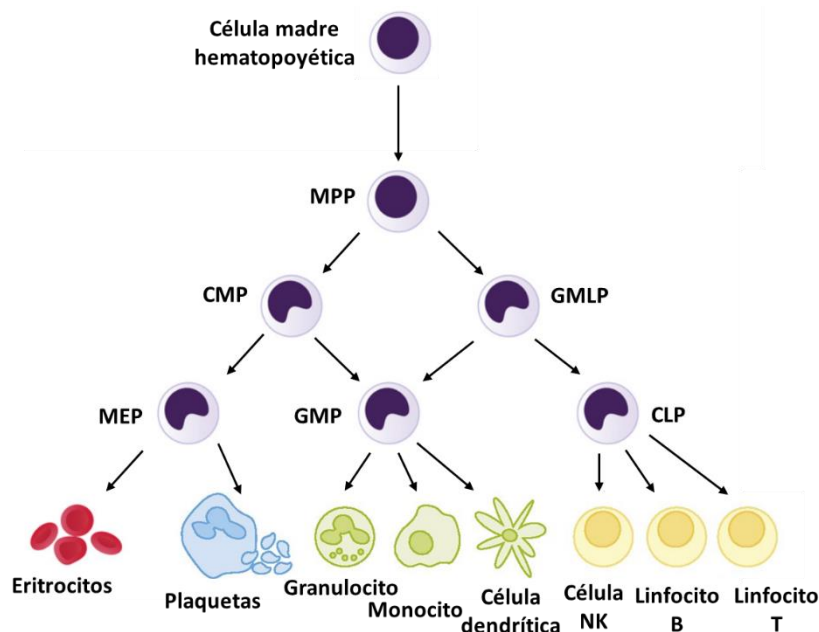


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis. Abreviaturas: MPP: progenitor multipotente. CMP: progenitor común mieloide. GMLP: progenitor granulocítico-macrofágico-linfocítico. MEP: progenitor megacariocítico-eritrocítico. GMP: progenitor granulocítico-macrofágico. CLP: progenitor común linfoide. Adaptada de Blank y Karlsson, 2015 (2).

Cuando alguna de las células implicadas en la hematopoyesis se ve afectada por un proceso maligno, se desarrollan neoplasias hematológicas.

1.2. Neoplasias hematológicas

Las neoplasias hematológicas comprenden un grupo de enfermedades que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas. Ocurren cuando hay un desequilibrio en la proliferación y maduración de alguno de los componentes celulares de la MO y en consecuencia se ve afectada la función de los elementos más maduros presentes en la sangre periférica (SP) (3).

Las neoplasias hematológicas se clasifican de acuerdo al tipo celular afectado en dos grandes grupos: neoplasias linfoides y neoplasias mieloides.

En la introducción de esta tesis se describirán únicamente las neoplasias mieloides, haciendo énfasis en los síndromes mielodisplásicos (SMD), motivo de estudio del presente trabajo.

1.3. Neoplasias mieloides

Las neoplasias mieloides son enfermedades clonales que se desarrollan cuando ocurre alguna alteración en el proceso de autorenovación, proliferación y/o diferenciación de las células madre hematopoyéticas o progenitoras que afectan al linaje mieloide. El mismo está compuesto por las series megacariocítica, eritrocítica, granulocítica y macrofágica. Actualmente, las neoplasias mieloides se clasifican siguiendo los criterios de la World Health Organization (Organización Mundial de la Salud, OMS) (3). Dicha clasificación se basa principalmente en las características morfológicas, citoquímicas e inmunofenotípicas de las células de la SP y MO. Así también, en determinados casos, la citogenética y la biología molecular juegan un papel importante en la clasificación.

La clasificación de la OMS del 2008, revisada y actualizada en el 2017, propone dividir las neoplasias mieloides en 5 categorías (3,4):

- A) Neoplasias mieloproliferativas (NMP):** cursan con la proliferación celular descontrolada de una o más líneas mieloides. Se caracterizan por presentar una hiper celularidad de la MO con maduración hematopoyética ineficaz y un número incrementado de granulocitos, eritrocitos y/o plaquetas en la SP. En la tabla 1 se citan los 8 subtipos de NMP.

Tabla 1. Clasificación de las neoplasias mieloproliferativas según la OMS 2017.

Neoplasias mieloproliferativas

Leucemia mieloide crónica BCR-ABL positiva (LMC)
Leucemia neutrofílica crónica
Policitemia Vera
Mielofibrosis primaria
Trombocitemia esencial
Leucemia eosinofílica crónica
Neoplasia mieloproliferativa inclasificable
Mastocitosis

Abreviatura: OMS: Organización Mundial de la Salud.

- B) Neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y alteraciones de los genes *PDGFRA*, *PDGFRB*, o *FGFR1*:** constituye un grupo heterogéneo que resulta de la formación anormal de genes de fusión (a partir de la reorganización de *PDGFRA*, *PDGFRB*, o *FGFR1*) que codifican para una tirosina quinasa que se activa de manera constitucional. Estos casos se presentan como una NMP donde la eosinofilia es común, aunque no constituye un requisito para la categorización.
- C) Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP):** presentan hallazgos clínicos y de laboratorio que varían entre aquellos comúnmente asociados a los SMD y las NMP. Usualmente cursan con hiper celularidad en la MO debido a la proliferación de una o más líneas mieloides. La proliferación es efectiva en algunos linajes, con recuentos elevados de células circulantes que pueden presentar displasia a nivel morfológico y/o funcional. Simultáneamente, la proliferación puede verse comprometida en alguna

línea, con lo cual la citopenia puede ser un hallazgo. En la tabla 2 se mencionan los subtipos que comprenden esta entidad.

Tabla 2. Clasificación de los SMD/NMP según la OMS 2017.

Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP)

- Leucemia mielomonocítica crónica
- Leucemia mieloide crónica atípica, *BCR-ABL*-negativa
- Leucemia mielomonocítica juvenil
- SMD/NMP con sideroblastos en anillo y trombocitosis
- SMD/NMP inclasificables

Abreviatura: OMS: Organización Mundial de la Salud.

Dentro de este grupo, destaca la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) que es una entidad que frecuentemente se estudia en conjunto con los SMD ya que comparten aspectos característicos. Su clasificación ha sido siempre controvertida y originariamente se consideró un subtipo de SMD en el primer sistema de clasificación que data de 1982 (4) (apartado 2.3.3).

La LMMC es un desorden clonal caracterizado por una monocitosis persistente (>3 meses) en SP (recuento de monocitos $\geq 1 \times 10^9/L$, $\geq 10\%$ del recuento de glóbulos blancos) y displasia en la MO (3,5,6). De acuerdo con los criterios de la OMS, se puede subclasificar en 3 subtipos de acuerdo al porcentaje de blastos en SP y MO (Tabla 3). Alternativamente, también se pueden distinguir dos variantes según el recuento de glóbulos blancos: proliferativa ($\geq 13 \times 10^9/L$) o displásica ($< 13 \times 10^9/L$) (7).

Tabla 3. Subtipos de leucemia mielomonocítica crónica de acuerdo al % de blastos.

Subtipo	% blastos en sangre periférica*	% blastos en médula ósea
0	<2%	<5%
1	2%-4%	5%-9%
2	>5%	10%-19%

*El porcentaje de blastos en SP incluye a los promonocitos.

- D) **Síndromes mielodisplásicos:** se describen en el apartado 2.
- E) **Leucemia mieloide aguda (LMA):** resulta de la expansión clonal de blastos mieloides en la SP, MO u otros tejidos. Es una enfermedad heterogénea a nivel clínico, morfológico y genético que puede comprometer una o más líneas mieloides. Para su diagnóstico, es fundamental un recuento de blastos mieloides $\geq 20\%$, excepto en los casos en los que se reporte la presencia de una de estas 4 alteraciones genéticas: *t(8;21)(q22;q22.1)*, *inv(16)(p13.1;q22)*, *t(16;16)(p13.1;q22)* o el gen de fusión *PML-RARA* o *t(15;17)(q22;q21)*. En la tabla 4, se citan los subtipos de LMA.

Tabla 4. Clasificación de la leucemia mieloide aguda según la OMS 2017.

Leucemia mieloide aguda (LMA) y neoplasias mieloides relacionadas

LMA con anormalidades genéticas recurrentes
LMA con cambios relacionados a la mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia
Sarcoma mieloide
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down
Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas

2. Síndromes Mielodisplásicos (SMD)

Los SMD comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades clonales caracterizado por una hematopoyesis ineficaz que resulta en una MO normo o hiper celular, citopenia y displasia en una o más líneas mieloides. Si bien estos pacientes presentan mayor riesgo de desarrollar una LMA, la mayoría de ellos cursará con un fallo medular progresivo y complicaciones como consecuencia de las citopenias (3,8,9).

La displasia en una o más líneas mieloides es un criterio fundamental para establecer un diagnóstico de SMD. Esta displasia puede ir acompañada de un incremento de blastos mieloides en la SP y/o MO, pero el porcentaje no puede superar el 20%, límite por encima del cual se consideraría una LMA (3).

Además de la displasia, se requiere haber detectado citopenia al menos en una línea mieloide (eritroide, neutrofílica o megacariocítica). No obstante, se podría establecer un diagnóstico de SMD con recuentos hematológicos por encima de los límites inferiores siempre y cuando esté presente un hallazgo morfológico y/o citogenético clave (10,11).

2.1. Epidemiología y etiología de los SMD

Se estima que la incidencia anual de los SMD es de 3-5 casos por cada 100.000. La edad media de los pacientes al diagnóstico es de 70 años, con predominancia del sexo masculino. Al tener en cuenta la población >70 años, la incidencia aumenta a 20 casos por cada 100.000 habitantes por año (12).

Los SMD en niños son poco frecuentes y tienen características únicas y criterios diagnósticos diferentes a los de los SMD de los adultos. No se profundizará en ellos, ya que esta tesis se centra en los SMD del adulto.

De acuerdo con la etiología, los SMD se pueden clasificar en:

- **Primarios, *de novo* o idiopáticos:** suponen el 85 - 90% de los casos y ocurren sin un historial previo conocido de exposición a quimioterapia o radiación.
- **Secundarios o relacionados con la terapia:** representan el 10 - 15% de todos los casos y su aparición se asocia a un tratamiento previo con quimioterapia (inhibidores de la topoisomerasa, agentes alquilantes) o radiación ionizante.

2.2. Características clínicas

Si bien algunos pacientes pueden ser asintomáticos al diagnóstico y solo se sospecha de un SMD ante un hemograma alterado, la mayoría ellos suelen consultar por síntomas asociados a una citopenia. A continuación, se citan los síntomas comúnmente asociados a cada una de ellas:

- Anemia: fatiga, disnea y/o poca tolerancia al ejercicio.
- Trombocitopenia: hemorragias y hematomas.
- Neutropenia: infecciones.

Además de ser muy heterogéneos en cuanto a las características clínicas, los SMD también presentan gran variabilidad pronóstica, tanto en términos de supervivencia global (SG) como de riesgo de evolución a LMA. En los siguientes apartados se profundizarán más estos aspectos, pero de manera general podemos decir que la mediana de la SG varía entre los 0.8 a 8.8 años según el grupo de riesgo del paciente (apartado 2.6) y se estima que alrededor del 30% de los casos evoluciona a LMA (13–15).

2.3. Diagnóstico y clasificación de los SMD

2.3.1. Criterios mínimos para el diagnóstico de los SMD

Como se ha mencionado anteriormente, para establecer el diagnóstico de un SMD es imprescindible que se cumplan dos criterios morfológicos: displasia en más del 10% de células examinadas en SP y MO y citopenia en una o más líneas. En la tabla 5 se citan las manifestaciones morfológicas más comunes relacionados con la displasia.

Tabla 5. Manifestaciones morfológicas de displasia (15).

Diseritropoyesis	Puentes internucleares, irregularidades del contorno nuclear, multinuclearidad, cambios megaloblásticos, cariorrexis, mitosis anómalas, cuerpos de Höwell-Jolly, punteado basófilo, distribución anómala de la hemoglobina, distribución anómala de la hemoglobina + punteado basófilo, sideroblastos en anillo (tinción de Perls), PAS positividad
Disgranulopoyesis	Gigantismo nuclear, hipersegmentación nuclear, hiposegmentación nuclear (pseudo-Pelger), núcleo en anillo, núcleo en espejo, alteración de la condensación cromatínica (<i>clumping</i>), apéndices nucleares, bolsillos nucleares, granulación gigante (pseudo-Chediak-Higashi), hipo/agranularidad, bastones de Auer, cuerpos de Döhle, hiposegmentación + hipogranulación
Dismegacariopoyesis	Núcleos dispersos, bilobulados, monolobulados de distintos tamaños, micromegacariocitos

Abreviatura: PAS: ácido peryódico de Schiff (leucofucsina).

Es importante que la evaluación diagnóstica de un paciente con sospecha de SMD integre las diferentes disciplinas. Se debe considerar la historia clínica del paciente, exploración física, hemograma completo, frotis de SP y aspirado medular para descartar otras condiciones benignas (no clonales) que puedan ocasionar displasia y/o citopenia. En la figura 2 se recogen aquellas condiciones clonales y no clonales que pueden manifestarse de forma similar a un SMD.

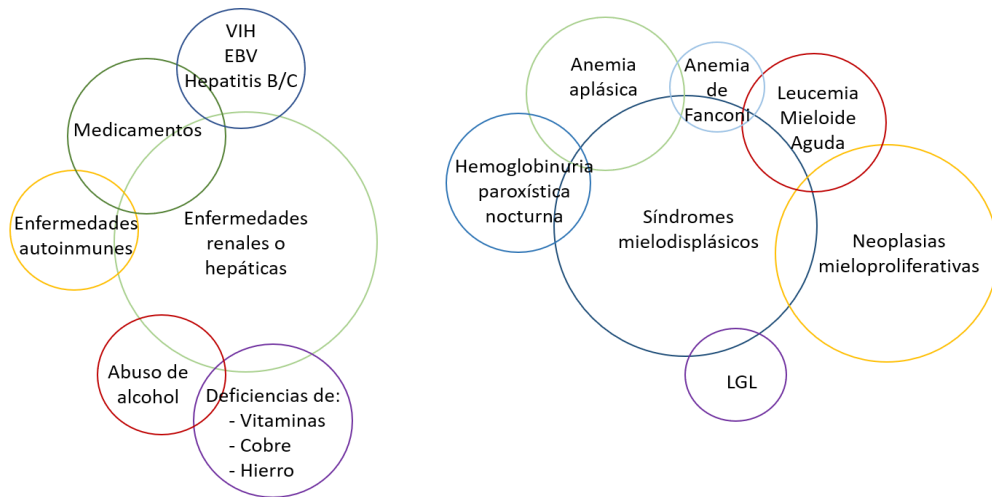


Figura 2. Superposición del diagnóstico de los SMD y otros desordenes clonales y condiciones benignas que pueden semejar un SMD. Abreviaturas: EBV: Epstein-Barr virus. LGL: leucemia de linfocitos grandes granulares. SMD: síndromes mielodisplásicos. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. Adaptación de Bejar *et al.*, 2015 (16).

El diagnóstico de los SMD puede ser difícil cuando las citopenias y displasias en MO son moderadas. Teniendo en cuenta esto, en el 2007, un grupo de expertos propuso una serie de criterios para establecer el diagnóstico de un SMD (17) (Tabla 6). Primeramente, se han de cumplir los dos prerequisites y al menos uno de los criterios decisivos para llegar a un diagnóstico. Solo en el caso de que ningún criterio decisivo se cumpla, los co-criterios deben aplicarse para intentar establecer el diagnóstico de un SMD.

Tabla 6. Criterios mínimos para el diagnóstico de SMD. Modificada de Valent *et al.*, 2007 (17).

Prerequisites	Citopenia constante en una o más de las líneas siguientes: eritroide (Hb < 11/dL); neutrofílica (< 1.500/uL) o megacariocítica (plaquetas < 100.000/uL) con la exclusión de enfermedades hematológicas y no hematológicas como causa de citopenia/displasia
Criterios decisivos	<ul style="list-style-type: none"> • Displasia en al menos el 10% de las células de 1 o más de las líneas mieloides en médula ósea • 5-19% de blastos en médula ósea • Anomalías cromosómicas típicas, por CC o FISH (5q-, -7, +8, 20q-, otras)
Co-criterios	<ul style="list-style-type: none"> • Fenotipo atípico en médula ósea por citometría de flujo que indica población monoclonal • Datos moleculares de clonalidad: HUMARA, perfil génico, mutaciones puntuales (RAS) • Disminución de formación de colonias en médula ósea y sangre periférica

Abreviaturas: CC: citogenética convencional. FISH: hibridación *in situ* fluorescente. Hb: hemoglobina. HUMARA: *human androgen receptor X-chromosome inactivation assay*. SMD: síndromes mielodisplásicos.

Cuando no se cumplen los criterios necesarios para establecer un diagnóstico de SMD, se pueden dar una serie de condiciones a veces llamadas “pre-malignas”, ya que confieren mayores probabilidades de desarrollar un SMD. Podemos estar frente a 4 posibilidades:

- A) Hematopoyesis clonal de significado incierto (CHIP, *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*):** en el 2014, tres grupos de investigación independientes secuenciaron muestras de miles de personas con el fin de evaluar los factores de predisposición genéticos asociados a ciertas enfermedades no hematológicas (diabetes,

esquizofrenia). En dichos estudios, observaron que ciertas mutaciones en genes asociados a neoplasias mieloides eran relativamente comunes en personas sanas (con recuentos hematológicos normales) (18–20). A raíz de esto, un año más tarde, Steensma *et al.* nombraron a esta condición hematopoyesis clonal de significado incierto (CHIP, *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*) (21).

La definición de CHIP implica la presencia de una población clonal en la SP caracterizada por la presencia de una mutación somática en un gen asociado a una neoplasia hematológica a una frecuencia alélica de $\geq 2\%$ en la ausencia de citopenias (21). Dentro de los genes más frecuentemente mutados se incluyen *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*, seguidos por *TP53*, *JAK2*, *SF3B1*, *PPM1D*, entre otros. Esta condición se encuentra asociada a la edad avanzada, siendo rara en menores de 40 años y cuya frecuencia aumenta con cada década de la vida hasta llegar a presentarse en aproximadamente el 10% de las personas mayores a 65 años (9) (Figura 3). Se ha visto que esta condición benigna puede preceder al desarrollo de una neoplasia hematológica (principalmente de tipo mieloides: SMD o LMA), tal como la gammapatía monoclonal de significado incierto en el caso del mieloma múltiple. Lo cierto es que, por causas aún desconocidas, se estima que solo el 0.5-1% de los casos de CHIP progresarán a una neoplasia hematológica (21).

En el 2014, Jaiswal *et al.* llevaron a cabo un estudio donde secuenciaron el exoma de 17.182 individuos. Además de confirmar que la presencia de CHIP se asocia a un mayor riesgo de desarrollar una neoplasia hematológica (*Hazard ratio* [HR], 11.1; intervalo de confianza [IC] 95%, 3.9 a 32.6), también vieron que esta condición se asocia a una mayor mortalidad general (HR, 1.4; IC 95%, 1.1 a 1.8), mayor incidencia de enfermedades coronarias (HR, 2.0; IC 95%, 1.2 a 3.4) y enfermedades cardiovasculares (HR, 2.6; 95% IC, 1.4 a 4.8) (19). En el 2017, a partir de estudios en ratones, se describe que la presencia de CHIP podría asociarse a un mayor riesgo de aterosclerosis (22).

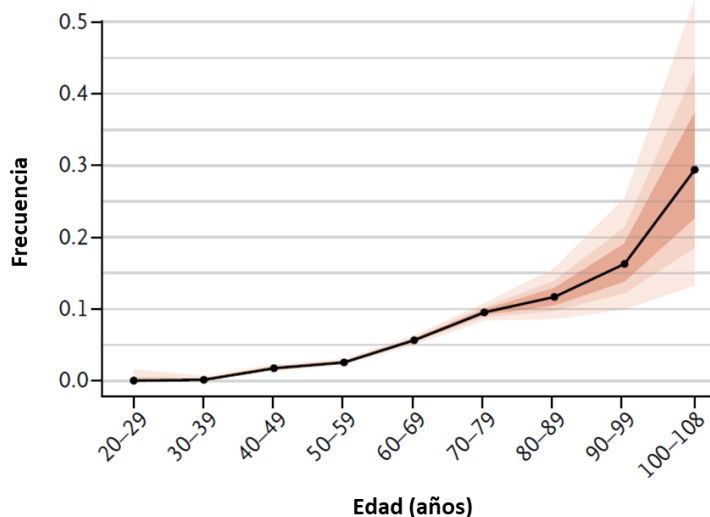


Figura 3. Prevalencia de las mutaciones somáticas con la edad. Adaptada de Jaiswal *et al.*, 2014 (19).

- B) Displasia idiopática de significado indeterminado (IDUS, *Idiopathic Dysplasia of Undetermined Significance*):** se da en aquellos individuos en los que morfológicamente se observa displasia en las células sanguíneas en ausencia de citopenias. Puede cursar o no con la presencia de mutaciones asociadas (23).

C) Citopenia idiopática de significado indeterminado (ICUS, *Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance*): se da en pacientes con una o más citopenias pero que no reúnen los criterios diagnósticos de un SMD u otra neoplasia hematológica. Hay ausencia de mutaciones somáticas (21,23).

D) Citopenia clonal de significado indeterminado (CCUS, *Clonal Cytopenia of Undetermined Significance*): de manera similar al ICUS, son pacientes que presentan citopenia en una o más líneas en ausencia de criterios diagnósticos de cualquier neoplasia hematológica pero además presentan mutaciones somáticas en genes asociados a neoplasias hematológicas principalmente de tipo mielóide. Dichas mutaciones se encuentran en una frecuencia alélica igual o superior al 2%. Teniendo en cuenta estas características, puede considerarse a la CCUS como la intersección entre CHIP y ICUS (23,24).

Muchas veces estas condiciones pueden prestarse a confusión, dado que tienen características similares, pero es importante diferenciarlas correctamente sobre todo porque difieren en el riesgo de progresión a SMD. En la tabla 7 se resumen las principales características de cada una de ellas.

Tabla 7. Diagnóstico diferencial de las citopenias idiopáticas o clonales y los síndromes mielodisplásicos. Adaptada de Montalbán-Bravo y García-Manero, 2018 (25).

Características	CHIP	IDUS	ICUS	CCUS	SMD
Citopenias	No	No	Sí (1 o más)	Sí (1 o más)	Sí (1 o más)
Displasia	No	Si, en <10% de las células de la médula ósea	Mínima (no diagnóstica de SMD) o nula	Mínima (no diagnóstica de SMD) o nula	Si (>10% en al menos una línea)
Mutaciones somáticas	Sí, con frecuencias alélicas $\geq 2\%$. Genes comúnmente afectados: <i>DNMT3A, TET2, ASXL1, SRSF2, TP53</i>	Pueden aparecer asociadas a la hematopoyesis clonal	No. Se define por ausencia de clonalidad	Sí <ul style="list-style-type: none"> • En el 36% de los casos con frecuencias alélicas similares a los SMD • 17% de los ICUS sin displasia* • 45% de los ICUS con displasia* 	Sí, en hasta el 85% de los pacientes
Riesgo de progresión	Muy bajo (0.5-1% por año), sin considerar posibles efectos terapéuticos.	Desconocido	Hasta el 10% a los 5 años	Hasta el 80% de los casos en 5 años	

Abreviaturas: CHIP: hematopoyesis clonal de significado incierto. IDUS: displasia idiopática de significado indeterminado. ICUS: citopenia idiopática de significado indeterminado. CCUS: citopenia clonal de significado indeterminado. SMD: síndromes mielodisplásicos. *La presencia de una mutación somática en el contexto de un ICUS, recategoriza al paciente dentro de una CCUS.

2.3.2. Estudios en sangre periférica y médula ósea

Como se ha mencionado anteriormente, el diagnóstico de los SMD debe ser integral. Para ello, es necesario tener en cuenta la historia clínica, exploración física del paciente y una serie de estudios en SP y MO. En las tablas 8 y 9 se describen los estudios que se deben realizar en el laboratorio en MO y SP, respectivamente.

De acuerdo con las Guías Españolas de Diagnóstico y Tratamiento de los SMD y la LMMC (15), cabe destacar que en los pacientes en los que no se ha podido establecer con certeza un diagnóstico de SMD es recomendable realizar un hemograma de seguimiento cada 6 meses y realizar una reevaluación completa si existen cambios significativos.

Tabla 8. Estudios medulares de los SMD (15).

Estudios imprescindibles	Aspirado medular	Estudio morfológico (MGG y Perls). Enumeración de blastos (teniendo en cuenta la celularidad total) y de dismorfias. Estudio citogenético en al menos 20 metafases. Estudio de mutaciones en <i>SF3B1</i> cuando se observan <5-14% sideroblastos en anillo siempre que no se cumplan los criterios de SMD con exceso de blastos o de SMD con delección 5q aislada
	Biopsia medular	En aspirado medular hipoplásico, sospecha de mielofibrosis y en ICUS
Estudios recomendables en situaciones especiales		FISH (sondas 5q, 7q, CEP8, 201 y cromosoma Y) y/o SNP/CGH <i>arrays</i> . Citometría de flujo (el porcentaje de células CD34+ obtenido por citometría de flujo no debe sustituir al recuento de blastos por morfología). Tinción de PAS. Estudios moleculares en todos los pacientes con SMD especialmente en los SMD sin exceso de blastos. Mutaciones de <i>JAK2</i> en pacientes con trombocitosis y/o fibrosis, alteraciones de <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i> y <i>PCM1/JAK2</i> en casos con eosinofilia, <i>KIT</i> en los SMD asociados a mastocitosis sistémica y <i>TP53</i> en los SMD con del(5q)

Abreviaturas: FISH: hibridación *in situ* fluorescente. ICUS: citopenia idiopática de significado incierto. MGG: May-Grünwald-Giemsa. PAS: ácido peryódico de Schiff. SMD: síndromes mielodisplásicos. SNP/CGH: *single nucleotide polymorphism/comparative genomic hybridization*.

Tabla 9. Estudios de los SMD en sangre periférica (15).

Estudios imprescindibles	Hemograma completo	Recuento absoluto de leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y plaquetas, Hb, Hto, VCM, HCM, CHCM, ADE y reticulocitos
	Frotis de sangre periférica (MGG), sin anticoagulante	Recuento porcentual diferencial (200 células nucleadas). Valoración de rasgos de mielodisplasia (diseritropoyesis, disgranulopoyesis y distrombopoyesis)
	Diagnóstico diferencial de otras causas de citopenia y/o displasia	Prueba de antiglobulina directa (test de Coombs), LDH, vitamina B12, ácido fólico (preferiblemente dosificación del ácido fólico eritocitario), sideremia, ferritina, transferrina, IST, R-TFRs, CTFH, EPO, parámetros de función hepática, renal y tiroidea, serologías víricas (VHB, VHC y VIH), autoinmunidad (FR, AAN)
Estudios recomendables	FAG en citopenias sin displasia. Estudio de HPN especialmente en SMD hipoplásico y cariotipo normal. Estudio de poblaciones linfocitarias T para descartar LLGG. Niveles séricos de cobre y ceruloplasmina (antecedente de cirugía gastrointestinal y/o déficit de vitamina B12). Serología y/o PCR para parvovirus B19 (si eritroblastopenia) y de CMV (si pancitopenia). Nivel de testosterona (si sospecha de hipogonadismo). Tipaje HLA en pacientes con SMD de bajo riesgo candidatos a trasplante o tratamiento inmunosupresor. Niveles de β 2-microglobulina. Descartar causas no clonales de sideroblastos en anillo.	

Abreviaturas: AAN: anticuerpos antinucleares. ADE: ancho de distribución eritrocitaria (RDW). CHCM: concentración de HCM. CMV: citomegalovirus. CTFH: capacidad total de fijación de hierro de la transferrina. EPO: eritropoyetina sérica. FAG: fosfatasa alcalina granulocitaria. FR: factor reumatoide. Hb: hemoglobina. HCM: hemoglobina corpuscular media. Hto: hematocrito. HLA: antígeno leucocitario humano. HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna. IST: índice de saturación de transferrina. LDH: lactato deshidrogenasa. LLGG: leucemia de linfocitos grandes granulares. MGG: May-Grünwald-Giemsa. PCR: reacción en cadena de polimerasa. R-TFRs: receptor soluble de transferrina. SMD: síndromes mielodisplásicos. VCM: volumen corpuscular medio. VHB: virus de la hepatitis B. VHC: virus de la hepatitis C. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

2.3.3. Clasificación de los SMD

La primera clasificación de los SMD fue propuesta en 1982 por el grupo cooperativo franco-americano-británico (FAB) (8). Comúnmente se la conoce como clasificación FAB y divide a los SMD basándose criterios morfológicos y el porcentaje de blastos en la MO (26). De este modo, se distinguen 5 subtipos: anemia refractaria (AR), AR con sideroblastos en anillo (ARSA), AR con exceso de blastos (AREB), AREB en transformación (AREB-t) y LMMC.

Si bien la clasificación de la FAB estuvo vigente durante casi 20 años, en el año 2001 la OMS propuso una nueva clasificación para las neoplasias hematológicas, incluidos los SMD. Aunque esta nueva clasificación se basaba en la morfología, también incorporaba la citogenética, marcadores inmunológicos y genéticos, lo que permitió una mejor clasificación, pronóstico y tratamiento de las neoplasias hematológicas (27).

En el año 2008, se publica la revisión de la clasificación de la OMS del 2001 (4). El grupo de los SMD comprende 8 subtipos cuyas principales características se mencionan en la tabla 10.

Tabla 10. Principales características de cada subtipo de SMD según la clasificación de la OMS del 2008 (4).

Subcategoría	Citopenias	% Blastos en SP	% Blastos en MO	Sideroblastos en anillo en MO (%)	Displasia
Citopenia refractaria con displasia unilínea (CRDU)					
Anemia	Anemia	< 1	< 5	< 15	Eritroide
Neutropenia	Neutropenia	< 1	< 5	< 15	Granulocítica
Trombocitopenia	Trombocitopenia	< 1	< 5	< 15	Megacariocítica
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)					
	Anemia	0	< 5	≥ 15	Eritroide
Citopenia refractaria con displasia multilínea (CRDM)					
	Bi o pancitopenia	< 1	< 5	Indiferente	Mínimo dos líneas
Anemia refractaria con exceso de blastos – 1 (AREB-1)					
	Citopenias	< 5	5-9	Indiferente	Uni/Multilínea
Anemia refractaria con exceso de blastos – 2 (AREB-2)					
	Citopenias	5-19	10-19	Indiferente	Uni/Multilínea
SMD con delección 5q aislada					
	Anemia	< 5	< 5	Indiferente	Megacariocitos hipolobulados
SMD inclasificable					
	Citopenias	≤ 1	< 5	Indiferente	Una línea

Abreviaturas: SP: sangre periférica. MO: médula ósea. OMS: Organización Mundial de la Salud. SMD: síndromes mielodisplásicos.

Recientemente, esta clasificación fue revisada y surge así la clasificación de la OMS del 2017 (3,12). En comparación a la clasificación del 2008, los principales cambios son:

- **Nomenclatura:** en las clasificaciones anteriores la nomenclatura de los SMD hacía referencia al tipo de citopenia que presentaba el paciente (ejemplo: “anemia refractaria”). Suele suceder que en los pacientes con SMD no siempre concuerdan el tipo de displasia y citopenia. Teniendo en cuenta que las citopenias son un criterio fundamental para el diagnóstico de los SMD y que la clasificación de la OMS se basa principalmente en el tipo de displasia, la nueva nomenclatura reemplaza los términos “anemia refractaria” y “citopenia refractaria” por “SMD”, seguido del calificativo más apropiado: displasia unilínea (DU) o displasia multilínea (DML), sideroblastos en anillo (SA), exceso de blastos (EB) o del(5q).
- **Mutación en el gen *SF3B1* como parte los criterios diagnósticos:** la importancia del hallazgo de la mutación en el gen *SF3B1* y su frecuente asociación con la presencia de SA lo convierte en un criterio para la clasificación dentro del subtipo SMD con sideroblastos en anillo (SMD-SA) (28,29). Además, se establece en esta revisión que aún con un porcentaje de SA <15% y ≥5% se puede establecer el diagnóstico de SMD-SA siempre y cuando la mutación en *SF3B1* esté presente.

- **Diagnóstico de SMD con del(5q) aislada aún en presencia de una segunda alteración cromosómica:** se admite cualquier alteración extra, exceptuando la monosomía del cromosoma 7 (-7) o la del(7q). Esto se basa en datos recientes que demuestran que una alteración cromosómica extra, en el caso de los SMD con del(5q) aislada, no tienen un impacto pronóstico adverso (30,31).

Teniendo en cuenta que esta tesis se basa en la clasificación de la OMS del 2017, se pone especial énfasis en ella. A continuación, se describe brevemente cada subtipo de SMD y en la tabla 12 se resumen las principales características.

A) SMD con displasia unilínea (SMD-DU)

Comprende del 7-20% de todos los casos de SMD y suele presentarse en personas cuya edad está comprendida entre los 65 – 70 años (3,32,33). Los principales hallazgos para establecer un diagnóstico diferencial son: citopenia en una o dos líneas mieloides y displasia en $\geq 10\%$ de las células de una línea mieloides. La mayoría de los pacientes suelen cursar con anemia refractaria o bicitopenia, aunque el tipo de citopenia puede corresponderse o no con el tipo de displasia observado. El porcentaje de blastos en SP debe ser $< 1\%$ y en MO $< 5\%$.

Se observan alteraciones en el cariotipo en el 50% de los casos (34,35). Si bien suelen observarse cambios como la del(20q), la trisomía 8 (+8) y alteraciones en los cromosomas 5 y 7, ninguna de ellas es específica para este subtipo de SMD. Lo mismo ocurre con las mutaciones somáticas, que se pueden detectar en un 60-70% de los casos, y donde destacan mutaciones en el gen *TET2* y *ASXL1* como las más comunes (36).

La mediana de SG de estos pacientes es de aproximadamente 66 meses y tienen un bajo riesgo de progresión a LMA (10% en 5 años) (33–35).

B) SMD con displasia multilínea (SMD-DML)

Abarca el 30% de todos los casos de SMD y la media de edad de los pacientes al diagnóstico es de 67-70 años. A diferencia del subtipo anterior, donde no había diferencias en la prevalencia según el sexo, hay una mayor incidencia de SMD-DML en hombres. En cuanto al diagnóstico diferencial, este subtipo de SMD se caracteriza por la presencia de citopenias en una o más líneas mieloides y cambios displásicos en dos o más líneas mieloides. El porcentaje de blastos en SP debe ser $< 1\%$ y en MO $< 5\%$.

Hasta un 50% de los pacientes puede presentar alguna alteración citogenética, donde destacan la +8, -7, del(7q), monosomía 5, del(5q), del(20q) y cariotipos complejos (≥ 3 alteraciones citogenéticas) (35). Alrededor del 80% de los pacientes presenta mutaciones somáticas y más de la mitad de ellos presenta alguna mutación en genes que suelen estar mutados en los SMD-EB y LMA. Dentro de los genes comúnmente mutados se incluyen los siguientes: *STAG2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *RUNX1*, *CBL*, *TP53*, *TET2* (36–38).

El curso clínico de estos pacientes es muy variable, presentan una mediana de SG de 36 meses y aproximadamente un 28% de los pacientes progresa a LMA en 5 años (datos del registro de SMD de Dusseldorf, septiembre del 2015).

C) SMD con sideroblastos en anillo (SMD-SA)

Este subtipo se caracteriza por la presencia de citopenias, displasia y SA que constituyen $\geq 15\%$ de los precursores eritroides en la MO. La mayoría de los pacientes tienen la mutación del gen *SF3B1* y en aquellos casos donde el porcentaje de SA en MO vaya del 5-15%, puede establecerse el diagnóstico siempre y cuando dicha mutación esté presente. Cabe destacar que ésta es la única mutación que hoy en día constituye un criterio diagnóstico en los SMD.

El porcentaje de blastos en SP debe ser $< 1\%$ y en MO $< 5\%$. Atendiendo al número de líneas afectadas por la displasia y citopenia, se distinguen 2 subtipos:

- **SMD-SA y displasia unilínea (SMD-SA-DU):** los pacientes cursan con anemia y la displasia afecta únicamente a la línea eritroide. Constituye el 3-11% de todos los casos de SMD y la distribución es similar en hombres y mujeres. La mutación del gen *SF3B1* se presenta en el 80-90% de los casos (39-41). Además, el 5-20% de los pacientes presenta alguna alteración citogenética que típicamente afecta a un solo cromosoma (3,42). La mediana de la SG es de 69-108 meses y solo el 1-2% de los casos evolucionan a una LMA (42).
- **SMD-SA y displasia multilínea (SMD-SA-DML):** la citopenia puede afectar a más de una línea, pero la displasia afecta a 2-3 linajes hematopoyéticos. Es un poco más frecuente que la anterior ya que supone un 13% de todos los casos de SMD. La mutación en *SF3B1* afecta al 30-70% de los pacientes. En contraste, las alteraciones citogenéticas afectan al 50% de los casos y comúnmente incluyen alteraciones asociadas a un pronóstico adverso como la -7 (33,34,43). La SG es considerablemente menor que en el subtipo anterior (mediana de 28 meses) y aproximadamente el 8% de los casos progresa a LMA.

Cabe destacar que en $< 10\%$ de los casos de SMD-SA se pueden observar mutaciones en otros genes que codifican para factores de *splicing* (*SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2*) y que las mismas son mutuamente excluyentes entre sí y con la mutación *SF3B1* (40,44). Se pueden observar otras mutaciones acompañantes como las de *TET2* y *DNMT3A* que suelen ser más frecuentes en los SMD-SA-DML. Aparentemente la mutación en el gen *RUNX1* está asociada a una menor supervivencia (40).

D) SMD con del(5q) aislada

Representa el único subtipo de SMD claramente definido por la presencia de una alteración citogenética: la delección del brazo largo o brazo q del cromosoma 5, o del(5q), que puede encontrarse aislada o en presencia de una alteración extra siempre y cuando ésta no sea la del(7q) o -7. Además, se caracteriza por anemia con o sin otra citopenia y/o trombocitosis. El porcentaje de blastos en SP debe ser $< 1\%$ y en MO $< 5\%$. Es predominante en mujeres con una edad media de 67 años.

La MO suele ser hiper celular o normocelular y frecuentemente va acompañada de hipoplasia eritroide. Se observa un incremento del número de megacariocitos que suelen ser más pequeños de lo normal y con el núcleo no lobulado o hipolobulado.

La mediana de la SG es de 66-145 meses y la transformación a LMA se observa en $< 10\%$ de los casos.

Dado que el Trabajo II de esta tesis se centra en este subtipo de SMD, se le pone mayor énfasis en el apartado 2.4.

E) SMD con exceso de blastos (SMD-EB)

Este subtipo comprende aproximadamente el 40% de todos los casos de SMD y afecta a personas >50 años de edad. El estudio en SP frecuentemente revela anomalías en los 3 linajes mieloides y los blastos están siempre presentes en la MO y/o SP. La MO es usualmente hiper celular con un grado variable de displasia. La eritropoyesis suele estar incrementada con cambios megaloblásticos. De acuerdo al número de blastos en SP y MO, se distinguen dos subtipos con diferencias en la supervivencia y probabilidad de evolución a LMA:

- **SMD-EB-1:** se define por la presencia de 5-9% de blastos en la MO o 2-4% de blastos en la SP. La mediana de la SG es de unos 16 meses y aproximadamente el 25% de los casos progresa a LMA (34,45).
- **SMD-EB-2:** se define por la presencia de 10-19% de blastos en la MO o 5-19% de blastos en la SP. La presencia de blastos con bastones de Auer en cualquier caso de SMD, hace que el mismo caiga en esta categoría, independientemente del porcentaje de blastos. La mediana de la SG es de aproximadamente 9 meses y en el 33% de los casos se observa la progresión a LMA (34,45).

Un porcentaje variable (30-50%) de los casos de SMD-EB presenta alguna alteración citogenética, tales como: del(5q), -7, del(7q), +8 y del(20q). Es posible observar también cariotipos complejos (34). Además, es común detectar mutaciones que afectan a factores de *splicing* (*SRSF2*) que suelen ser mutuamente excluyentes con la presencia de mutaciones en *TP53* o cariotipos complejos (46,47). Otras mutaciones comúnmente detectadas incluyen a los siguientes genes: *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *CBL*, *RUNX1* y genes de la familia RAS (48-50).

F) SMD inclasificable (SMD-I)

Comprende aquellos casos en los que no se cumplen los criterios diagnósticos de los demás subtipos. Se estima que la incidencia es de 6.3% en aquellos casos de SMD con un recuento de blastos <5% en MO (35). El diagnóstico de SMD-I se puede establecer en los siguientes tres casos:

- Cuando el paciente presenta características distintivas de SMD-DU, SMD-DML, SMD-SA-DU, SMD-SA-DML o SMD con del(5q) aislada pero un porcentaje de blastos en SP superior al 1% (confirmado en al menos dos controles) (3,51).
- Ante la presencia de pancitopenia dentro del contexto de un SMD con otras características propias de SMD-DU, SMD-SA-DU, SMD con del(5q) aislada.
- Si hay citopenia persistente con <2% de blastos en MO y <5% en SP, sin displasia significativa (<10%) en un linaje mielode y la presencia de una alteración citogenética presuntiva de SMD (Tabla 11) (52).

Tabla 11. Alteraciones citogenéticas presuntivas de SMD

Alteraciones no balanceadas	Alteraciones balanceadas
-7 o del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) o t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
-13 o del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)
del(12p) o t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	

Si durante el seguimiento el paciente presenta alguna característica distintiva de otro subtipo de SMD, se debe reclasificar el caso.

La SG y el riesgo de transformación a LMA son muy variables. En aquellos casos con >1% de blastos en SP la mediana de la SG es de 35 meses y hay un riesgo de transformación a LMA del 14% en 5 años. En cambio, en los casos que cursan con pancitopenia la mediana de la SG es de 30 meses y hay un riesgo del 5% de transformación a LMA en 5 años (35).

Tabla 12. Principales características de los SMD según la clasificación de la OMS del 2017 (12).

Subtipo	Número de linajes con displasia	Citopenias	Porcentaje de SA dentro de los elementos eritroides en MO	Blastos en MO y SP
SMD con displasia unilínea (SMD-DU)	1	1-2	<15%/<5%*	MO <5%, SP <1%
SMD con displasia multilínea (SMD-DML)	2-3	1-3	<15%/<5%*	MO <5%, SP <1%
SMD con SA (SMD-SA)				
SMD-SA con displasia unilínea (SMD-SA-DU)	1	1-2	≥15%/≥5%*	MO <5%, SP <1%
SMD-SA con displasia multilínea (SMD-SA-DML)	2-3	1-3	≥15%/≥5%*	MO <5%, SP <1%
SMD con del(5q) aislada	1-3	1-2	Indiferente	MO <5%, SP <1%
SMD con exceso de blastos (SMD-EB)				
SMD-EB-1	0-3	1-3	Indiferente	MO 5%-9%, o SP 2%-4%
SMD-EB-2	0-3	1-3	Indiferente	MO 10%-19%, o SP 5%-19%
SMD inclasificable (SMD-I)				
Con 1% de blastos en SP	1-3	1-3	Indiferente	MO <5%, SP=1%**
Con displasia unilínea y pancitopenia	1	3	Indiferente	MO <5%, SP <1%
Basada en una anomalía citogenética	0	1-3	<15%	MO <5%, SP <1%

* Si la mutación en *SF3B1* está presente ** En dos controles

Abreviaturas: SA: sideroblastos en anillo. SP: sangre periférica. MO: médula ósea. SMD: síndromes mielodisplásicos.

2.4. SMD con del(5q) aislada

En 1974, Van den Berghe *et al.* describieron por primera vez el denominado Síndrome 5q- (53). Este síndrome se definía por la presencia de anemia macrocítica, hipoplasia eritroide, recuento plaquetario normal o elevado, megacariocitos hipolobulados (Figura 4) y la delección aislada del brazo largo del cromosoma 5: del(5q) o 5q-.

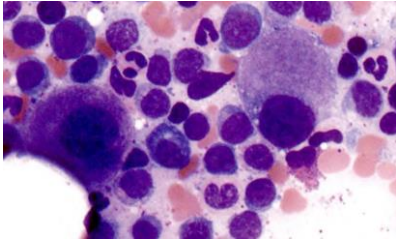


Figura 4. Aspirado de médula ósea donde se aprecian dos micromegacariocitos hipolobulados característicos del Síndrome 5q-.

Con la actualización de la clasificación de la OMS, la definición de los SMD con del(5q) aislada queda redefinida y tiene en cuenta las siguientes características: 1-2 citopenias (típicamente anemia), displasia en 1-3 líneas (comúnmente megacariocítica), ausencia de bastones de Auer, <1% de blastos en SP, <5% de blastos en MO, presencia de la del(5q) en posible concomitancia de una alteración cromosómica adicional siempre y cuando ésta no sea la del(7q) ni -7 (12,54). Cabe destacar que no todos los casos de SMD con del(5q) aislada cumplen las características morfológicas definidas en el Síndrome 5q-. Este subtipo de SMD ocurre con mayor frecuencia en mujeres (media 67 años de edad) y se caracteriza por un riesgo de progresión a LMA relativamente bajo (12).

Es importante destacar que si bien la del(5q) se encuentra presente en alrededor del 20% de los casos de SMD con cariotipo alterado, solo el 5% queda agrupado dentro de la categoría de SMD con del(5q) aislada, ya que el resto de los pacientes presenta un exceso de blastos o numerosas alteraciones citogenéticas, lo que los clasifica en otros subtipos de SMD y hace que empeore el pronóstico de dichos pacientes (55).

La del(5q) comprende un segmento intersticial que incluye una región comúnmente delecionada (CDR, *commonly deleted region*) de 1.5 Mb que abarca las citobandas 5q32 y 5q33 y que contiene 44 genes (56–58). Otra CDR en 5q31 se encuentra más asociada a LMA y casos avanzados de SMD (59) (Figura 5).

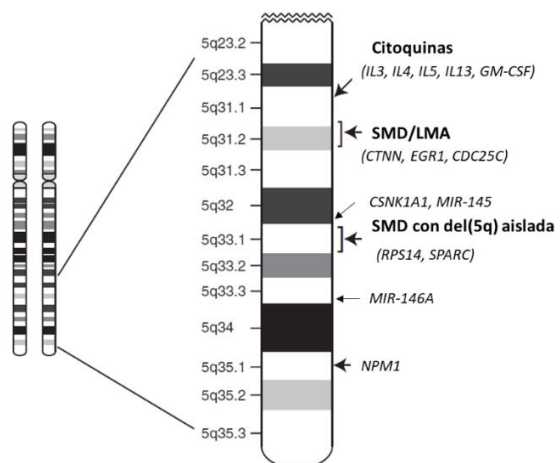


Figura 5. Esquema de las regiones comúnmente delecionadas en la región 5q con sus respectivos genes. SMD: síndromes mielodisplásicos. LMA: leucemia mieloide aguda. Adaptado de Ebert, 2009 (56).

El fenotipo observado en este subtipo de SMD se puede explicar por la haploinsuficiencia, que se traduce en la reducción de la expresión de ciertos genes que se encuentran en la CDR. A lo largo de las últimas décadas, numerosos estudios sobre todo con ARN de interferencia y modelos murinos, han permitido comprender el rol de dichos genes. Los más relevantes se describen brevemente a continuación:

A) *RPS14*: su haploinsuficiencia es responsable, principalmente, del bloqueo de la diferenciación eritroide, lo que conlleva una eritropoyesis ineficaz y anemia. Dicho gen codifica para el componente central de la subunidad 40S del ribosoma. La insuficiencia alélica de *RPS14* conlleva defectos en el ensamblaje de los ribosomas, lo cual hace que se liberen pequeñas proteínas ribosomales que se unen a la proteína MDM2 (regulador negativo de p53) promoviendo su degradación y la consecuente estabilización de p53. Esto a su vez desencadena la activación de la transcripción de genes dependientes de p53 resultando en la detención del ciclo celular y apoptosis (60–62). En la figura 6 se ilustra este proceso.

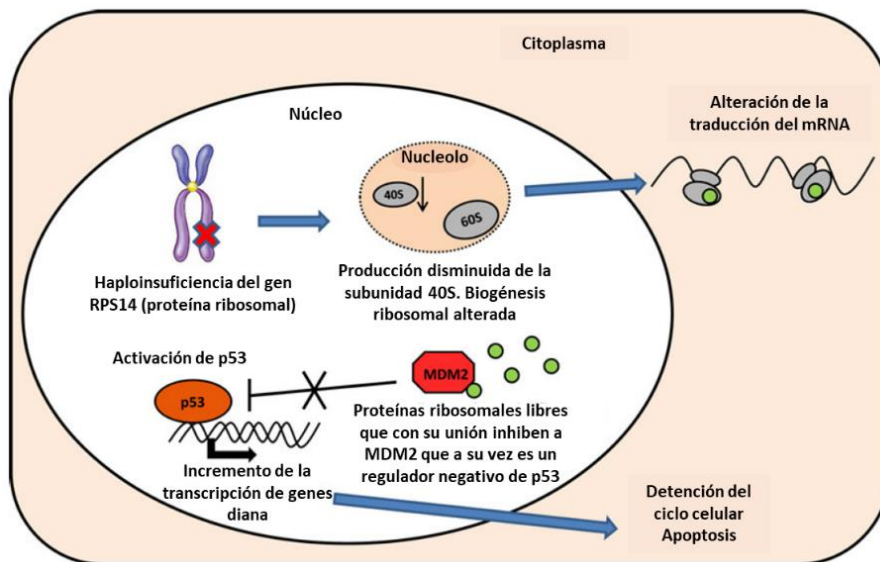


Figura 6. Consecuencias de la haploinsuficiencia de *RPS14*. Adaptado de Pellagatti y Boulwood, 2015 (63).

B) *miR-145* y *miR-146a*: micro-ARNs responsables de la regulación negativa de factores como *TIRAP*, *TRAF6* o *FLI-1* que a su vez regulan la diferenciación megacariocítica. La deficiencia de *miR-145* y *miR-146a* es responsable de la trombocitosis y de la displasia megacariocítica (micromegacariocitos hipolobulados) que caracterizan al Síndrome 5q- (64,65).

C) *CSNK1A1*: actúa como regulador negativo de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y de la actividad de p53. Cuando la vía de señalización Wnt/ β -catenina se activa, se promueven el crecimiento y proliferación celular, mientras que la vía de p53 regula el ciclo celular y la apoptosis (66).

En los SMD con del(5q), la haploinsuficiencia de *CSNK1A1* resulta en mayores niveles de β -catenina, lo cual a su vez incrementa los niveles de proliferación de progenitores hematopoyéticos sin alterar los niveles de p53 (66). En cambio, si se produce una pérdida homocigota (ambos alelos) de *CSNK1A1*, se induce la apoptosis mediada por p53. Estos hechos juegan un papel importante en el mecanismo de acción de la lenalidomida, actual fármaco de elección en el tratamiento de los SMD con del(5q) (Figura 7).

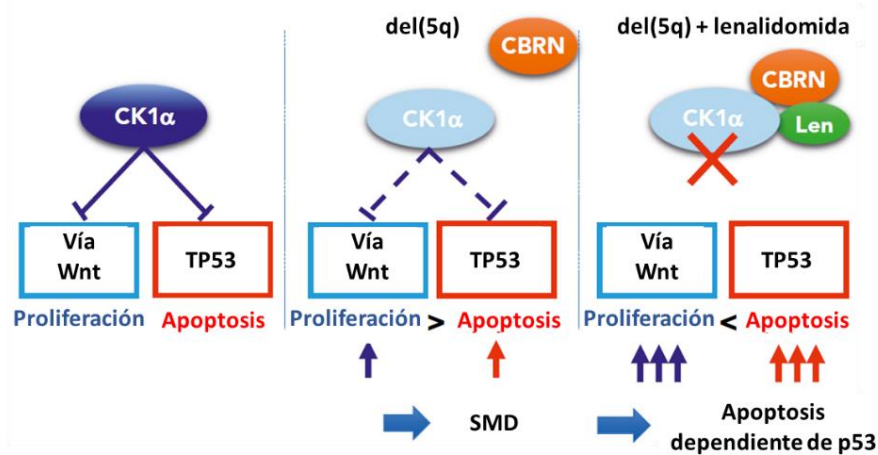


Figura 7. Efectos de la haploinsuficiencia de *CSNK1A1* en la vía de señalización Wnt y en la activación de *TP53* y su implicancia en el mecanismo de acción de la lenalidomida en las células con la del(5q). Adaptada de Ogawa, 2019 (67).

Lenalidomida – Mecanismo de acción y resistencia al tratamiento

Si bien se sabía que la lenalidomida es un potente inmunomodulador capaz de inhibir la angiogénesis, adhesión celular y modular la liberación de citoquinas, no fue hasta el 2015 que Krönke *et al.* describieron el mecanismo de acción de este fármaco (68). La lenalidomida se une a la proteína CRBN (que forma parte del complejo CRL4 E3 ubiquitina ligasa) y modula la afinidad por sus sustratos induciendo la ubiquitinización de los mismos y la consecuente degradación en el proteasoma. CK1α, proteína codificada en el gen *CSNK1A1*, es uno de los sustratos de CRBN cuya afinidad se ve incrementada por la lenalidomida. La degradación de CK1α es bien tolerada en células normales, pero mata selectivamente a aquellas portadoras de la del(5q), ya que expresan niveles haploinsuficientes del gen *CSNK1A1*. Concretamente, la lenalidomida promueve la detención del ciclo celular y apoptosis mediada por p53 en aquellas células con niveles reducidos de CK1α (69,70) (Figura 7).

A nivel clínico, la lenalidomida reduce los requerimientos transfusionales y revierte los cambios citológicos y citogenéticos en los pacientes con SMD con del(5q) (71). Desde el 2013 está aprobado su uso en Europa para el tratamiento de los pacientes con SMD con del(5q) aislada y dependencia transfusional (4 concentrados de hematíes en 16 semanas, de acuerdo con las últimas recomendaciones) y un 70% de estos pacientes responden a dicho tratamiento (71,72).

Si bien el tratamiento con lenalidomida se asocia a una mejora en la SG, hay factores que pueden afectar la respuesta a dicho fármaco (73), entre ellos se incluyen:

- **Trombocitopenia basal:** los niveles de plaquetas por debajo de 280 g/L se asocian a menores tasas de independencia transfusional y SG reducida (74,75).
- **Mutaciones en el gen *TP53*:** su presencia se ha visto asociada a menores tasas de respuesta citogenética, mayor riesgo de progresión a LMA y menor SG (75–77). Dicha mutación puede encontrarse hasta en un 20% de los casos de SMD con del(5q) aislada. Se hace mayor referencia a la implicancia de las mutaciones de *TP53* en el tratamiento en el apartado 2.8.3.

- **del(5q) con otras alteraciones citogenéticas:** aunque en Europa la lenalidomida está solamente aprobada en pacientes con del(5q) aislada, también se ha evaluado la respuesta a este tratamiento en pacientes con del(5q) que presentan otras alteraciones citogenéticas acompañantes. La presencia de al menos dos alteraciones citogenéticas adicionales a la del(5q) se asocia a una menor adquisición de independencia transfusional, menor respuesta citogenética y mayor riesgo de progresión a LMA. Sin embargo, los resultados en cuanto al pronóstico de los pacientes con solo una alteración citogenética adicional es más controvertido: algunos señalan que la respuesta es similar mientras que otros sugieren una menor respuesta en este grupo (73,74).

2.5. Alteraciones citogenéticas en los SMD

Alrededor del 40-50% de los pacientes con SMD *de novo* y hasta el 80% de los pacientes con SMD secundario presenta alguna alteración a nivel citogenético. La mayoría de ellas implica la pérdida de material genético ya sea en forma de una deleción (pérdida parcial de un cromosoma) o una monosomía (pérdida total de un cromosoma). La ganancia de material genético (con excepción de la +8), así como las translocaciones e inversiones son muy poco frecuentes en los SMD (78,79).

Las alteraciones más frecuentes son la del(5q) (15%), -7/del(7q) (10%), +8 (8%) y la del(20q) (5%) (78,79). Otras alteraciones descritas, aunque menos frecuentes son: -Y, -17/17p- y -18/18q- (79). Cabe destacar que ninguna de ellas es específica de los SMD, pudiendo encontrarse así en otras patologías, especialmente la LMMC. En la figura 8 se detallan las alteraciones cromosómicas más comunes junto con la incidencia de cada una.

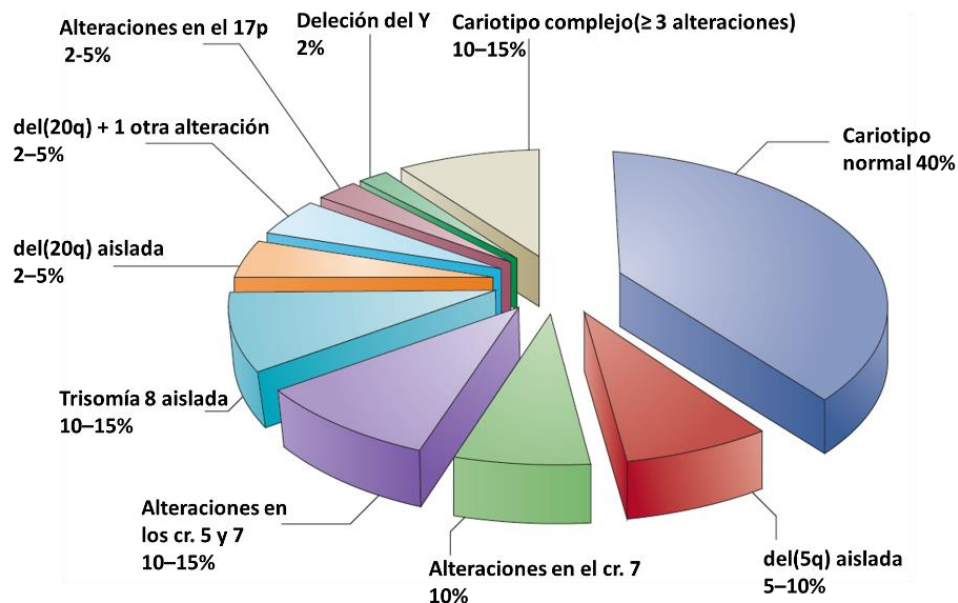


Figura 8. Incidencia de las alteraciones citogenéticas más comunes en los síndromes mielodisplásicos. Abreviatura: cr: cromosoma. Adaptado de Raza y Galili, 2012 (80).

Las alteraciones citogenéticas pueden presentarse aisladas, en combinación con otra alteración adicional o varias alteraciones. Cuando coexisten 3 o más alteraciones, se habla de un cariotipo complejo (81). Se ha demostrado que tanto el tipo como el número de alteraciones citogenéticas adquiridas constituyen un factor pronóstico independiente en los SMD (79,82).

En el 2012, tras estudiar 2902 pacientes, Schanz *et al.* proponen el actual *score* citogenético que incluye 5 grupos de riesgo y 20 diferentes alteraciones citogenéticas (Tabla 13).

Tabla 13. Clasificación pronóstica de las alteraciones citogenéticas propuesta por Schanz *et al.* (15).

Grupo pronóstico	Alteraciones citogenéticas*	Supervivencia media (en años)
Muy bueno	-Y, del(11q)	5.4
Bueno	Cariotipo normal, del(5q), del(12p), del(20q), doble que incluya la del(5q)	4.8
Intermedio	del(7q), +8, +19, i(17q), cualquier otra alteración aislada o doble en clones independientes	2.7
Malo	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), alteración doble que incluya -7/del(7q), complejo: 3 alteraciones	1.5
Muy malo	Complejo: > 3 alteraciones	0.7

*Todas como una única alteración a no ser que se especifique lo contrario

2.6. Pronóstico de los SMD

2.6.1. *Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R)*

La gran heterogeneidad de los SMD hace necesaria la clasificación y categorización pronóstica de los pacientes para poder estimar la SG y el riesgo de progresión a LMA y de esta manera poder seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente.

Si bien, desde que surge el primer sistema de clasificación de los SMD (clasificación FAB, 1982), han habido varias propuestas de sistemas pronósticos (33,83), el más utilizado actualmente es el *Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R)* (13).

Cabe mencionar que el mismo es la versión actualizada del *International Prognostic Scoring System (IPSS)* que estuvo vigente desde 1997 hasta el 2012 cuando surgió la versión revisada (83). Ambos sistemas se basan en tres parámetros básicos: el cariotipo en MO, el porcentaje de blastos en MO y las citopenias. No obstante, estudios en cohortes de pacientes más extensas (816 pacientes en el IPSS vs. 7012 pacientes en el IPSS-R) han proveído las bases para introducir ciertos refinamientos al IPSS. Los mismos incluyen principalmente el establecimiento de puntos de corte más claros para definir las citopenias (el IPSS solo tenía en cuenta la presencia y número de citopenias) y la incorporación de una nueva clasificación pronóstica de las alteraciones citogenéticas (Tabla 13) (55).

Así se tiene que el IPSS-R se basa en cinco variables pronósticas: citogenética, porcentaje de blastos en MO, nivel de hemoglobina, recuento de plaquetas y recuento absoluto de neutrófilos (RAN). De acuerdo a los valores de cada uno de los cuatro últimos parámetros, se asigna una puntuación o *score* (Tabla 14).

En lo que respecta a la citogenética, se tiene en cuenta el sistema de *score* citogenético propuesto por Schanz *et al.* en el 2012 (Tabla 13). Como se ha comentado anteriormente, este sistema distingue cinco grupos pronósticos a los que se ha asociado una puntuación dentro del sistema IPSS-R (Tabla 14).

Tabla 14. Variables pronósticas con sus respectivos scores (13).

Variable pronóstica	Puntuación						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Citogenética	Muy buena	-	Buena	-	Intermedio	Malo	Muy malo
% blastos MO	≤ 2%	-	> 2% - < 5%	-	5-10%	>10	-
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10	-	8 - < 10	< 8	-	-	-
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	≥ 100	50 - < 100	<50	-	-	-	-
RAN (x10 ⁹ /L)	≥ 0,8	< 0,8	-	-	-	-	-

Abreviaturas: MO: médula ósea. RAN: recuento absoluto de neutrófilos.

En la tabla 15 se mencionan los cinco grupos pronósticos que resultan de la suma de cada una de las variables anteriormente mencionadas y en la figura 9 la SG y el riesgo de progresión a LMA de cada uno de los cinco grupos pronóstico del IPSS-R.

Tabla 15: Grupos pronóstico de riesgo según el IPSS-R (13).

Grupo de riesgo	Puntuación total
Muy Bajo	≤ 1.5
Bajo	> 1.5 - 3
Intermedio	> 3 - 4.5
Alto	> 4.5 - 6
Muy Alto	> 6

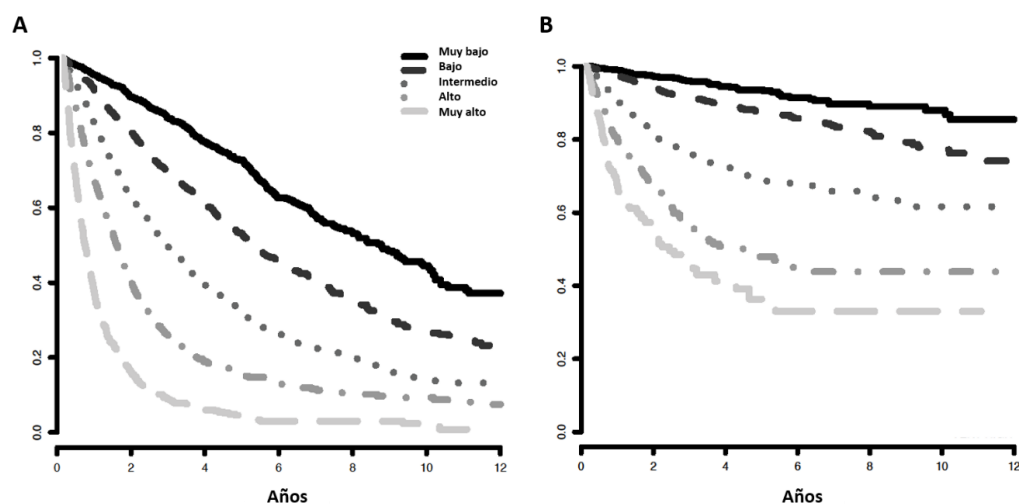


Figura 9. A) Supervivencia global basada en los grupos de riesgo del IPSS-R; B) Riesgo de progresión a leucemia mieloide aguda basada en los grupos de riesgo del IPSS-R. Adaptado de Greenberg *et al.*, 2012. (13).

2.7. Tratamiento de los SMD

Dada la alta heterogeneidad de los SMD, la selección del tratamiento más indicado para cada paciente se basa principalmente en el riesgo. Como ya se mencionó en el apartado 2.6, la herramienta más utilizada para estratificar a los pacientes según el riesgo es el IPSS-R, que tiene en cuenta los recuentos hematológicos, porcentaje de blastos en MO y cariotipo. Otro factor a

considerar al momento de elegir el tratamiento más adecuado son las necesidades transfusionales. Además, los estudios llevados a cabo durante la última década sugieren que los perfiles mutacionales podrían predecir la respuesta a ciertos tratamientos (37,84,85).

El tratamiento basado en el riesgo tiene como objetivos disminuir las necesidades transfusionales y disminuir la tasa de progresión a LMA en aquellos pacientes con SMD de bajo riesgo. Por el contrario, en el caso de los SMD de alto riesgo, los tratamientos se enfocan en prolongar la supervivencia de los pacientes (25).

Actualmente, el único tratamiento que ofrece posibilidad de curación es el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, dado que la media de edad de diagnóstico de los pacientes con SMD es de alrededor de 70 años y que comúnmente presentan comorbilidades asociadas, la mayoría de ellos no son candidatos a trasplante. En la figura 10 se resume el esquema terapéutico de los SMD.

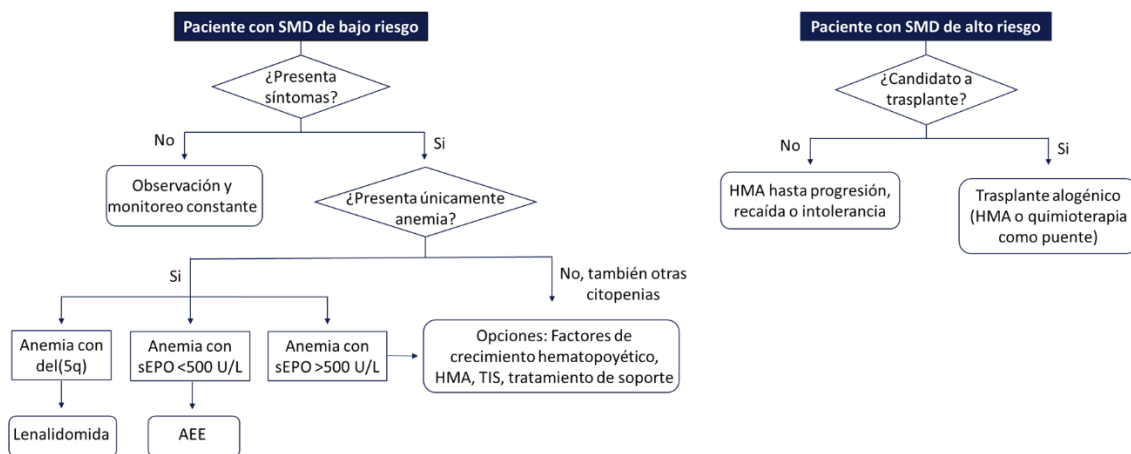


Figura 10. Estrategia terapéutica según el riesgo en pacientes con SMD. Abreviaturas: sEPO: eritropoyetina sérica. AEE: agente estimulante de la eritropoyesis. HMA: agentes hipometilantes. TIS: tratamiento inmunosupresor. Adaptado de Steensma, 2015 y Steensma, 2018 (86,87).

Cuando el paciente no presenta síntomas, se opta por una observación y monitorización constante. Sin embargo, en la mayoría de los casos de SMD de bajo riesgo, los síntomas vienen derivados comúnmente como consecuencia de la anemia, motivo por el cual se estima que el 40% de los pacientes de bajo riesgo y cerca del 60-80% de los pacientes de alto riesgo requieren un soporte transfusional (86). Esto deriva en el uso de quelantes, ya que las transfusiones periódicas provocan una sobrecarga férrica que puede generar daño orgánico (88).

Hay dos factores importantes a la hora de decidir la terapia más adecuada en los SMD de bajo riesgo: los niveles séricos de eritropoyetina (sEPO) y el cariotipo. Se ha visto que los niveles bajos de sEPO se correlacionan con mayores tasas de respuesta al tratamiento con agentes estimulantes de la eritropoyesis, es por eso que constituyen el tratamiento de elección en aquellos pacientes con sEPO < 500 U/L (87). En los pacientes con del(5q), como se ha comentado anteriormente, la lenalidomida (análogo de la talidomida, con capacidad inmunomoduladora y antiangiogénica) ha demostrado ser efectiva permitiendo alcanzar tasas de independencia transfusional del 67%, con una duración de 2.2 años, y un 73% de los pacientes con respuesta citogenética (71). En el caso de anemias más severas o de que existan otras citopenias asociadas, la estrategia a seguir no es muy clara. La neutropenia se presenta con una incidencia aproximada del 45%. En estos casos se usan antibióticos de forma profiláctica o factores estimulantes de

colonias de granulocitos, aunque ningún estudio ha demostrado que puedan mejorar las tasas de supervivencia (89). En el caso de las trombopenias, se pueden realizar transfusiones de concentrados de plaquetas o emplear análogos de la trombopoyetina que pueden reducir las necesidades de transfusiones y hemorragias (90,91).

Dada la eficacia limitada de los factores de crecimiento mencionados anteriormente, la terapia inmunosupresora o los agentes hipometilantes (HMA) son frecuentemente considerados en estos pacientes, especialmente tras el fracaso con los factores estimulantes de la eritropoyesis y la lenalidomida (92,93).

En el caso de los pacientes con SMD de alto riesgo (Figura 10) hay básicamente dos opciones: el trasplante de progenitores hematopoyéticos o el tratamiento con HMA. Como ya se ha mencionado, únicamente el trasplante ofrece posibilidades de curación. Sin embargo, solo se puede llevar a cabo en casos muy selectos donde básicamente la edad y el donante apropiado son los principales impedimentos. Es por esto que la mayoría de los pacientes de alto riesgo se tratan con HMA como la azacitidina y la decitabina. Hoy en día, la azacitidina está aprobada en Europa para su uso en pacientes con SMD. La decitabina solo está aprobada para su uso en SMD por la FDA (*Food and Drug Administration*, Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos), mientras que la EMA (*European Medicines Agency*, Agencia Europea de Medicamentos) limita su uso a los casos de LMA. Ante el fallo de las terapias estándar, se pueden considerar ensayos clínicos que prueban combinaciones de los fármacos mencionados anteriormente.

2.8. Mutaciones somáticas en los SMD

Gracias al gran avance que han experimentado las técnicas de secuenciación a lo largo de la última década, hemos podido comprender que los SMD son el resultado, en parte, de la adquisición secuencial de mutaciones somáticas. Entre el año 2011 y el 2014, tres grandes estudios realizados en cohortes de al menos 439 pacientes con SMD, han aportado conocimientos clave en la genética de esta enfermedad (36,37,84). De ellos sabemos que hasta un 90% de los pacientes con SMD portan al menos alguna mutación somática (36). Si bien el espectro de genes que pueden estar mutados es bastante amplio, estos se pueden agrupar en un número limitado de categorías según el proceso celular que se ve afectado. En los siguientes apartados y en la figura 11 se comentan brevemente dichas categorías y en la tabla 16 se resumen los genes más frecuentemente mutados en los SMD.

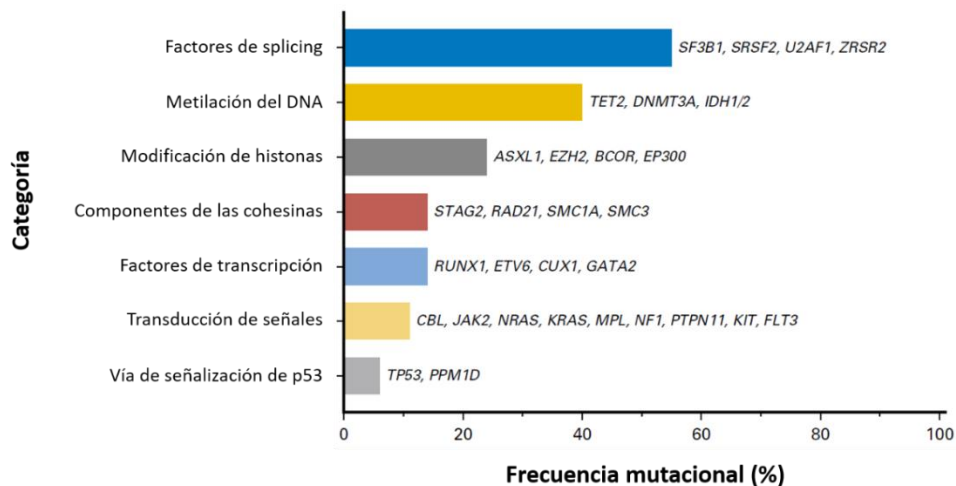


Figura 11. Genes frecuentemente mutados en los síndromes mielodisplásicos según el tipo de función celular implicado. Adaptación de Kennedy y Ebert, 2017 (94).

A) Factores de *splicing*: comprenden un grupo de genes que codifican para los componentes del spliceosoma. Éste es un complejo proteico cuya función es la eliminación de intrones y ligación de exones en el proceso de generación de moléculas de ARN mensajero maduro a partir del pre-ARN durante el proceso de transcripción genética. Al producirse una mutación en estos componentes, se altera el proceso de *splicing*, pudiendo dar lugar a la incorporación inapropiada de intrones o exones generando así proteínas aberrantes que pueden alterar la diferenciación normal de la célula y en consecuencia dar lugar a fenotipos displásicos (95).

Hasta un 60% de los casos de SMD puede presentar una mutación en alguno de los componentes del spliceosoma, principalmente *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2*. Suelen ser mutaciones heterocigotas de tipo puntuales (*missense*) y son generalmente mutuamente excluyentes entre sí (44,94).

B) Reguladores epigenéticos: comprenden el segundo grupo de genes más frecuentemente mutados en los SMD. Dentro de esta categoría se incluyen los genes involucrados en la metilación del ADN y modificación de histonas.

- **Factores de metilación del ADN:** son genes involucrados en el ciclo de metilación del ADN. La metilación del ADN se da principalmente en las islas CpG, donde se encuentran los promotores génicos, y en las regiones intra- e intergénicas donde se encuentran los *enhancers* (elementos reguladores potenciadores). Las alteraciones en los patrones de metilación conllevan cambios que dan lugar a una alteración en la expresión génica. Concretamente, en los SMD suelen observarse patrones de hipermetilación en genes que controlan procesos como la proliferación y adhesión en las células madre hematopoyéticas. También se ha reportado que mediante este mecanismo se pueden silenciar genes supresores de tumores o genes involucrados en la reparación de daños en el ADN (63,95).

Los genes más comúnmente afectados son *TET2* y *DNMT3A*, que suelen presentar mutaciones que cambian la pauta de lectura (*frameshift*) o que generan un codón *stop* prematuro (*nonsense*). Conjuntamente con las mutaciones en los factores de *splicing*, *ASXL1* y *TP53*, representan los *targets* más comunes en CHIP, hecho que sugiere que estas mutaciones podrían tener un rol en el inicio de la enfermedad y por ende considerarse eventos fundadores (67).

- **Modificación de las histonas:** las histonas son pequeñas proteínas alrededor de las cuales se empaqueta el ADN formando los nucleosomas que a su vez constituyen las unidades básicas de la cromatina. Las histonas son susceptibles de modificaciones postraduccionales, tales como la acetilación, metilación y ubiquitinización, que son mediadas por un grupo de enzimas que se encuentran comúnmente mutadas en los SMD. Dentro de ellas, destacan *ASXL1* y *EZH2*, cuyas mutaciones suelen estar asociadas a una pérdida de función.

C) Componentes del complejo de las cohesinas: *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG1* y *STAG2* conforman el complejo de las cohesinas. Este grupo de proteínas está implicado en una

serie de funciones tales como la unión de las cromátidas hermanas durante la mitosis, la reparación post replicativa del ADN y la regulación transcripcional. Las mutaciones en los genes que codifican para dichas proteínas suelen ser deleciones o mutaciones puntuales mutuamente excluyentes que se asocian a una pérdida de función (63,94).

- D) Factores de transcripción:** el mantenimiento de las células madre junto con la diferenciación hematopoyética implica la activación y la expresión génica de ciertos programas específicos de linajes. Este proceso está mediado por factores de transcripción como *RUNX1*, *GATA2* o *ETV6*, que suelen estar mutados en los SMD (94,95).
- E) Moléculas implicadas en la transducción de señales:** cuando llega una señal (ligando) a un receptor de la superficie celular, se activa una cascada reacciones intracelulares (transducción de señales) para que finalmente en el núcleo se active o reprima la transcripción de genes implicados en la proliferación celular o la apoptosis. Las mutaciones en los componentes de las vías de señalización generalmente provocan la activación constitutiva en ausencia del ligando y se asocian a un fenotipo que promueve la proliferación celular. Ocurren en una frecuencia relativamente baja en los SMD (10-15% aproximadamente) en comparación con otras neoplasias mieloides (96). Dentro de este grupo se incluyen principalmente a las moléculas implicadas en la vía RAS (*NRAS*, *KRAS*), *JAK2*, *CBL* y otras. Pueden ser mutaciones de tipo *missense* o pequeñas inserciones/deleciones pero que en ambos casos conducen a la activación constitutiva de la correspondiente vía de señalización (94).
- F) Vía de señalización de *TP53*:** es un gen supresor de tumores y también un factor de transcripción que responde al estrés celular activando mecanismos de protección que inducen apoptosis, detenimiento del ciclo celular y reparación de daños en el ADN. Pese a que en los SMD *de novo* se encuentra mutado en una frecuencia del 10%, un 30-50% de estos casos presenta cariotipos complejos (84). Cabe destacar que se encuentra mutado en un 20% en los casos de SMD con del(5q) aislada y en los casos de SMD secundarios puede alcanzar una frecuencia de hasta el 40% (76,97). Generalmente se observan mutaciones heterocigotas de tipo *missense*.

Tabla 16. Mutaciones somáticas más recurrentes en los SMD. Adaptada de Kennedy y Ebert, 2017; Ganguly y Kadam, 2016; Maciejewski y Padgett, 2012 (94,95,98).

Gen	Localización cromosómica	Frecuencia	Función	Pronóstico	Fenotipo clínico asociado
Factores de Splicing					
<i>SF3B1</i>	2q33.1	20%	Subunidad del spliceosoma	Favorable	Común en SMD-SA. Co-mutado con <i>DNMT3A</i>
<i>SRSF2</i>	17q25.1	12%	Unión al ARN y regulación del <i>splicing</i>	Adverso	Predomina en hombres de edad avanzada y frecuentemente co-existe con mutaciones en <i>RUNX1</i> , <i>IDH1</i> , <i>ASXL1</i>
<i>U2AF1</i>	21q22.3	7%	Reconocimiento de la zona de <i>splicing</i> en 3'	Adverso	Frecuentemente encontrado en pacientes con del(20q) y mutaciones en <i>ASXL1</i>
<i>ZRSR2</i>	Xp22.1	3%	Reconocimiento de la zona de <i>splicing</i> en 3'	Incierto	Predomina en hombres. Se asocia con neutropenia y suele estar co-mutado con <i>TET2</i>
Factores de metilación del ADN					
<i>DNMT3A</i>	2p23	8%	ADN metiltransferasa: cataliza la incorporación del grupo metilo a las islas CpG	Adverso	Infrecuente en cariotipo normal. Mayor riesgo de progresión a LMA
<i>TET2</i>	4q24	20%	Dioxigenasa. Desmetilación de las islas CpG	Incierto	Común en edad avanzada y cariotipo normal. Asociado a respuesta a hipometilantes
Modificación de las histonas					
<i>ASXL1</i>	20q11	10-20%	Proteína de unión a la cromatina. Implicada en la metilación de histonas.	Adverso	Exceso de blastos, IPSS-R intermedio, menor supervivencia global, mayor riesgo de progresión a LMA
<i>EZH2</i>	7q35-36	7%	Modificador de las histonas	Adverso	Pérdida de heterocigosidad o microdeleción en el 7q, peor pronóstico en SMD de bajo riesgo
Componentes del complejo de las cohesinas					
<i>STAG2</i>	Xq25	1-10%	Regulación de la separación de las cromátidas hermanas durante la división celular	Adverso	Asociado con displasia multilínea y exceso de blastos
Factores de transcripción					

BCOR	Xp11.4	<5%	Represor de la transcripción, podría inducir apoptosis	Adverso	Asociado a displasia multilinea y a exceso de blastos
ETV6	12p13	2-5%	Factor de transcripción necesario para la hematopoyesis	Adverso	En algunos casos, de origen germinal y asociado a trombocitopenia familiar
GATA2	3q21.3	<5%	Implicado en el desarrollo y la proliferación de células hematopoyéticas	Incierto	En la mayoría de los casos de origen germinal donde genera predisposición familiar a SMD y LMA
RUNX1	21q22.3	10-15%	Factor de transcripción clave en la hematopoyesis	Adverso	Trombocitopenia, SMD de alto riesgo, común en SMD secundario a tratamientos, mayor riesgo de evolución a LMA
Moléculas implicadas en la transducción de señales					
NRAS	1p13.2	10%	Enzima constitucionalmente activa cuando se encuentra mutada. Implicada en vías que controlan el crecimiento celular	Adverso	Asociado a un mayor riesgo de transformación a LMA
JAK2	9p24	5%	Enzima de tipo tirosin-quinasa implicada en ciclo celular, apoptosis y recombinación mitótica	Adverso	Mayor recuento plaquetario, proliferación megacariocítica
CBL	11q23.3	1%	Enzima implicada en ubiquitinización y señalización celular	Incierto	Frecuente en LMMC. Asociado a la pérdida de heterocigosidad en 11q
Vía de señalización de TP53					
TP53	17p13.1	10%	Supresor de tumores que regula la apoptosis, ciclo celular, reparación del ADN, senescencia y metabolismo	Adverso	Cariotipos complejos, SMD asociado a la del(5q), SMD secundario a tratamientos, menor respuesta a la lenalidomida. Mayor riesgo de progresión a LMA
Otras					
SETBP1	18q21.1	4%	Implicado en replicación del ADN y división celular	Adverso	Co-ocurrencia con mutaciones en <i>ASXL1</i> , -7/del(7q)

Abreviaturas: ADN: ácido desoxirribonucleico. ARN: ácido ribonucleico. IPSS-R: *Revised International Prognostic Scoring System*. LMA: Leucemia mieloide aguda. LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica. SA: sideroblastos en anillo. SMD: síndromes mielodisplásicos.

Ahora bien, ninguna de estas mutaciones es específica de los SMD, ya que se ha visto que los mismos genes pueden estar afectados dentro del contexto de otras neoplasias mieloides, sobre todo en la LMMC, las NMP y la LMA e incluso en personas sanas con CHIP.

En los siguientes apartados se describirá el papel que tienen las mutaciones somáticas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los SMD.

2.8.1. Implicación en el diagnóstico

Hoy por hoy, la mutación en el gen *SF3B1* es la única que se tiene en cuenta dentro de los criterios diagnósticos de la OMS. Tal como se ha comentado en el apartado 2.3.3, la detección de dicha mutación puede establecer el diagnóstico de SMD-SA cuando los SA representan tan solo el 5% de las células nucleadas eritroides en un aspirado de MO, comparado con el *cut-off* tradicional de 15% (12).

2.8.2. Implicación en el pronóstico

Si bien el IPSS y el IPSS-R son las herramientas más utilizadas para predecir el pronóstico de los pacientes con SMD, hay algunos casos en los cuales la evolución del paciente difiere del pronóstico inicialmente esperado de acuerdo al IPSS/IPSS-R. En algunos casos, esta diferencia puede explicarse por la presencia de ciertas mutaciones. Tal es el caso de los pacientes con SMD con del(5q) aislada que suelen caer en la categoría de muy bajo o bajo riesgo. Se ha descrito que aproximadamente el 20% de estos pacientes presenta alguna mutación somática en el gen *TP53*, hecho que se ha visto asociado a un mayor riesgo de progresión a LMA y baja SG en comparación a aquellos pacientes que no presentan la mutación (73,99).

Independientemente del subtipo de SMD, se ha visto que la presencia de mutaciones en el gen *TP53* confiere un pronóstico adverso a los pacientes. Esta mutación se asocia a trombocitopenia, recuento elevado de blastos y cariotipos complejos (84). En un estudio reciente llevado a cabo por Haase *et al.* donde estudiaron el impacto de las mutaciones somáticas en los cariotipos complejos, vieron que los pacientes con la mutación de *TP53* y cariotipo complejo presentaban una SG significativamente menor que aquellos que solo poseían un cariotipo complejo en ausencia de la mutación (100).

A día de hoy, principalmente los resultados de tres estudios que han analizado el impacto pronóstico de las mutaciones en grandes cohortes de pacientes con SMD, proveen los siguientes datos:

- A medida que el número de mutaciones somáticas incrementa, el pronóstico de los pacientes con SMD empeora progresivamente, así como la probabilidad de transformación a LMA (36,37,84).
- Las mutaciones en *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1*, *ASXL1* y *SRSF2* son capaces de predecir una baja SG. Esta capacidad de predicción es independiente del pronóstico conferido en base al IPSS-R (Figura 12) (84,85).
- Por el contrario, los pacientes con mutaciones en el gen *SF3B1* presentan mayores tasas de SG y menor probabilidad de progresión a LMA (28,36,37,84).

Actualmente, el *International Working Group for Prognosis in MDS* (IWG-PM) está llevando a cabo un estudio para la incorporación de los datos moleculares al modelo actual del IPSS-R.

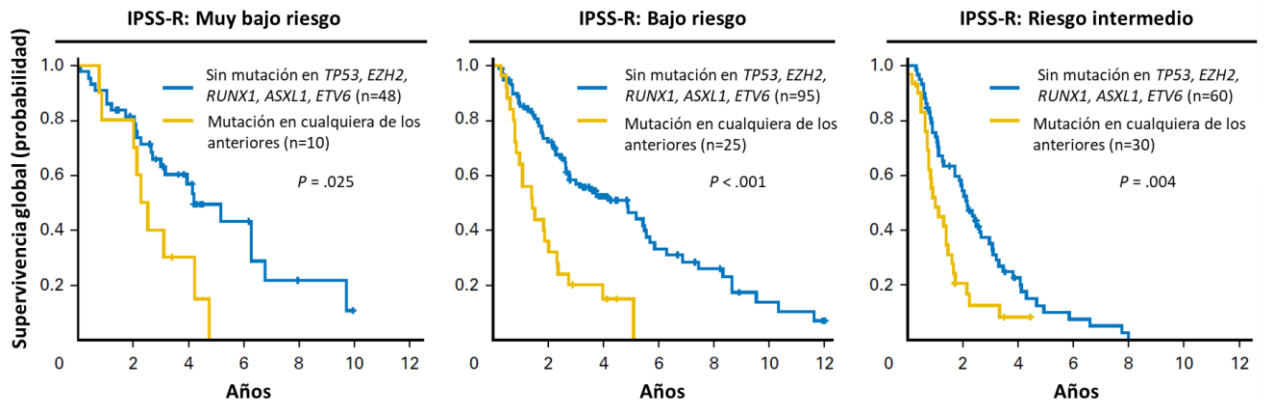


Figura 12. Curvas comparativas de la supervivencia global en pacientes con una o más mutaciones en *TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *ASXL1* o *ETV6* (curvas amarillas) con pacientes dentro de la misma categoría del IPSS-R sin mutaciones en dichos genes (curvas azules). Adaptado de Kennedy y Ebert, 2017 (14,94).

2.8.3. Implicación en el tratamiento

Se ha visto que además de conferir un pronóstico adverso, las mutaciones en el gen *TP53* se asocian a menores tasas de respuesta a la lenalidomida y mayor riesgo de progresión a LMA en los pacientes con SMD con del(5q) aislada (75,76,101). De hecho, en su nueva revisión, la OMS recomienda analizar el estado mutacional de este gen con el fin de determinar si el paciente es candidato al tratamiento con dicho fármaco (3).

En cuanto al tratamiento con hipometilantes, hay estudios que han encontrado una asociación entre la presencia de mutaciones en el gen *TET2* y mejores tasas de respuesta. Por el contrario, otros estudios describen menores tasas de respuesta en los casos con mutaciones en el gen *DNMT3A* (102,103).

Por su parte, el estudio más grande que analizó el valor pronóstico de las mutaciones en los pacientes con SMD sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos, concluyó que las mutaciones en *TP53*, *JAK2* y las que afectan a la vía RAS se asocian a una menor SG post trasplante (104). Las mutaciones en *TP53* también se asociaron un menor tiempo de recaída. Otros estudios, aunque con series más pequeñas e inclusión de casos con LMA o SMD/NMP, han reportado la asociación de las mutaciones en *ASXL1*, *RUNX1*, *TET2* y *DNMT3A* con menores tasas de SG post trasplante (105–107).

Si bien la detección de mutaciones mediante NGS podría predecir la duración de la respuesta a ciertos tratamientos, en la actualidad dicha información no se puede usar para seleccionar esquemas terapéuticos en los pacientes con SMD. El incremento del uso de la NGS en los laboratorios clínicos, junto con el conocimiento acerca de los mecanismos biológicos y bioquímicos detrás de estas mutaciones está creando la oportunidad de desarrollar nuevos fármacos o combinaciones dirigidas contra estas mutaciones. En la tabla 17 se citan algunos de ellos que actualmente se encuentran en fase de ensayo clínico (99).

Tabla 17. Posibles futuras terapias dirigidas contra mutaciones específicas en los SMD. Información extraída de Spaulding *et al.*, 2019 (99).

Fármaco/molécula	Diana terapéutica	Comentario
H3B-8800	Interactúa con el complejo SF3B y tiene como diana células con mutaciones en factores de <i>splicing</i>	Ensayo clínico en fase I/II
Luspatercept	Mutaciones en el gen <i>SF3B1</i>	Ensayo clínico multicéntrico fase II
APR-246	Mutaciones en <i>TP53</i> . Se ha visto que es capaz de restaurar la expresión <i>wild-type</i> de <i>TP53</i>	Ensayo clínico fase Ib/II, en combinación con azacitidina. Inicio de ensayo fase III
Enasidenib	Mutaciones en <i>IDH2</i>	Actualmente aprobado en casos de LMA en recaída, podría ser útil en pacientes con SMD
Midostaurina y gilteritinib	Inhibidores de <i>FLT3</i>	Hay ensayos que sugieren que podría usarse en combinación con los tratamientos convencionales

Abreviaturas: SMD: síndromes mielodisplásicos. LMA: leucemia mieloide aguda.

2.9. Heterogeneidad intratumoral y arquitectura clonal de los SMD

El cáncer es un proceso dinámico que resulta de la adquisición secuencial de mutaciones que confieren a las células una ventaja proliferativa junto con la capacidad de evadir los mecanismos que regulan el crecimiento celular y la apoptosis (108). El término heterogeneidad intratumoral (HIT) hace referencia a la coexistencia de diferentes subpoblaciones celulares dentro de un tumor, resultantes de las diferencias a nivel genético, transcriptómico, epigenético y cambios fenotípicos (109).

Esta heterogeneidad intratumoral genera el entorno óptimo sobre el cual actúa la selección y evolución Darwiniana promoviendo la evolución clonal. Debido a la inestabilidad genética, a la cual se suman las características genéticas propias del paciente, factores del microambiente y factores externos (fármacos y radiaciones), van emergiendo de manera secuencial subpoblaciones celulares cada vez más heterogéneas genéticamente distintas entre sí (110,111). Este concepto se introdujo en 1976 por Peter Nowell, quien basándose en la evidencia derivada de estudios citogenéticos en distintas neoplasias, propuso la teoría de la evolución clonal de las poblaciones celulares de un tumor (112).

La teoría de Nowell propone que una neoplasia se inicia a partir de un cambio en una sola célula (previamente normal) el cual le confiere una ventaja proliferativa. Dentro de los estudios en los que basó su teoría destacan las observaciones realizadas en la LMC (en aquel entonces, denominada leucemia granulocítica crónica) donde la aparición del cromosoma Filadelfia (Philadelphia, Ph) (resultante de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22) sería el cambio que conferiría una ventaja proliferativa e iniciaría el proceso de transformación maligna. Dada la inestabilidad genética y la adquisición secuencial de más alteraciones, se irían generando nuevos clones celulares con mayor capacidad de evadir los mecanismos de control del crecimiento y se verían afectadas otras funciones celulares y la capacidad de diferenciación celular. De este modo, existiría una correlación entre el número de alteraciones citogenéticas y el incremento de las características malignas de la población celular. En el modelo de la LMC, en la mayoría de los casos, la progresión de la enfermedad hacia estadios más avanzados se correlacionaba con la aparición de una o más alteraciones citogenéticas, tales como un segundo cromosoma Ph, la trisomía del cromosoma 8 o la detección de *i(17)(q10)* (112,113).

Esta teoría es consistente con el modelo de evolución lineal que postula la adquisición secuencial de alteraciones que confieren a la célula una ventaja para su crecimiento con la aparición secuencial de clones que poseen mayor capacidad de expansión que sus predecesores, pero siempre conservando las alteraciones iniciales. En contrapartida, se habla también de un modelo de evolución ramificada (en inglés, *branched evolution*) donde se propone la propagación divergente y simultánea de varios subclones genéticamente distintos a partir de un mismo ancestro común, generando de esta manera mayor heterogeneidad (108,110) (Figura 13). De hecho, numerosos estudios llevados a cabo en SMD (114,115) y otros tipos de leucemia tales como la LMA (116,117), la leucemia linfocítica crónica (118) y el mieloma múltiple (119,120) revelan una alta complejidad clonal, que es más consistente con el modelo de evolución ramificada, especialmente tras el tratamiento o la recaída (121,122).

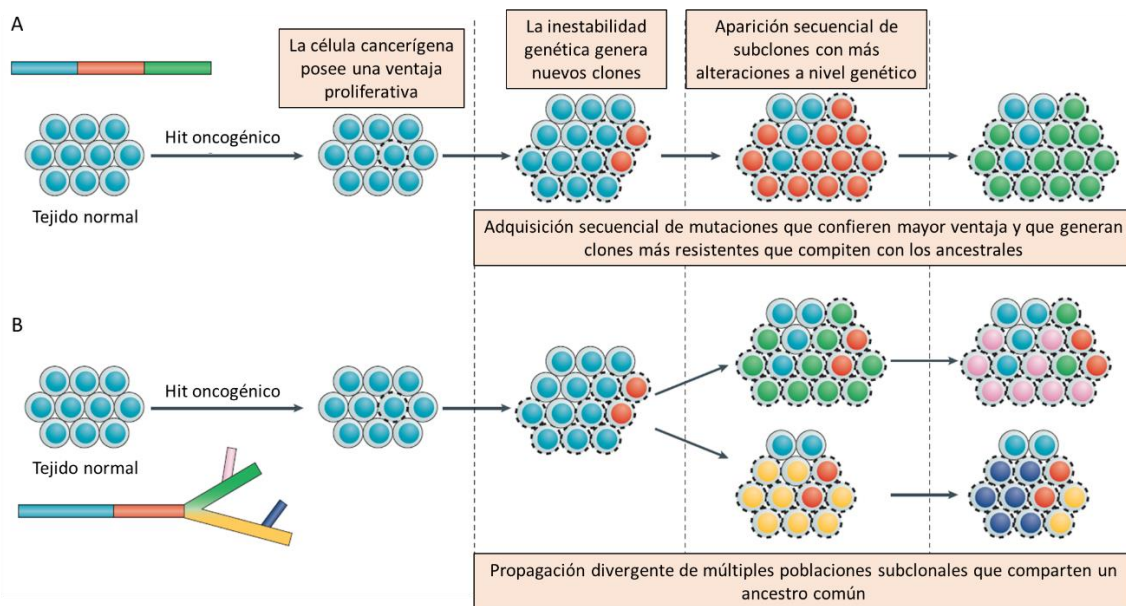


Figura 13. Patrones de evolución clonal: A) evolución lineal vs B) evolución ramificada. Adaptada de Dagogo-Jack y Shaw, 2018 (108).

La capacidad de las células neoplásicas de evolucionar y adaptarse es el principal reto a las estrategias terapéuticas. La administración de un tratamiento es un punto decisivo en la historia natural de la enfermedad, ya que impone una mayor presión selectiva en las células leucémicas. A la par que la HIT y la evolución clonal podrían contribuir a la resistencia terapéutica, el mismo tratamiento puede acelerar este proceso evolutivo mediante dos mecanismos:

- Expansión de clones refractarios al tratamiento que ya se encontraban presentes en baja frecuencia antes del tratamiento. Es decir, dada las diferencias en la sensibilidad al tratamiento, de cierta manera se seleccionarían estos clones.
- Persistencia de células tolerantes al tratamiento, que sobreviven y adquieren nuevas alteraciones inducidas por el propio tratamiento.

En ambos casos, hay estudios que sustentan que dichos procesos contribuirían a desarrollar resistencia tanto a las terapias convencionales como a las terapias dirigidas (108).

3. Técnicas de análisis genético en los SMD

3.1. Citogenética convencional

La citogenética convencional (CC) se ha convertido en un test rutinario e imprescindible en el manejo de las neoplasias hematológicas, comprende el estudio de la morfología de los cromosomas. Mediante el cariotipado, proceso de pareado y orden de todos los cromosomas de un organismo, se puede obtener una visión global de los mismos. De este modo, se pueden detectar cambios en el número de cromosomas (aneuploidías) o cambios estructurales tales como deleciones, duplicaciones, translocaciones, inversiones, etc. En determinadas neoplasias, dichos cambios se pueden asociar a un diagnóstico, mientras que en otras enfermedades ciertas alteraciones cromosómicas proveen información pronóstica o de respuesta a tratamientos.

En la figura 14 se esquematiza la técnica. Brevemente, inicia con un cultivo celular y la posterior detención del ciclo celular en la metafase, ya que es en esta etapa donde los cromosomas adquieren su estado más condensado. En el caso de los SMD, la muestra de partida son células obtenidas del aspirado de MO. Después de añadir un antimitótico (como la colchicina) para detener el ciclo celular en metafase, las células son incubadas con una solución hipotónica. Posteriormente, se lleva a cabo la fijación que se realiza con la solución de Carnoy que es una mezcla 3:1 de metanol y ácido acético, donde el metanol deshidrata y fija los cromosomas y el ácido acético provoca la lisis de las membranas. El siguiente paso es la realización de extensiones del material sobre un portaobjetos.

El último paso es la tinción de los cromosomas. Hoy en día la solución más utilizada para ello es la de Giemsa (bandas G) que proporciona buena resolución, es estable y permite el análisis mediante el uso de un microscopio óptico. Este tipo de tinción genera un patrón de bandas característico de cada cromosoma. En general, las regiones de heterocromatina, que tienden a ser ricas en adenina y timina y contienen relativamente pocos genes, se tiñen de color oscuro. En contraste, las zonas menos condensadas, que tienden a ser ricas en guanina y citosina y son más ricas en regiones codificantes, incorporan menos colorante y aparecen más claras en el bandeado G (123).

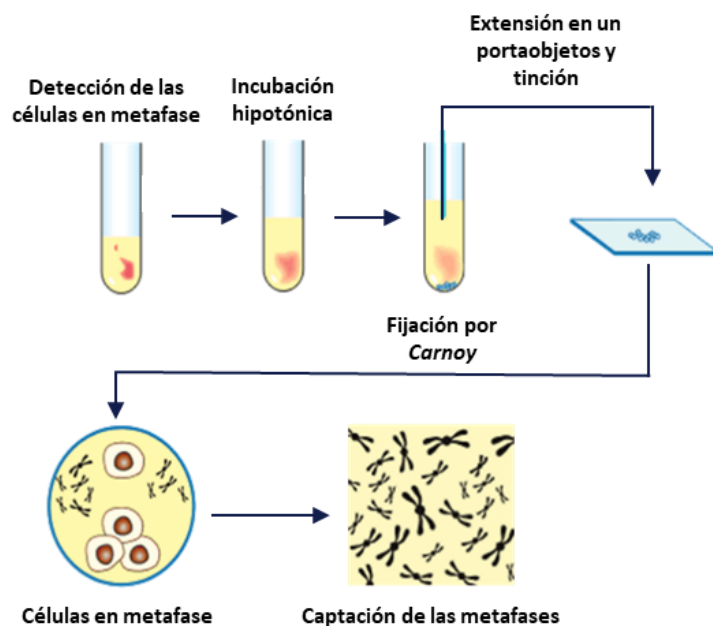


Figura 14. Principales pasos de la citogenética convencional.

De acuerdo con las recomendaciones de la *European Leukemia Net* (124), el estudio citogenético de muestras de MO debe ser realizado en todo paciente con sospecha de SMD mediante el análisis de al menos 20 metafases y las alteraciones detectadas deberán ser descritas de acuerdo con el *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN 2016) (81).

Si bien la CC nos permite obtener una visión global de las alteraciones cromosómicas de un individuo mediante una técnica sencilla y barata, posee una resolución y sensibilidad relativamente baja, permitiendo detectar alteraciones del orden de 5 Mb (125,126).

3.2. Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Ante la imposibilidad de analizar una muestra mediante CC, ya sea por ausencia o baja calidad de metafases, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*), puede servir para complementar el análisis por CC. Adicionalmente, esta técnica puede ser útil para clarificar alteraciones complejas y permite detectar alteraciones en hasta el 15% de los pacientes con SMD que presentan un cariotipo normal (127,128). Sin embargo, aunque sea una técnica más sensible que la CC, solo se puede aplicar de manera dirigida y no como técnica de *screening* (caso de la CC) (124).

Esta técnica permite la detección y localización de secuencias nucleotídicas específicas en diferentes preparaciones (tejidos, células, cromosomas) mediante la hibridación de sondas nucleotídicas complementarias al fragmento de interés. El hecho de que la sonda esté marcada con fluoróforos hace posible su detección. La gran ventaja técnica frente a la CC es que no requiere un cultivo celular previo, ya que puede aplicarse a células que se encuentren o no en división.

En la figura 15 se representan los principales pasos de la técnica de FISH. El primer paso de la misma consiste en la desnaturalización del ADN para separar ambas hebras. Posteriormente, se añade la sonda fluorescente complementaria al fragmento de interés, y tiene lugar la hibridación. Después se tiñen los núcleos con un color de contraste inespecífico. Cabe destacar que las sondas de ADN pueden estar marcadas con fluoróforos (método directo) o bien emplear anticuerpos marcados con fluorescencia que sean complementarios a las sondas (método indirecto). Por último, se visualiza la muestra preparada bajo un microscopio de fluorescencia.

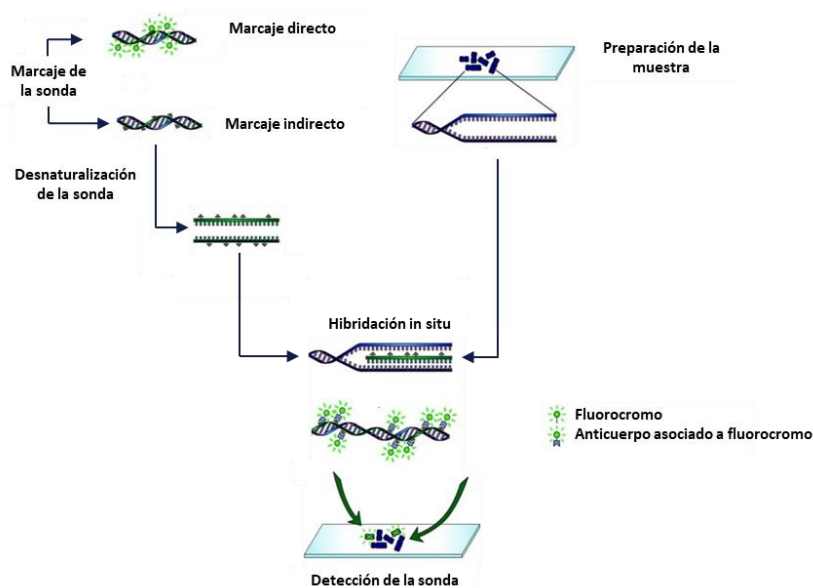


Figura 15. Principales etapas de la técnica de FISH. Adaptada de Brammer *et al.*, 2013 (129).

Existen varios tipos de sondas (figura 16), cada una con una función específica según lo que se desea detectar. Se describen las sondas centroméricas (que marcan toda la región del centrómero), las sondas de pintado cromosómico (constituidas por una librería de sondas que abarcan todo el cromosoma) y las sondas de secuencia única (locus específico) que marcan regiones cromosómicas muy concretas.

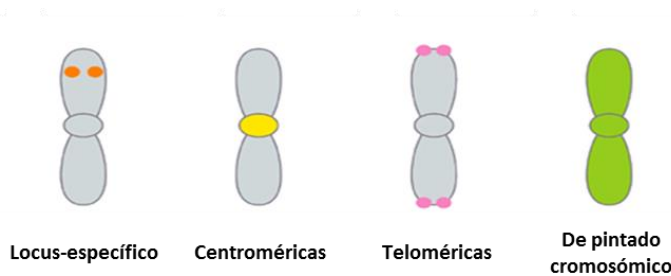


Figura 16. Tipos de sondas empleadas en FISH. Adaptado de McNeil y Ried, 2000 (130).

3.3. Microarrays genómicos

Los *microarrays* consisten en una colección de moléculas unidas a un soporte sólido. Dependiendo del tipo de moléculas unidas, se distinguen diferentes tipos de *microarrays*: genómicos (ADN), de expresión (ARN), de proteínas o celulares.

Los *microarrays* genómicos pueden utilizarse para estudiar el cariotipo de un individuo ofreciendo ciertas ventajas frente a la CC: mayor resolución sin necesidad de obtener metafases (evitando de esta manera el cultivo celular), además de la detección de lesiones no balanceadas (ganancias y pérdidas) permiten la detección de regiones con pérdida de heterocigosidad en las que no hay un cambio en el número de copias (CNN-LOH, *copy number neutral-loss of heterozygosity*). Dado que gran parte de la técnica está automatizada, los resultados pueden ser analizados de manera objetiva y sistemática empleando algoritmos bioinformáticos. Como inconvenientes frente a la CC, los *microarrays* no permiten detectar translocaciones o reordenamientos balanceados y no permiten hacer un análisis subclonal, es decir, obtener información sobre si las alteraciones están o no en la misma célula (ya que se hace sobre ADN *bulk* mientras que en la CC se analizan metafases individuales) (131).

Si bien existen diferentes plataformas y tipos de *arrays* genómicos, en esta tesis se emplearon los SNP-A (*single nucleotide polymorphism arrays*) de la plataforma Affymetrix® (Thermo Fisher Scientific). En la misma, el ADN genómico es digerido por endonucleasas, amplificado y marcado (Figura 17). El siguiente paso es la hibridación. Para ello, los SNP-A utilizan sondas para la detección de variaciones en el número de copias (sondas de *copy number*), así como sondas de SNP, que son oligonucleótidos correspondientes a las variantes alélicas (A y B) de determinados polimorfismos. La hibridación del ADN genómico a ambas variantes alélicas (AB) indica heterocigosidad, sin embargo, si se produce únicamente la hibridación con uno de los dos alelos (AA o BB), la señal será consistente con homocigosis en dicho locus. La señal de la fluorescencia emitida en el proceso determinará el número de copias, permitiendo diferenciar pérdidas y ganancias de material genómico. Por su parte, las CNN-LOH se identifican ya que se produce una detección de señal heterocigota menor de la esperada en un segmento determinado de un cromosoma (131).

El nivel de resolución depende principalmente de la densidad del array en cuanto al número de sondas. Concretamente, en esta tesis se empleó el array *CytoScan HD*®, que contiene 750.000

sondas para SNPs y 1.950.000 sondas de número de copia y que permite la detección de alteraciones con una resolución de 10 Kb y una sensibilidad del 20%.

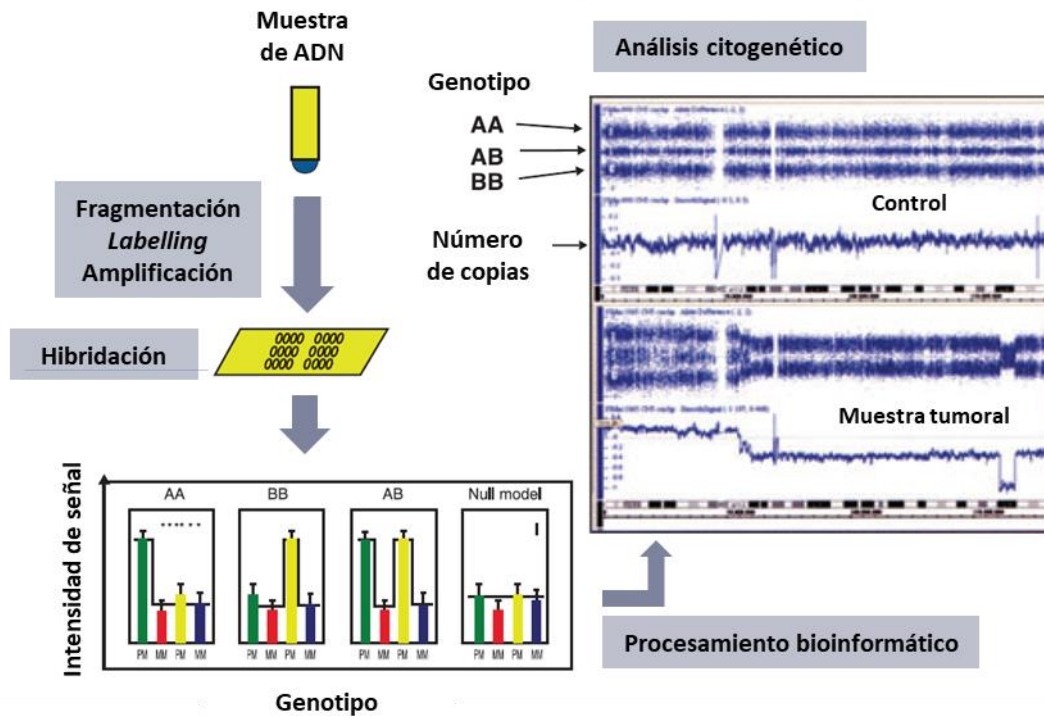


Figura 17. Pasos del análisis de una muestra mediante SNP-A. Adaptado de Maciejewski *et al.*, 2009 (131).

En la tabla 18 se puede encontrar una comparación de las diferentes técnicas de análisis genético.

Tabla 18: Comparación de las características de la citogenética convencional, FISH y SNP-A (131).

Técnica	Resolución	Sensibilidad	Detección de CNN-LOH	Necesidad de células en división	Distinción de clones individuales	Screening de nuevas alteraciones
Citogenética convencional	Baja (3-5 Mb)	10%	No	Si	Si	Si
FISH	Media	Alta*	No	No	Si	No
SNP-A	Alta	15-30%	Si	No	No	Si

*La sensibilidad depende del número de núcleos que se cuenten. Abreviaturas: FISH: *fluorescence in situ hybridization*. SNP-A: *Single nucleotide polymorphism arrays*.

3.4. Técnicas de secuenciación de ADN

La secuenciación de ácidos nucleicos es un método que permite determinar el orden exacto de los nucleótidos, ya sea ADN o ARN, presentes en una muestra determinada. Conocer la secuencia del ADN nos ha permitido descubrir la causa de numerosas enfermedades e incluso mejorar la toma de decisiones terapéuticas en base a la detección de mutaciones.

En el 2003, luego de 13 años de trabajo, se finalizó el proyecto de secuenciación del genoma humano. El mismo dio pie a una mayor demanda de la creación de métodos más baratos y eficientes que el método tradicional de Sanger con el que se había llevado a cabo.

A continuación, se describe dicho método y posteriormente la nueva metodología conocida como secuenciación de nueva generación (NGS: *Next Generation Sequencing*).

3.4.1. Secuenciación clásica de Sanger

La secuenciación de Sanger (también conocida como método didesoxi o secuenciación por terminación de la cadena), fue desarrollada en 1975 por Edward Sanger y fue considerada como la técnica *gold standard* durante las décadas posteriores hasta el desarrollo de la NGS (132).

Este método se basa en generar múltiples copias de la molécula de ADN que se quiere secuenciar mediante varios ciclos de amplificación por PCR (Figura 18). Así, tienen lugar numerosos ciclos de desnaturalización, *annealing* y extensión de *primers*. A diferencia de una PCR convencional, cada ronda de amplificación finaliza de manera aleatoria cuando se incorpora un didesoxinucleótido (ddNTP) marcado con fluorescencia. Los ddNTP son similares a los nucleótidos normales (dNTP), pero con una diferencia clave: no tienen grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar. En un nucleótido normal, el grupo hidroxilo 3' actúa como un "gancho" que permite la elongación de la cadena existente. Este proceso se repite cierto número de ciclos, lo cual garantiza que al finalizar se ha incorporado un ddNTP en cada una de las posiciones de la molécula de interés en al menos una reacción. Es decir, el tubo contendrá fragmentos de diferentes longitudes que terminan respectivamente en cada una de las posiciones donde se ha añadido un ddNTP. Los extremos de los fragmentos tendrán el fluoróforo correspondiente al último nucleótido.

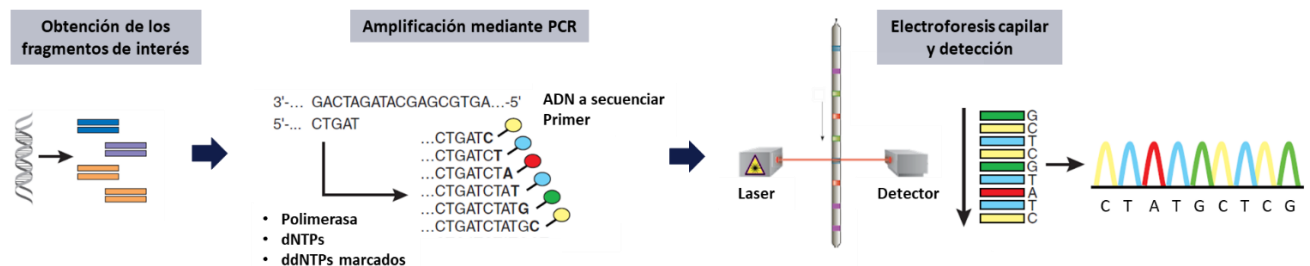


Figura 18. Principales pasos de la secuenciación Sanger. Adaptada de Shendure y Ji, 2008 (133).

La secuencia se determina mediante electroforesis capilar de alta resolución, en un equipo que además contiene un detector de fluorescencia. A medida que cada fragmento cruza la matriz y un láser incide sobre él, se emite un tipo de fluorescencia que se corresponde con el nucleótido con el que está marcado. Los datos registrados por el detector consisten en una serie de picos en la intensidad de fluorescencia. La secuencia de ADN se lee desde los picos en el electroferograma.

Si bien la secuenciación Sanger provee resultados de buena calidad (134), es una técnica costosa y con bajo rendimiento, es decir, se torna muy laboriosa e ineficiente cuando se quieren secuenciar exomas o genomas e incluso paneles con muchos genes. Otra limitación es la sensibilidad de la técnica, que ronda el 20%. Es decir, sería difícil distinguir el ruido de fondo y errores de secuenciación de un cambio real en la secuencia de ADN por debajo de dicha frecuencia (135).

3.4.2. Next Generation Sequencing (NGS)

Como se mencionó anteriormente, a raíz del proyecto Genoma Humano, que conllevó 13 años de trabajo y 3 billones de dólares, se hizo aún más clara la necesidad de contar con técnicas más baratas y eficientes (136).

Las nuevas plataformas de NGS hacen posible la secuenciación masiva en paralelo, en la cual millones de fragmentos de ADN de un conjunto de muestras son secuenciadas en simultáneo.

La NGS se puede resumir en 3 grandes pasos que se describen a continuación y se ilustran en la figura 19 (134,136). El segundo paso, que es el proceso de secuenciación en sí, depende de la tecnología de NGS empleada. Algunos ejemplos son la pirosecuenciación (detección de radiación emitida), la secuenciación por síntesis (detección de fluorescencia) o la secuenciación por semiconducción (detección de iones de hidrógeno). En la figura, la descripción de este paso se hace en base a la plataforma de Illumina, que es una de las más utilizadas hoy en día y la que ha sido empleada en esta tesis (137).

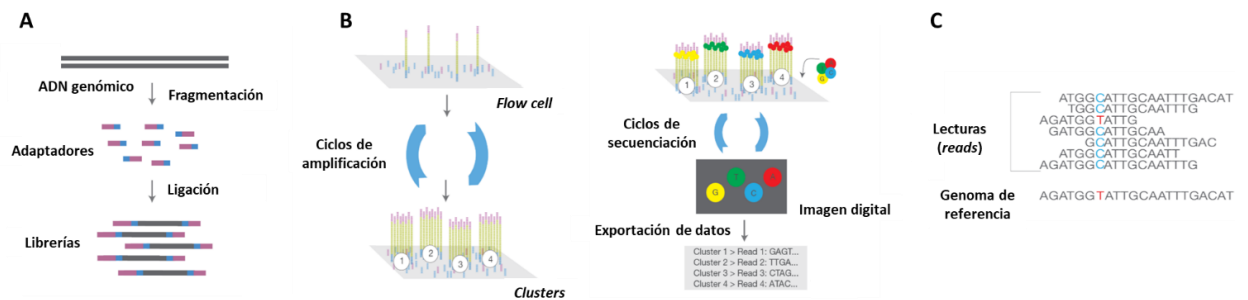


Figura 19. Esquema general de los pasos de la secuenciación masiva (NGS): A) Preparación de librerías, B) Generación de *clusters* y secuenciación por síntesis, C) Análisis de datos.

A) Preparación de librerías: el primer paso consiste en la fragmentación aleatoria del ADN genómico, ya sea mediante métodos enzimáticos o mecánicos (sonicación). Lo siguiente es la generación de las librerías, que consiste en añadir índices y adaptadores a los fragmentos obtenidos previamente. Los índices (o *barcodes*) consisten en oligonucleótidos sintéticos que son únicos para cada muestra que se desea secuenciar. Gracias a ellos es posible secuenciar en simultáneo (*multiplex*) muestras de diferentes individuos, ya que al final del proceso se puede asociar cada fragmento secuenciado al índice que se había añadido inicialmente. Por su parte, los adaptadores son secuencias complementarias a los *primers* de secuenciación que son específicos de la plataforma que se emplee.

A menos que se lleve a cabo la secuenciación del genoma, es necesario aislar y amplificar las regiones específicas que se deseen secuenciar. Dichas regiones pueden abarcar desde pocos genes (por ejemplo: un panel de genes asociados a una enfermedad específica) hasta el exoma completo (todas las regiones codificantes conocidas de una especie determinada). El enriquecimiento de la muestra en las regiones de interés puede hacerse mediante dos químicas diferentes: amplicones o captura. En el caso de los amplicones, se usan *primers* que flanquean las regiones que se desean estudiar, mientras que por captura se emplean sondas complementarias que hibridan con las regiones de interés.

B) Generación de clusters y secuenciación: en la tecnología de Illumina, la secuenciación consta de dos pasos. En un primer paso, denominado generación de *clusters*, las librerías se cargan en la *flow cell* que consiste en una superficie cubierta de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. Cada fragmento es capturado y amplificado formando *clusters* (múltiples copias del fragmento inicial). El segundo paso consiste en secuenciar los fragmentos generados mediante la tecnología SBS (*sequencing by*

synthesis). La tecnología SBS de Illumina permite secuenciar los fragmentos de los *clusters* de manera masiva y paralela utilizando un método de terminación de base reversible, que permite detectar las bases cuando son incorporadas en la elongación de la cadena de ADN. Este terminador está marcado con un fluorocromo que es captado cada vez que un dNTP se une a la cadena de ADN y que permitirá la unión de la siguiente base. Como los cuatro dNTPs poseen terminadores reversibles y están presentes en cada ciclo de secuenciación, la competencia natural entre ellos evita el sesgo.

C) **Análisis de datos:** se puede dividir en 4 etapas:

- a. **Base calling:** es el proceso de asignación de bases (nucleótidos) a cada señal detectada durante una reacción de secuenciación. Típicamente, cada secuenciador tiene integrado su propio *software* (conjunto de programas) con el cual se lleva a cabo este proceso.
- b. **Alineamiento:** consiste en el posicionamiento correcto de los *reads* (fragmentos de ADN secuenciados) frente al genoma de referencia.
- c. **Llamada de variantes (*variant calling*):** detección de las variantes en la secuencia analizada a medida que se compara con el genoma de referencia.
- d. **Anotación de variantes:** es la adición de información acerca de cada variante detectada. Se lleva a cabo mediante programas bioinformáticos que combinan información obtenida en bases de datos y algoritmos *in silico* que permiten dar información acerca de la patogenicidad de la variante, determinar si hay un cambio en un aminoácido, etc.

3.5. Estudios genómicos en *single cell*

Dentro de un tumor puede haber una mezcla de poblaciones celulares donde algunas de ellas sean células sanas y otras portadoras de una o más alteraciones genéticas (por ejemplo, mutaciones puntuales y alteraciones en el número de copias). La NGS permite detectar dichos cambios en una muestra tumoral, midiendo una señal promedio de dichos cambios y asumiendo que dicha señal es representativa de todas las células que comprenden la muestra. Teniendo en cuenta la frecuencia alélica de cada alteración es posible inferir la composición clonal de dicha muestra asumiendo que aquellas mutaciones con frecuencias alélicas similares forman parte de un mismo clon. Sin embargo, esta estrategia presenta ciertos inconvenientes, sobre todo a la hora de discernir si dos mutaciones a baja frecuencia o con poca diferencia en frecuencia alélica forman parte de un mismo clon o en realidad pertenecen a dos clones distintos. En otras palabras, mediante esta estrategia no se pueden determinar con certeza los patrones de co-ocurrencia de mutaciones en una misma célula, lo que tiene como consecuencia que pequeños clones pasen desapercibidos, que pueden ser justamente los que se encuentren implicados en la recaída, respuesta o resistencia a un tratamiento (138,139).

Estos inconvenientes pueden ser solventados mediante las nuevas estrategias de secuenciación de células individuales (en inglés: *single cell*, SC) que permiten alcanzar un mayor nivel de resolución e incluso hoy en día realizar estudios a nivel genómico, epigenómico, transcriptómico y proteómico de las células individuales que componen una muestra. En la figura 20 se presenta un esquema comparativo general de la secuenciación de muestras "*bulk*" (muestra tumoral total) frente al análisis de SC.

En un inicio, se aplicaban técnicas como FISH o PCR para detectar ciertos cambios moleculares en células únicas (140,141). Estas técnicas permiten la cuantificación de un número limitado de parámetros en SC. Con el desarrollo de las plataformas de NGS, también avanzó el campo de análisis en SC. En el 2009 se llevó a cabo el primer análisis mediante secuenciación de ARN (RNA-seq) de un blastómero de ratón (142) y dos años más tarde Navin *et al.* reportaron el primer estudio genómico a nivel de SC para analizar la heterogeneidad genética del cáncer y obtener información acerca de la evolución tumoral. En dicho estudio se aislaron los núcleos de 200 SCs de dos tumores mamarios mediante citometría de flujo, posteriormente mediante amplificación del genoma y secuenciación masiva llevaron a cabo el estudio del número de copias de cada célula individual. Así fueron capaces de demostrar la existencia de diversas subpoblaciones celulares que constituían la evidencia del proceso de expansión clonal en dicha muestra (143).

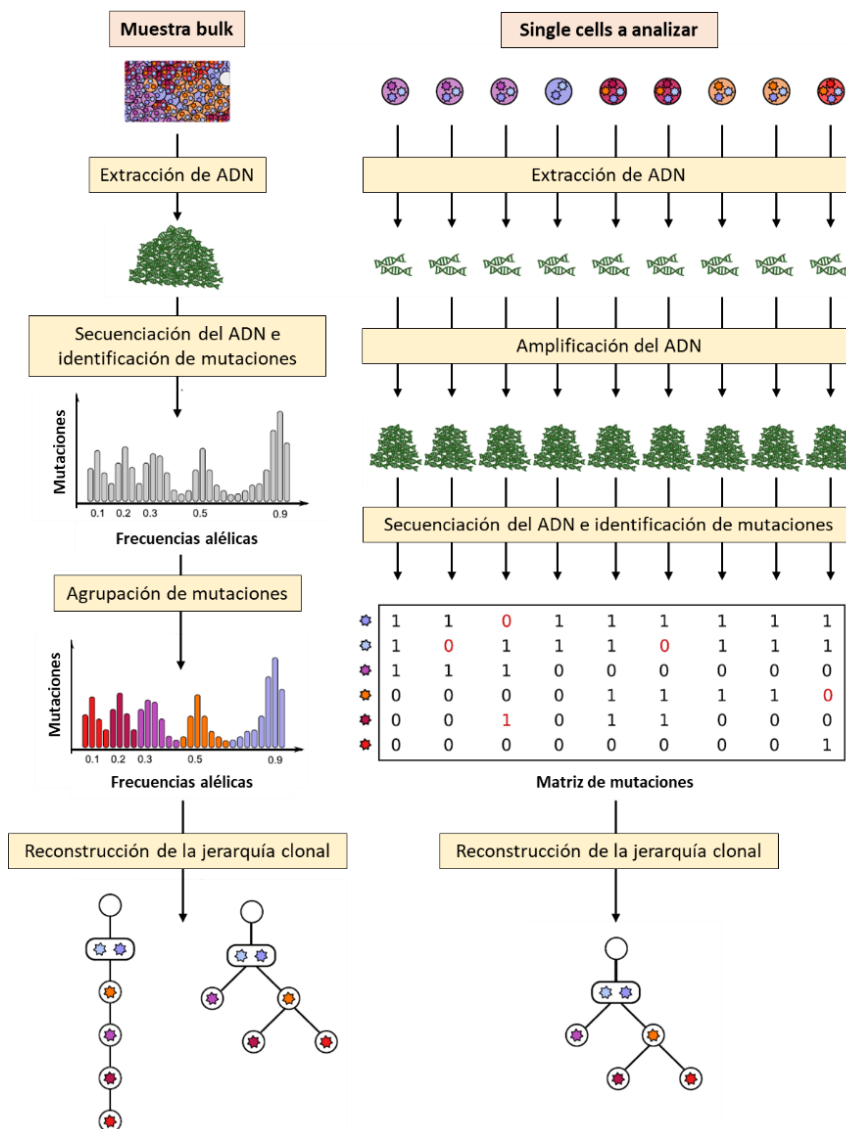


Figura 20: Aproximaciones para caracterizar la heterogeneidad intratumoral. Izquierda: estudiando una muestra *bulk* se reconstruye la jerarquía clonal a través de la agrupación clonal basada en la frecuencia alélica de las mutaciones detectadas. Derecha: mediante estudios en *single cell*, es posible una reconstrucción más fiable de la jerarquía clonal, ya que se estudia de manera individual el perfil mutacional de cada célula. Adaptada de Kuipers *et al.*, 2017 (138).

3.5.1. Instrumentos disponibles para la captura de SC

El aislamiento o la captura es el primer paso para cualquier experimento en SC, para ello hay diversos instrumentos disponibles. El desempeño de los mismos se podría evaluar empleando tres parámetros:

- Eficiencia o rendimiento: número de células que se pueden aislar en un tiempo determinado.
- Pureza: la fracción de células diana recolectadas después de la separación.
- Recuperación: la fracción de células diana obtenidas tras la separación, comparada con el número de células diana disponibles en la muestra de partida.

Por otro lado, las técnicas de captura celular pueden clasificarse ya sea mediante las propiedades usadas para la separación o teniendo en cuenta el rendimiento del instrumento (141). Las propiedades usadas para la separación dividen a los métodos actualmente existentes en dos grupos:

- Basados en características o propiedades físicas: tamaño, densidad, cargas eléctricas, deformabilidad, etc.
- Basados en características biológicas de las células: *fluorescence-activated cell sorting* (FACS, separación celular basada en la fluorescencia) o *magnetic-activated cell sorting*, los cuales emplean ya sea anticuerpos marcados con fluorescencia o *beads* magnéticas que poseen afinidad por alguna proteína de superficie celular.

A continuación se describen brevemente algunos de los instrumentos más comunes agrupándolos según su rendimiento y en la tabla 19 se comparan las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

A) Instrumentos de bajo rendimiento: las tres técnicas más empleadas son:

- Micromanipulación: emplea un microscopio invertido combinado con micro-pipetas con movimientos mecánicos que permiten el desplazamiento a lo largo de los 3 ejes (x, y, z) para capturar con precisión la célula de interés a partir de un cultivo *in vitro* o un tejido disociado. Requiere mucho entrenamiento por parte del personal.
- FACS: se parte de una suspensión celular donde se utiliza una molécula fluorescente (generalmente un anticuerpo) para marcar selectivamente las células de interés. A medida que la suspensión celular pasa por el citómetro, cada célula es expuesta a un láser, el cual permite la detección de la fluorescencia y tras aplicar una carga a la gota conteniendo la célula de interés, permite su separación.
- Captura mediante microdissección láser: permite aislar células de interés partiendo de una muestra de tejido sólido que es cubierta con un cubreobjetos transparente termoplástico. La muestra se observa a través de un microscopio invertido y se emplea un haz láser que incide sobre la célula de interés, así el cubreobjetos plástico se funde permitiendo su captura.

B) Instrumentos de rendimiento medio: permiten capturar cientos de células seleccionando las subpoblaciones mediante un análisis visual (comprobación de la captura de una única célula), a diferencia de los instrumentos de alto rendimiento que capturan miles de células y no es posible hacer una comprobación minuciosa de la captura (144). Dentro de esta categoría se encuentra el sistema C1 (Fluidigm®) que es el que se describe a continuación ya que es el que se ha empleado en esta tesis.

- Sistema C1 (Fluidigm®): fue el primer instrumento automatizado que salió al mercado que permite aislar y procesar las células para estudios genómicos mediante una tecnología microfluídica. Se lanzó en el 2012 y permite la captura, en cada chip, de hasta 96 células individuales, seguida de la lisis, retrotranscripción (en caso del ARN) y posterior amplificación. Todos estos pasos se llevan a cabo dentro de un chip microfluídico dotado de un sistema de microcanales donde las células son capturadas en cámaras de reacción individuales. A diferencia de los instrumentos de alto rendimiento, con la C1 es posible llevar a cabo la separación partiendo de un número inicial relativamente bajo de células. La separación de las células se realiza en base al tamaño y existen chips para 3 tamaños celulares diferentes: pequeñas (5-10 μm), medianas (10-17 μm) y grandes (17-25 μm) (144,145).

Los chips son transparentes, hecho que posibilita examinar bajo un microscopio óptico las cámaras de reacción para comprobar la captura de células únicas y viabilidad celular (empleando una tinción adecuada) (Figura 21).

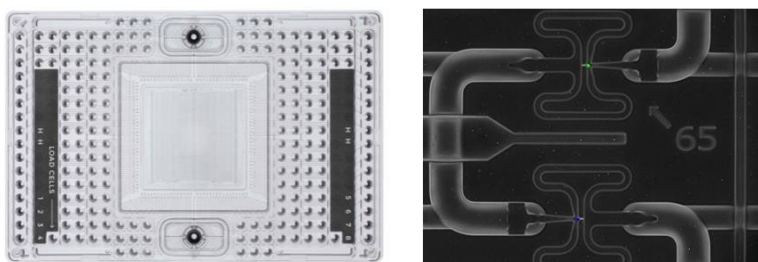


Figura 21. Izquierda: chip de captura empleado en el sistema C1 (Fluidigm®). Derecha: modelo de los sitios de captura individuales dentro del chip. En este ejemplo se ven dos células marcadas con diferentes fluorocromos: verde y azul.

Al final del procesamiento en la C1, se obtiene el material pre-amplificado de cada célula individual que puede ser utilizado para diversas aplicaciones: secuenciación del ARN, expresión génica dirigida, secuenciación del genoma/exoma, secuenciación dirigida, epigenética y expresión de microARNs.

C) Instrumentos de alto rendimiento: permiten el procesamiento simultáneo de miles de células en un corto tiempo. La mayoría de ellos utilizan sistemas microfluídicos donde se generan miles de gotas que portan las células individuales con oligonucleótidos de captura y reactivos ya sea para la retrotranscripción del ARN o la generación de librerías a partir del ADN. Los oligonucleótidos de captura contienen una secuencia que identifica a todas las moléculas que provienen de una misma célula. Es por ello que una vez que estén marcadas con dicha secuencia específica, estas gotas se pueden juntar y se puede llevar a cabo la reacción de miles de células en un solo tubo.

Dentro de esta categoría, el instrumento más popular a día de hoy es el *Chromium System (10x Genomics)*, que permite aislar las células individuales, amplificar todo el transcriptoma y preparar las librerías (146). Se emplea principalmente para la secuenciación del ARN. A modo de ejemplo, en la figura 22 se ilustra el flujo de trabajo del mismo.

Otro instrumento similar es el *Tapestri (MissionBio)* cuyo principio es similar al descrito anteriormente pero su uso está enfocado al análisis mutacional dirigido (mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones del ADN) (147).

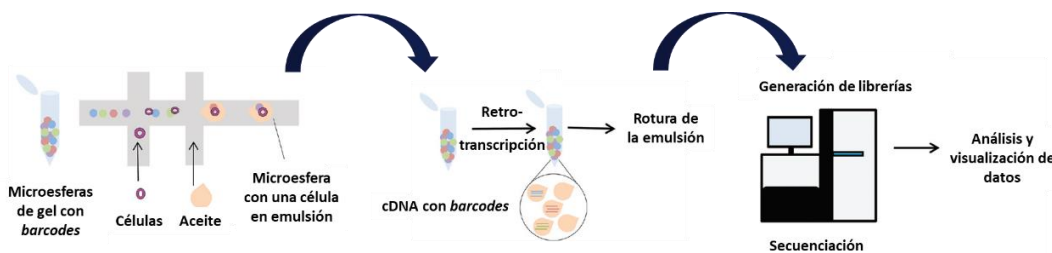


Figura 22. Flujo de trabajo con el *Chromium System (10x Genomics)*. Las microesferas con las células individuales en emulsión son usadas durante la retrotranscripción y simultáneamente cada molécula de cADN es marcada con el *barcode* (oligonucleótidos con secuencias específicas para cada célula). Los cADN generados se juntan en un solo tubo para llevar a cabo la preparación de librerías y secuenciación. Adaptada de Paolillo *et al.*, 2019 (148).

Tabla 19. Comparación de sistemas de captura de *single cells*. Adaptada de Valihrach *et al.*, 2018 (144).

Técnicas	Material de partida (cantidad)	Eficiencia (número de células capturadas)	Análisis visual	Experiencia requerida	Flexibilidad (protocolos propios)
Instrumentos de bajo rendimiento					
Micromanipulación	Bajo	Baja	Si	Alta	Si
Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	Alto	Baja	No	Moderada	Si
Captura mediante microdissección láser	Bajo	Baja	Si	Alta	Si
Instrumentos de rendimiento medio					
Sistema C1 (Fluidigm)	Medio-bajo	Baja-media	Si	Moderada	Si
Instrumentos de alto rendimiento					
Chromium System (10x Genomics)	Alto	Alta	No	Moderada	No
Tapestri (MissionBio)	Alto	Alta	No	Moderada	Paneles customizados

Abreviatura: FACS: *Fluorescence-activated cell sorting* (separación celular basada en la fluorescencia).

Dado que hay un gran número de instrumentos disponibles, la elección del mismo debe hacerse teniendo en cuenta la naturaleza del material de partida, la eficiencia de captura y la compatibilidad del método con los análisis que se quieran llevar a cabo posteriormente. En la figura 23 se resumen las principales aplicaciones a nivel genómico de las nuevas tecnologías con SCs dentro del campo de la investigación.

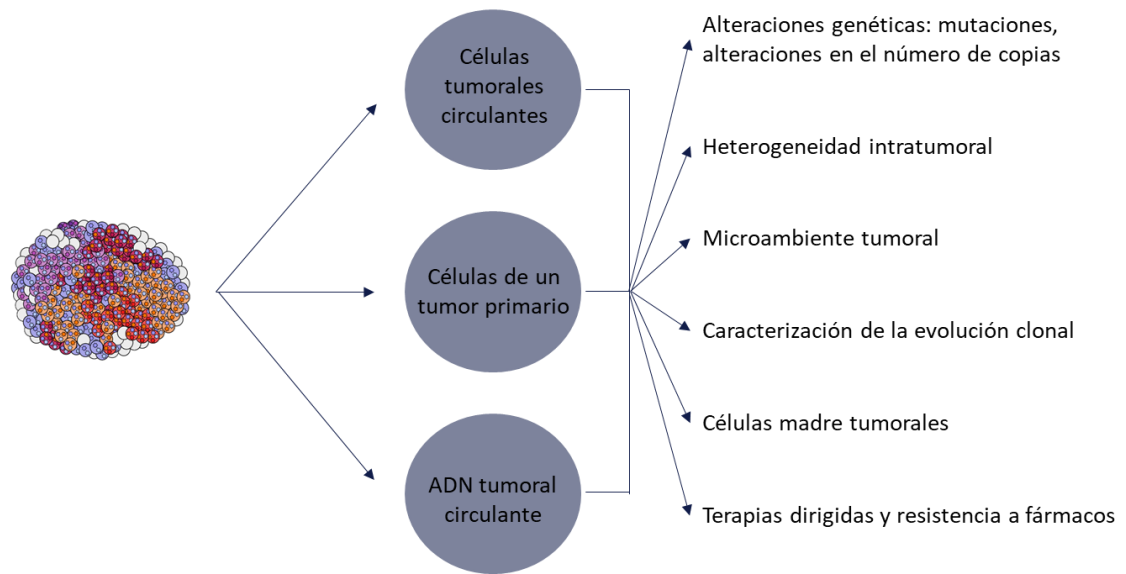


Figura 23. Principales aplicaciones de la secuenciación de *single cell* a nivel genómico en cáncer. Adaptada de Paolillo *et al.*, 2019 (148).

Hipótesis y objetivos

Los SMD constituyen un grupo de neoplasias hematológicas muy heterogéneo tanto a nivel clínico como a nivel genético. Si bien el diagnóstico se basa principalmente en el análisis morfológico y el cariotipo en menor medida, en la última década, varios estudios donde se ha empleado la TDS han demostrado que los datos moleculares podrían complementar dichas técnicas y contribuir principalmente a la estratificación pronóstica de los pacientes. La TDS ha permitido ver que hasta un 90% de los pacientes con SMD presenta al menos una mutación somática. Si bien no hay ninguna mutación específica de los SMD y el espectro de genes que pueden estar mutados es relativamente amplio, éstos se pueden agrupar en un número limitado de categorías según el proceso celular implicado.

De acuerdo a la última clasificación de la OMS, el único subtipo de SMD claramente definido por una alteración citogenética es el SMD con del(5q) aislada. Comúnmente asociado a la presencia de anemia macrocítica e hipoplasia eritroide, constituye el subgrupo de SMD mejor caracterizado. El tratamiento con lenalidomida (fármaco análogo de la talidomida) ha demostrado ser eficaz en una gran proporción de estos pacientes, ya que permite una reducción de los requerimientos transfusionales y una reversión, en algunos casos, de las alteraciones citológicas y citogenéticas. No obstante, también se han descrito alteraciones genéticas, como las mutaciones en *TP53* y la presencia de un cariotipo complejo, como parámetros que se asocian a una mayor progresión de la enfermedad y una menor respuesta a la lenalidomida.

La **hipótesis** global del trabajo es que el uso de técnicas moleculares, como la secuenciación masiva y el análisis genético de SC, permite una mejor caracterización genética de los pacientes con SMD.

La muestra más adecuada para el estudio molecular en estos pacientes es la MO. La obtención de dicha muestra supone un procedimiento invasivo y doloroso para el paciente y, en ciertos casos, como cuando existe fibrosis en la MO, no es posible obtener un material óptimo para su estudio. Por el contrario, la SP puede ser obtenida de manera mínimamente invasiva por venopunción y constituiría una fuente ideal para el seguimiento secuencial a lo largo del curso de los SMD. Por ello, se propone el análisis de la SP como fuente alternativa de células tumorales para el estudio de las alteraciones genéticas mediante TDS.

Por otro lado, los SMD con del(5q) aislada han sido ampliamente caracterizados en estudios previos mediante técnicas de secuenciación, pero no mediante técnicas que permitan una comprensión más detallada de la arquitectura clonal y el efecto que pudieran tener en ella ciertos fármacos, como la lenalidomida.

El **objetivo general** de la tesis es la caracterización genética de los pacientes con SMD. Para ello, se emplean principalmente dos técnicas: la secuenciación masiva y el análisis de SC. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Mediante TDS:

- Estudiar muestras pareadas de MO, SP-MC y SP-CD34+ de un grupo de pacientes con SMD, donde se encuentren representados los distintos subtipos de la enfermedad.
- Correlacionar los datos obtenidos en los tres tipos de muestras mencionados.
- Evaluar la utilidad del empleo de las muestras obtenidas a partir de SP como material alternativo para el estudio genético en los SMD.

2. En un grupo de pacientes con SMD con del(5q) aislada:

- Llevar a cabo una caracterización molecular de los pacientes, en muestra de MO al diagnóstico o pre-tratamiento, mediante la combinación de las siguientes técnicas: CC, SNP-A, TDS y WES. Seleccionar una serie de SNVs y CNAs en cada paciente a partir de dicho estudio.
- Estudiar **mediante el análisis de SC** de HSPC de la MO, los cambios genéticos detectados previamente, al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad, tratamiento con lenalidomida y/o durante la progresión.
- Correlacionar las alteraciones genéticas encontradas en los distintos clones y subclones con las características clínicas, citológicas, citogenéticas y la evolución clínica de los pacientes, incluyendo la respuesta al tratamiento de los pacientes tratados con lenalidomida.

Materiales y métodos

Trabajo I

1. Pacientes y diseño del estudio

El Trabajo I fue un proyecto cooperativo entre el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras (Barcelona, España) y el departamento de hematología clínica y oncología médica de la Universidad de Medicina de Göttingen (Göttingen, Alemania). Los pacientes fueron reclutados de forma prospectiva por los dos centros participantes (Barcelona y Göttingen) con la ayuda de grupos cooperativos de ambos países. Se estudiaron un total de 48 pacientes que fueron diagnosticados de acuerdo a los criterios de la OMS del 2017 (3). En el estudio se incluyeron 38 pacientes con SMD, 5 con LMMC, 3 con LMAs y 2 con CCUS. Se obtuvo el consentimiento informado de todos ellos y la aprobación de los comités éticos de ambas instituciones de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

2. Procesamiento general de muestras

Se obtuvieron muestras pareadas de SP y MO al momento del diagnóstico o previo a recibir tratamiento (DX/PRE) de los 48 pacientes incluidos en el estudio. Todos los casos fueron estudiados prospectivamente mediante CC y secuenciación masiva dirigida (en inglés: *targeted deep sequencing*, TDS). Además, 25 de 31 pacientes con cariotipo normal se analizaron también por SNP-A.

Como muestras tumorales, para los estudios de SNP-A y TDS, se utilizó: A) ADN de células totales de MO; B) ADN de células mononucleadas de SP (SP-MC) y C) ADN de células CD34+ aisladas de SP (SP-CD34+). Con la selección de células SP-CD34+ se seleccionan las células inmaduras (potencialmente tumorales) circulantes en SP. Como muestra germinal (control pareado), para el estudio de SNP-A y TDS, se utilizó ADN de linfocitos T-CD3+ de SP (SP-CD3+).

En la figura 24 se esquematiza el procesamiento de las muestras, en los siguientes apartados se resume el procesamiento de la MO y SP, respectivamente, y en el anexo se incluyen los protocolos detallados.

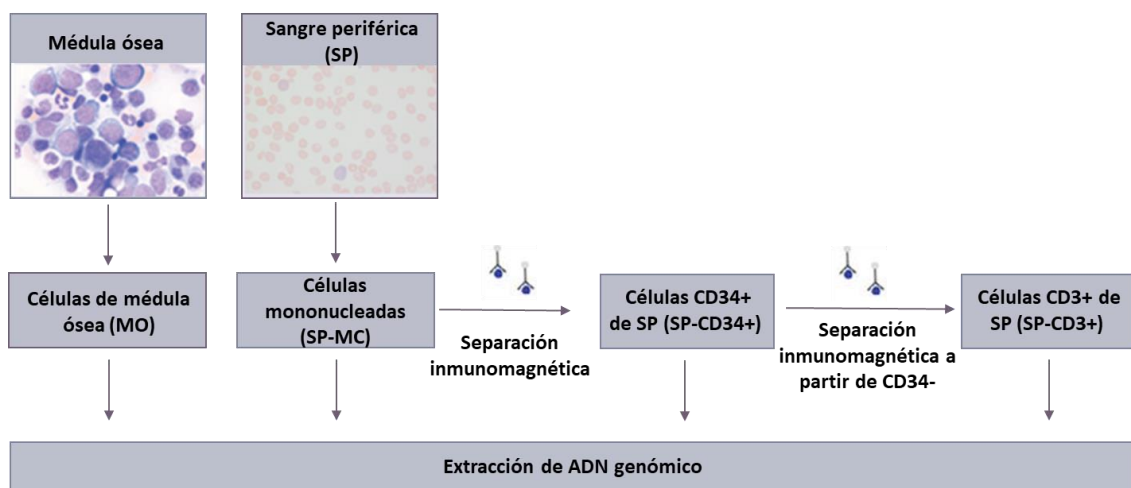


Figura 24. Representación esquemática del procesamiento de muestras.

2.1 Procesamiento de la MO

Primero se llevó a cabo la lisis eritrocitaria de la MO empleando una solución tampón a base de cloruro de amonio (TLE, tampón de lisis eritrocitaria: NH_4Cl - EDTA - HEPES). Para ello, se mezcla la MO con TLE en una proporción 1:10 y se incuba durante 20 minutos en un agitador a

temperatura ambiente. Se centrifuga (5 minutos a 580g), se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* celular en tampón fosfato salino (PBS 1X). Después, se hace el recuento celular con la cámara de Neubauer y se separaran 5 millones de células para la extracción de ADN. El resto de las células se criopreservan a una concentración de 100×10^6 células/mL en medio de criopreservación (80% suero fetal bovino, 20% dimetilsulfóxido).

2.2. Procesamiento de la SP

A continuación, se citan los pasos para el procesamiento de la SP:

1) Separación de SP-MC por gradiente de densidad: se mezcla la SP con PBS 1X en una proporción 1:1 y posteriormente se añade Ficoll en una proporción 1:2. Se centrifuga (20 minutos a 810g) y se recoge el anillo de células mononucleadas en un tubo. Para lavar las células se añaden 10mL de PBS 1X, se centrifuga (8 minutos a 460g) y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el pellet en PBS 1X para realizar el recuento de SP-MC con un contador celular automático (Auto Hematology Analyzer BC-3200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

2) Separación de células polimorfonucleares (SP-PMNC) por gradiente de densidad: después de separar el anillo de PB-MC, se descarta el plasma y el Ficoll del tubo, se añade PBS 1X (1:1) y se traspasa a una jeringa. Se añade una solución de dextrano 2% en una proporción 1:1, se mezcla y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en posición vertical. Los eritrocitos permanecen en la fase inferior junto con el dextrano, mientras que las células SP-PMNC permanecen en la fase superior con el PBS. Se recoge la fase superior en un tubo nuevo que se llena con PBS 1X y se centrifuga (8 minutos a 580g). Por último, se descarta el sobrenadante, se resuspende el *pellet* en PBS 1X, se realiza el recuento celular con el contador celular automático y se criopreservan las células a una concentración de 100×10^6 células/mL en medio de criopreservación.

3) De las células SP-MC previamente obtenidas, se separan 5 millones para la extracción del ADN. El resto de células se destina a la obtención de células SP-CD34+ y SP-CD3+.

4) Separación inmunomagnética de células CD34+ de SP: al pellet de SP-MC se le añaden 300 μ L de solución de albúmina de suero bovino y ácido etilendiaminotetraacético (BSA-EDTA), 100 μ L de solución bloqueante y 100 μ L de anticuerpo anti-CD34 (CD34 MicroBead Kit Human, Miltenyi Biotec) y se incuba 30 minutos a 4°C. A continuación, se hace un lavado con BSA-EDTA (centrifugar 10 minutos a 460g y decantar sobrenadante). Se resuspende el *pellet* en 500 μ L de BSA-EDTA y se procede a la separación celular por selección positiva con el separador automático AutoMACs® (protocolo Possel del AutoMACs®, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

5) Se recuperan las células SP-CD34- en un volumen de 2.5 mL y se lleva a cabo un recuento celular con Neubauer/contador automático.

6) Se recuperan las células SP-CD34+ en un volumen de 2 mL, de los cuales: 100 μ L se destinan para comprobar la pureza por citometría de flujo, 10 μ L para el recuento celular con cámara de Neubauer y el resto de células se destina a la extracción de ADN de SP-CD34+.

7) Separación inmunomagnética de linfocitos CD3+: esta población celular se separa a partir de las células CD34- obtenidas con el separador automático. Se realiza un lavado de la fracción CD34- (centrifugar 5 minutos a 460g y decantar sobrenadante) y, en

relación al número de células, se añaden los volúmenes necesarios de tampón BSA-EDTA (80 µL por 10×10^6 células) y de anticuerpo anti-CD3 (CD3 MicroBead Kit Human, Miltenyi Biotec) (20 µL por 10×10^6 células). Se incuba 15 minutos a 4°C y se realiza un segundo lavado (centrifugar 5 minutos a 460g y decantar sobrenadante). Por último, se resuspende el pellet en 500 µL de BSA-EDTA y se procede a la separación celular por selección positiva con el protocolo Possel del equipo AutoMACs® (Miltenyi Biotec).

8) Se recupera la fracción CD3- en un volumen de 2.5 mL, se hace un *pellet* celular y se congela a -80°C.

9) Se recuperan las células CD3+ en un volumen de 2 mL, de los cuales: 50 µL se destinan para comprobar la pureza por citometría de flujo, 10 µL para el recuento celular con cámara de Neubauer y el resto de células se destina a la extracción de ADN de SP-CD3+.

Usando aproximadamente 20-30 mL de SP, se recuperó una media de 1.14×10^6 células CD34+ (rango: 0.015×10^6 - 14.3×10^6) con una pureza media del 77.9% (rango: 31-99.5%). En el caso del enriquecimiento de los linfocitos T-CD3+, se alcanzó una pureza media de 94.9% (rango: 55-99.7%). La pureza se midió con el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™, Applied Biosystems® Attune™ Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific, discontinuado).

2.3. Extracción de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las células de las tres poblaciones tumorales (MO, SP-MC, SP-CD34+) y del tejido control (SP-CD3+). La extracción de ADN se realizó, en todos los casos, con un robot de extracción automática (Automated Nucleic Acid Purification–Maxwell® Systems, Promega, Madison, WI, EEUU) con el kit Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega), que se basa en la extracción de ADN por un sistema de bolas magnéticas afines al ADN. Una vez llevada a cabo la extracción, se midió la concentración mediante espectrofotometría (Nanodrop® 2000, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). El ADN genómico se conservó a -20°C y se utilizó posteriormente para su estudio mediante SNP-A y TDS.

3. Single nucleotide polymorphism arrays (SNP-A)

3.1. Procesamiento de muestras

En este trabajo se utilizó el *microarray* CytoScan® HD (Affymetrix®, Thermo Fisher Scientific). Este *array* contiene 2.67 millones de sondas para el análisis de alteraciones en el número de copias (*Copy number alterations*, CNA), incluyendo 750.000 sondas de SNP y 1.9 millones de sondas no polimórficas. Se siguió el protocolo CytoScan™ *User Guide* (P/N 703038 Rev. 4, Affymetrix®, Thermo Fisher Scientific) teniendo en cuenta los controles de calidad recomendados en el protocolo. Las etapas del protocolo se resumen en la figura 25.

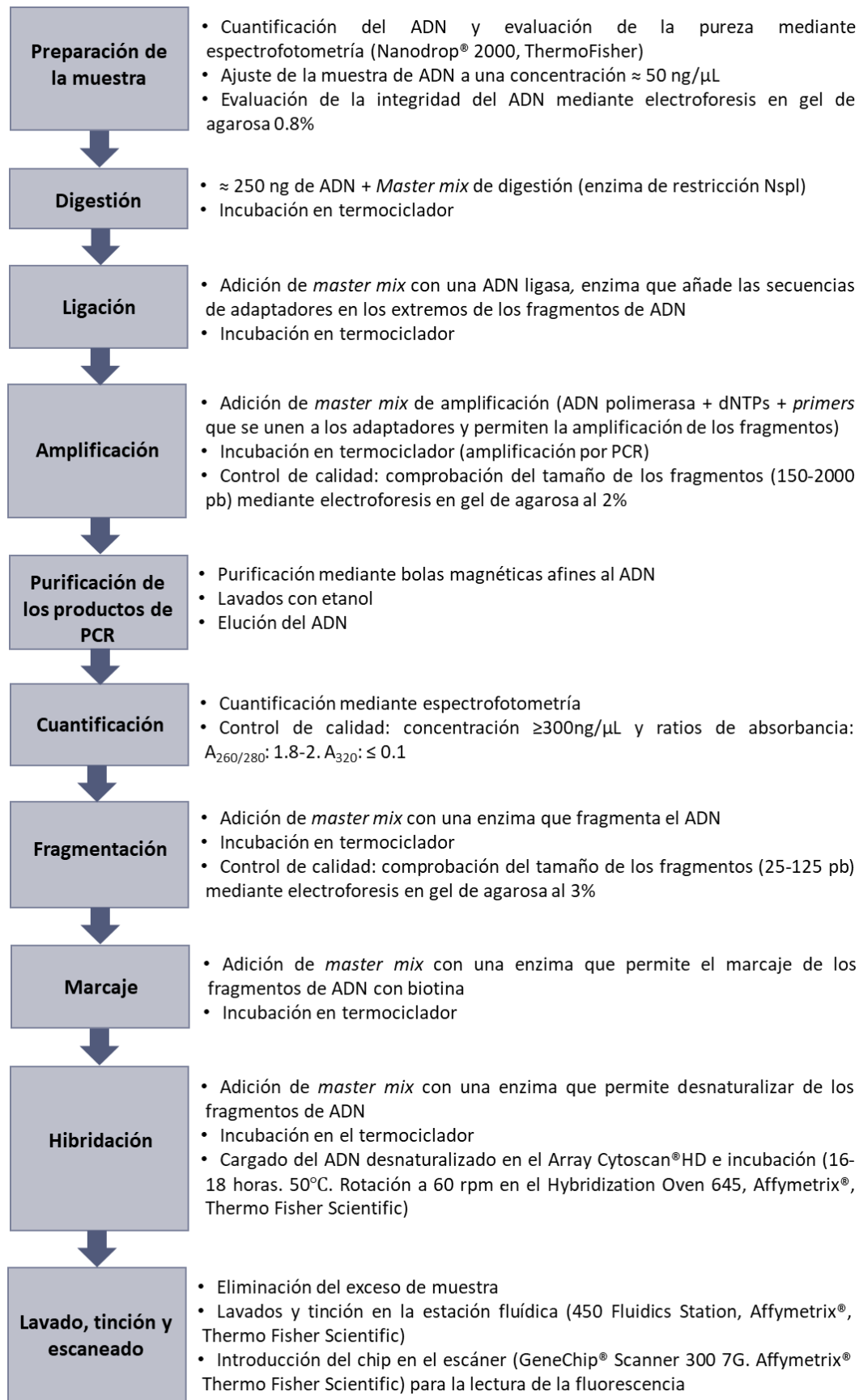


Figura 25. Etapas del protocolo CytoScan™ *User Guide* (P/N 703038 Rev. 4, Affymetrix®, Thermo Fisher Scientific).

3.2. Análisis de los resultados de SNP-A

Los resultados obtenidos se analizaron con el software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS) de Affymetrix® (versión 3.0.0.42) utilizando las anotaciones de la versión del genoma NCBLv33.1 (hg 19). Primero, el archivo de datos crudos obtenido del escaneado del *array* (archivo .CEL) se transforma en un archivo de visualizado (archivo .CYCHP). El siguiente paso es verificar que el archivo pasa los siguientes controles de calidad del array:

- MAPD (*Median of the Absolute valued of all Pairwise Differences*) y Waviness SD: estos dos parámetros permiten identificar la presencia de ruido de fondo en la muestra a analizar. Para dicho cálculo se mide de forma global la variación de las sondas a lo largo del genoma. Se deben obtener valores ≤ 0.25 para el MAPD y ≤ 0.12 para el Waviness SD.
- SNPQC: Este parámetro es indicativo de la calidad de las señales correspondientes a las sondas de SNP. Se debe obtener un valor ≥ 15 .

A continuación, se visualiza el archivo en el ChAS. Primero, se llevó a cabo una visualización individual y detallada de cada uno de los cromosomas para comprobar que la distribución y densidad de las sondas fueran correctas. Para ello, se tienen en cuenta los siguientes parámetros: *Weighted Log2 Ratio* (intensidad de señal en escala logarítmica), *Smooth Signal* (parámetro de visualización que homogeniza las alteraciones en el número de copias) y *Allele Difference* (diferencia de señal entre las sondas de SNP correspondientes al alelo A y al alelo B). Estos parámetros se usaron para el análisis del número de copias. Sin embargo, para el análisis de las CNN-LOH únicamente nos centramos en el *Allele Difference*.

Además, se hizo un análisis pareado de las muestras tumorales con la correspondiente muestra control del paciente (SP-CD3+) para determinar si el origen de los cambios observados era somático o germinal.

Finalmente, se consideraron aquellas alteraciones somáticas (presentes en la muestra tumoral y ausentes en la muestra de SP-CD3+) que cumplieren los siguientes criterios mínimos:

- CNAs: aquellas con un tamaño mínimo de 50 Kb y cubiertas por un mínimo de 10 marcadores.
- CNN-LOH: ≥ 2 Mb en el caso de las teloméricas, ≥ 25 Mb en el caso de las intersticiales y al menos 50 marcadores en ambos casos.

4. Secuenciación masiva dirigida

4.1. Preparación de librerías

La preparación de librerías se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de cada fabricante empleando un panel de captura (Nimblegen SeqCap EZ, Roche, Basilea, Suiza) que incluye regiones seleccionadas de 83 genes (Barcelona, Tabla 20) o un panel de amplicones (TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina, San Diego, CA, USA) que incluye regiones seleccionadas de 54 genes (Göttingen, Tabla 21), todos ellos relevantes en patologías mieloides. Para cada paciente, se secuenciaron las 3 muestras tumorales: MO, SP-CD34+ y SP-MC pareadas con su respectiva muestra control SP-CD3+. Se secuenciaron un total de 194 muestras. En la tabla 22 se citan los 51 genes comunes entre ambos paneles con las respectivas regiones estudiadas.

Tabla 20. Lista de los 83 genes incluidos en el panel de captura. Se resaltan en negrita aquellos genes comunes con el panel de amplicones (Tabla 21).

Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones
ABL1	4-6	<i>EED</i>	Todos	<i>MECOM</i>	Todos	SF3B1	10-16
<i>AEBP2</i>	Todos	<i>EP300</i>	Todos	<i>KMT2A</i>	Todos	<i>SFPQ</i>	Todos
ASXL1	9,11,12	ETV6	Todos	<i>MLL2</i>	Todos	<i>SH2B3</i>	Todos
<i>ATRX</i>	Todos	<i>EZH2</i>	Todos	MPL	10	SMC1A	Todos
<i>BCOR</i>	Todos	FLT3	14,15,20	<i>NF1</i>	Todos	SMC3	Todos
BCORL1	Todos	GATA1	2	NPM1	11,12	<i>SPARC</i>	Todos
BRAF	Todos	GATA2	Todos	NRAS	1-3	SRSF2	1
CALR	9	<i>GCAT</i>	Todos	PDGFRA	Todos	<i>STAG1</i>	Todos
CBL	8,9	GNAS	Todos	<i>PDGFRB</i>	Todos	STAG2	Todos
CBLB	9,10	HRAS	2,3	PHF6	Todos	<i>SUZ12</i>	Todos
<i>CDH13</i>	Todos	IDH1	4	<i>PHLPP1</i>	Todos	<i>TERC</i>	Todos
<i>CDH3</i>	Todos	IDH2	4	PTEN	5-8	<i>TERT</i>	Todos
CDKN2A	Todos	IKZF1	Todos	PTPN11	Todos	TET2	2-11
CEBPA	Todos	<i>IRF1</i>	Todos	RAD21	Todos	<i>TGM2</i>	Todos
<i>CREBBP</i>	Todos	JAK2	12-16	<i>RPS14</i>	Todos	<i>TIMM50</i>	Todos
CSF3R	Todos	JAK3	13	RUNX1	3-8	TP53	4-11
<i>CSNK1A1</i>	Todos	<i>JARID2</i>	Todos	<i>SALL4</i>	Todos	U2AF1	2,6
<i>CTCF</i>	Todos	KDM6A	Todos	<i>SBDS</i>	Todos	<i>UMODL1</i>	Todos
<i>CTNNA1</i>	Todos	KIT	2,8-11,13,17	SETBP1	4	WT1	7,9
CUX1	Todos	KRAS	1,2,3	<i>SF1</i>	Todos	ZRSR2	Todos
DNMT3A	Todos	<i>LUC7L2</i>	Todos	<i>SF3A1</i>	Todos		

Tabla 21. Lista de los 54 genes incluido en el panel de amplicones. Se resaltan en negrita aquellos genes comunes con el panel de captura (Tabla 20).

Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones
ABL1	4-6	DNMT3A	Todos	KDM6A	Todos	RAD21	Todos
ASXL1	12	ETV6	Todos	KIT	2,8-11,13,17	RUNX1	Todos
ATRX	8-10, 17-31	EZH2	Todos	KMT2A	2, 3	SETBP1	4
<i>BCOR</i>	Todos	<i>FBXW7</i>	9-11	KRAS	5-8	SF3B1	13-16
BCORL1	Todos	FLT3	14, 15, 20	MPL	10	SMC1A	2, 11, 16, 17
BRAF	15	GATA1	2	<i>MYD88</i>	3-5	SMC3	10,13,19,23,25,28
CALR	9	GATA2	2-6	<i>NOTCH1</i>	26-28, 34	SRSF2	1
CBL	8,9	GNAS	8, 9	NPM1	12	STAG2	Todos
CBLB	9,10	HRAS	2, 3	NRAS	2, 3	TET2	3-11
CBLC	9,10	IDH1	4	PDGFRA	12,14,18	TP53	2-11
CDKN2A	Todos	IDH2	4	PHF6	Todos	U2AF1	2,6
CEBPA	Todos	IKZF1	Todos	PTEN	5,7	WT1	7,9
CSF3R	14-17	JAK2	12, 14	PTPN11	3,13	ZRSR2	Todos
CUX1	Todos	JAK3	13				

Tabla 22. Lista de los 51 genes comunes que se estudiaron mediante los paneles empleados en el Trabajo I.

Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones
<i>ABL1</i>	4-6	<i>FLT3</i>	14, 15, 20	<i>PDGFRA</i>	12,14,18
<i>ASXL1</i>	12	<i>GATA1</i>	2	<i>PHF6</i>	Todos
<i>ATRX</i>	8-10, 17-31	<i>GATA2</i>	2-6	<i>PTEN</i>	5,7
<i>BCOR</i>	Todos	<i>GNAS</i>	8, 9	<i>PTPN11</i>	3,13
<i>BCORL1</i>	Todos	<i>HRAS</i>	2, 3	<i>RAD21</i>	Todos
<i>BRAF</i>	15	<i>IDH1</i>	4	<i>RUNX1</i>	Todos
<i>CALR</i>	9	<i>IDH2</i>	4	<i>SETBP1</i>	4
<i>CBL</i>	8,9	<i>IKZF1</i>	Todos	<i>SF3B1</i>	13-16
<i>CBLB</i>	9,10	<i>JAK2</i>	12, 14	<i>SMC1A</i>	2, 11, 16, 17
<i>CBLC</i>	9,10	<i>JAK3</i>	13	<i>SMC3</i>	10,13,19,23,25,28
<i>CDKN2A</i>	Todos	<i>KDM6A</i>	Todos	<i>SRSF2</i>	1
<i>CEBPA</i>	Todos	<i>KIT</i>	2,8-11,13,17	<i>STAG2</i>	Todos
<i>CSF3R</i>	14-17	<i>KMT2A</i>	2, 3	<i>TET2</i>	3-11
<i>CUX1</i>	Todos	<i>KRAS</i>	5-8	<i>TP53</i>	2-11
<i>DNMT3A</i>	Todos	<i>MPL</i>	10	<i>U2AF1</i>	2,6
<i>ETV6</i>	Todos	<i>NPM1</i>	12	<i>WT1</i>	7,9
<i>EZH2</i>	Todos	<i>NRAS</i>	2, 3	<i>ZRSR2</i>	Todos

En la figura 26 se resumen los pasos que se han seguido para la preparación de las librerías con el protocolo de captura, utilizado en Barcelona. Las librerías se prepararon siguiendo el protocolo de KAPA Library Preparation Kit Illumina® platforms (versión KR0935 – v1.13, Roche, Basilea, Suiza) y la captura se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo Nimblegen SeqCap EZ Library SR User's Guide (versión 4.2, Roche, Basilea, Suiza).

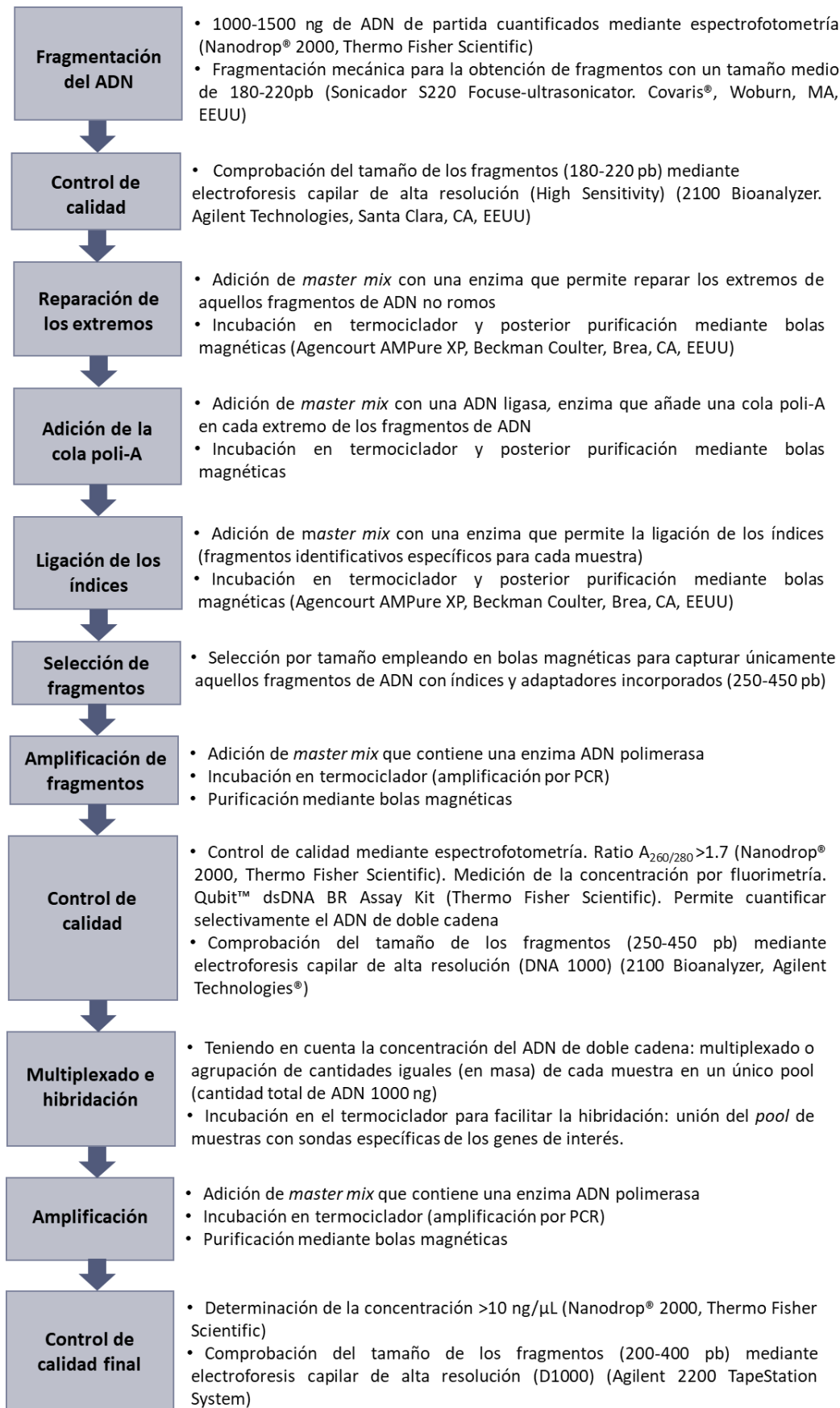


Figura 26. Etapas de la preparación de librerías con el protocolo de captura.

4.2. Secuenciación masiva dirigida (*Targeted deep sequencing, TDS*)

La secuenciación se llevó a cabo o bien utilizando el MiSeq o el HiSeq (Illumina) realizando lecturas *pair-end* 150-250 pb a una cobertura media de 7871x (panel de captura: 1523x, panel de amplicones: 12557x). Con excepción del primer paso, el análisis bioinformático de la TDS se llevó a cabo con un *pipeline* propio. A continuación, se describen brevemente cada una de las etapas del análisis:

- A) ***Base calling***: o llamado de las bases, ocurre dentro del secuenciador y consiste en la identificación de cada uno de los nucleótidos que componen los respectivos fragmentos de ADN secuenciados a partir de las lecturas de fluorescencia. De esta manera, se generan las lecturas o *reads*. Los resultados de este paso se almacenan en un archivo denominado .fastq. Para cada muestra se generan dos archivos, uno con las lecturas *forward* y otro con las lecturas *reverse*.
- B) ***Alineamiento***: consiste en alinear las lecturas almacenadas en los archivos .fastq contra el genoma de referencia, en este caso se empleó la versión hg19/GRCh37 del genoma humano y el alineador BWA 0.7.12 (149). Después, se llevó a cabo un realineamiento y recalibración de bases con las herramientas del software GATK 3.4.46 (150). A partir del archivo .fastq, al final de este paso se genera un archivo de extensión .bam para cada muestra.
- C) ***Variant calling***: o llamada de variantes, consiste en identificar aquellas diferencias que hay entre las lecturas de la muestra frente al genoma de referencia. Este paso se llevó a cabo con los paquetes SAMtools y VarScan, que permitieron obtener un listado de variantes candidatas, incluyendo variaciones de un solo nucleótido (en inglés: *single nucleotide variant, SNVs*) y pequeñas inserciones y deleciones (indels) (151,152). Este paso transforma los archivos .bam en archivos .vcf.
- D) ***Anotación de variantes***: este paso permite recolectar toda la información referente a: las zonas genómicas donde se han detectado cada una de las variantes (tipo de variante, gen, exón, consecuencia en la proteína); las bases de datos poblacionales (dbSNP, ExAC, Exome Variant Server y 1000 Genomes) o clínicas (COSMIC, ClinVar) en las que pueda haber sido reportada la variante; los predictores funcionales *in silico* (SIFT, PolyPhen2, Mutation Assessor, Mutation Taster) que estiman el efecto funcional que pueda tener la variante sobre la proteína (ej. neutro o deletéreo) y que pueden ayudar a predecir la patogenicidad de aquellas variantes previamente no descritas. Para ello, se empleó el software ANNOVAR (153).
- E) ***Filtrado de variantes***: consiste en filtrar las variantes obtenidas tras el *variant calling* para seleccionar las variantes somáticas candidatas y descartar aquellas que no reúnan ciertos criterios de calidad o características. En este paso queremos eliminar posibles errores de secuenciación o de alineamiento, variantes que no están situadas dentro de la zona codificante de los genes de interés y variantes germinales. Para ello, además de utilizar la información obtenida en la anotación de las distintas bases de datos, se llevó a cabo también un análisis visual usando el *Integrative Genome Viewer Software* (IGV, Broad Institute). Además, el origen somático de los resultados fue validado tras la comparación con los resultados de secuenciación del ADN germinal pareado de muestras de PB-CD3+. El punto de corte de las frecuencias alélicas de las variantes (en inglés: *variant allele frequency, VAF*) se definió calculando el intervalo de confianza (4.54%) incluyendo todas las variantes con valores de entre 0 – 10% (Figura 27).

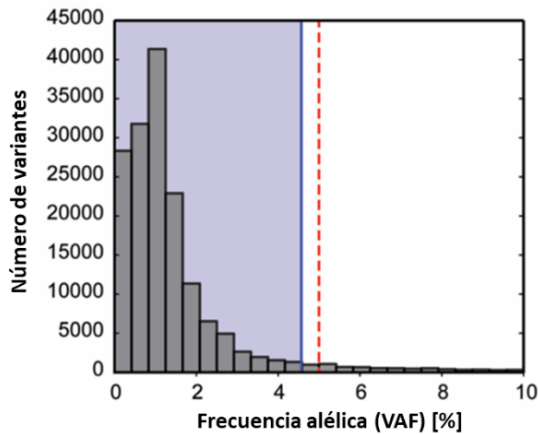


Figura 27. Histograma de todas las variantes detectadas con valores de frecuencia alélica (VAFs) comprendidos entre 0-10%. La elevada frecuencia de variantes con VAFs muy bajas resulta principalmente de errores de secuenciación. El intervalo de confianza del 95% (VAF: 4.54%) se indica con una línea azul. Con el objetivo de eliminar los errores de secuenciación y excluir estos falsos positivos, empleamos el 5% de VAF (línea discontinua roja) como límite general para el filtrado de variantes.

En la figura 28 se resumen los pasos que se han seguido para el filtrado de variantes, de acuerdo con los criterios propuestos en las Guías del Grupo Español de SMD (154).

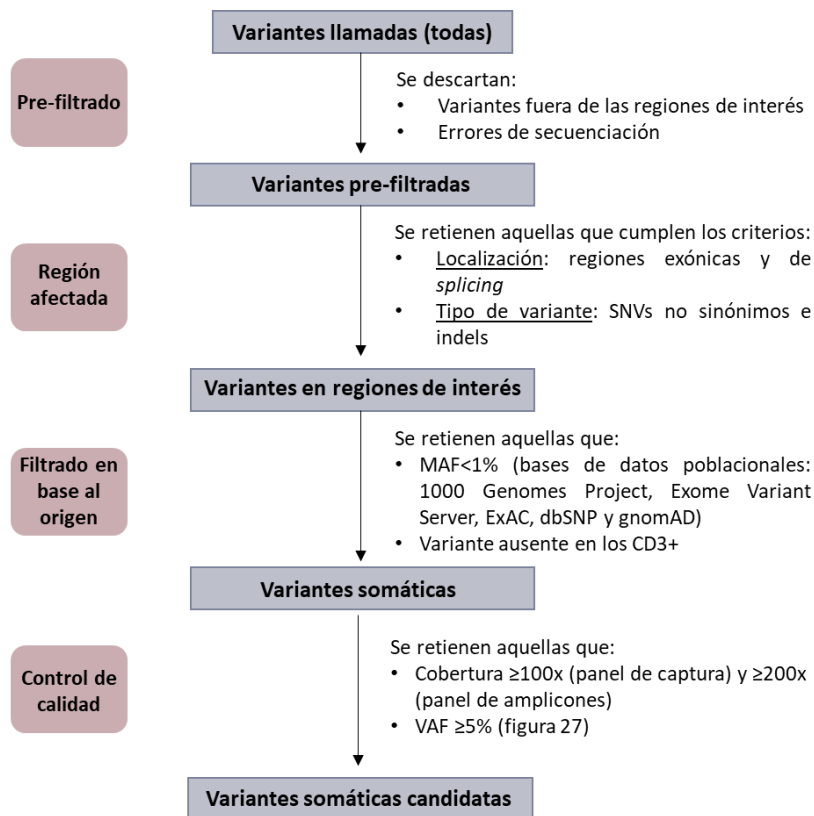


Figura 28. Pasos seguidos para el filtrado de las variantes en base a los criterios propuestos por las Guías del Grupo Español de SMD. Abreviaturas: SNV: *single nucleotide variants* (variaciones de un único nucleótido). Indels: inserciones/delecciones. MAF: *minor allele frequency* (frecuencia del alelo menor). VAF: *variant allele frequency* (frecuencia alélica de la variante).

5. Análisis estadístico

Se recopilaron los datos clínicos y biológicos como variables cualitativas y cuantitativas. Primero, se realizó un análisis descriptivo de las características principales de la cohorte de pacientes. Las variables categóricas se presentaron como frecuencias y porcentajes y las variables continuas como medianas y rangos. Las comparaciones entre variables se llevaron a cabo mediante las pruebas de chi-cuadrado, test exacto de Fisher o Mann-Whitney-Wilcoxon según fuese necesario. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software estadístico R o con el SPSS versión 23.0.

Trabajo II

1. Pacientes incluidos en el estudio

Para este estudio prospectivo, se seleccionaron un total de 4 pacientes con SMD con la delección 5q aislada que fueron diagnosticados de acuerdo a los criterios de la OMS del 2017 (3). Los pacientes fueron diagnosticados en el Hospital ICO-Germans Trias i Pujol (HGTiP) de Badalona (n=3) y en el Hospital Verge de la Cinta de Tortosa (n=1). Se obtuvo el consentimiento informado de todos ellos y la aprobación de los comités éticos de ambas instituciones de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Cabe destacar que, paralelamente a este estudio, 2/4 pacientes fueron incluidas en el ensayo clínico SINTRA-REV (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01243476), que constituye un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, fase III de lenalidomida *versus* placebo en pacientes con SMD de bajo riesgo (IPSS bajo e intermedio-1) con alteración en 5q- y anemia sin necesidades transfusionales. Actualmente, estos pacientes no reciben un tratamiento modificador de la enfermedad como primera opción terapéutica, sino que se opta por una observación y monitorización periódica hasta la progresión de la enfermedad, ya que la lenalidomida está aprobada en pacientes con anemia y dependencia transfusional. El ensayo clínico SINTRA-REV tiene por objeto analizar la eficacia del tratamiento con lenalidomida, es decir, estudiar si la administración temprana del fármaco podría retrasar la progresión de la enfermedad (que se manifiesta con necesidades transfusionales) en estos pacientes.

2. Diseño del estudio y muestras

De los 4 pacientes incluidos, se obtuvo muestra de SP y MO al momento del DX/PRE y se recogieron muestras de SP y/o MO de los seguimientos disponibles. Para el estudio, en 3 pacientes se incluyó al menos una muestra de MO durante el seguimiento (mínimo: 3 meses, máximo: 33 meses).

En la figura 29 se describe el procesamiento general de las muestras empleadas en este proyecto. Las muestras de MO, obtenidas al DX/PRE y durante el seguimiento, se utilizaron para extraer ADN tumoral total (ADN tumoral *bulk*) y para aislar células madre progenitoras hematopoyéticas (HSPC) $CD34^+CD117^+CD45^+CD19^-$ mediante citometría de flujo (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS). A partir de la SP, obtenida en el DX/PRE, se aislaron linfocitos T- $CD3^+$ mediante separación inmunomagnética y se utilizaron para extraer ADN germinal, que se utilizó como control pareado.

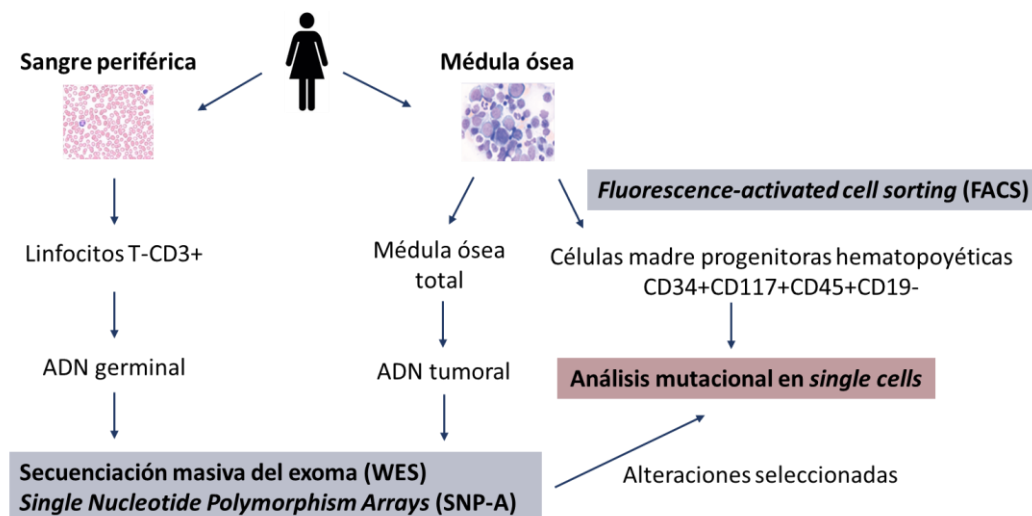


Figura 29. Esquema del procesamiento general de muestras

Se utilizó el ADN tumoral *bulk* del momento del DX/PRE con su respectivo control pareado para llevar a cabo la secuenciación del exoma (*whole exome sequencing*, WES) y el análisis mediante SNP-A para detectar SNVs y CNAs, respectivamente. Paralelamente, se secuenció a mayor profundidad el ADN tumoral *bulk* del DX/PRE y del último seguimiento disponible mediante TDS de un conjunto de genes relacionados con las neoplasias mieloides. Después de analizar estos resultados, se seleccionaron alteraciones candidatas (SNVs y CNAs) para ser estudiadas a nivel de SC en las muestras de DX/PRE de todos los pacientes, y en muestras de seguimiento seleccionadas. Para ello, se utilizó la población de HSPC separada previamente para aislar SCs. Después se analizaron de forma dirigida las alteraciones seleccionadas mediante *real time polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa, qPCR) en cada célula aislada. Finalmente, se analizaron los datos obtenidos y se reconstruyó la arquitectura clonal de cada muestra estudiada.

2.1. Procesamiento de la MO

De la misma manera en que se ha descrito anteriormente en el Trabajo I (apartado 2.1, página 50), primero se llevó a cabo la lisis eritrocitaria de la MO empleando una solución tampón a base de cloruro de amonio y se separaron 5 millones de células para la extracción de ADN.

El resto de la MO se usó para aislar células HSPC CD34+CD117+CD45+CD19-. Para separar esta población, las células se marcan con anticuerpos específicos (CD34, CD117, CD45 y CD19. BD Biosciences, San José CA, EEUU) y se incuban 15 minutos, a oscuras y a temperatura ambiente. Después, se realiza un lavado con PBS 1X, se centrifuga (5 minutos a 580g) y tras descartar el sobrenadante, se resuspende el pellet de células en PBS 1X para obtener una concentración de 10×10^6 células/mL (con un volumen mínimo de 1 mL).

El aislamiento de las HSPC se llevó a cabo mediante FACS en el Servicio de Citometría del Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP), en un separador celular FACSAria™ II (BD Biociencias). Una vez obtenidas las células de interés, se centrifugaron (5 minutos a 580g) y se descartó el sobrenadante para luego criopreservar las células en medio de criopreservación. Siempre que fue posible, se guardaron un mínimo de 3 criotubos con al menos 30.000 células/100µL cada uno.

2.2. Procesamiento de la SP

La SP fue procesada de la misma manera que en el Trabajo I (apartado 2.2, página 51). Brevemente, primero se separaron las SP-MC por gradiente de densidad empleando Ficoll. Después de separar el anillo de SP-MC, se separaron las SP-PMNC empleando una solución de dextrano al 2%.

A partir de 30 millones de células SP-MC obtenidas previamente, se separan inmunomagnéticamente los linfocitos T-CD3+ mediante selección positiva con el protocolo Possel del equipo AutoMACs® (Miltenyi Biotec). Se recuperan las células CD3+ en un volumen de 2 mL, de los cuales: 50 µL se destinan para comprobar la pureza por citometría de flujo, 10 µL para el recuento celular con cámara de Neubauer y el resto de células se destina a la extracción de ADN de SP-CD3+.

El resto de las SP-MC y todas las SP-PMNC se criopreservan a una concentración de 100×10^6 células/mL en medio de criopreservación (ver más detalles en anexo).

2.3. Extracción de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las muestras de MO y de su correspondiente control pareado (SP-CD3+). La extracción de ADN se realizó, en todos los casos, con un robot de extracción automática (Automated Nucleic Acid Purification–Maxwell® Systems, Promega, Madison, WI, EEUU) con el kit Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega), que se basa en la extracción de ADN por un sistema de bolas magnéticas afines al ADN. Una vez llevada a cabo la extracción, se midió la concentración mediante espectrofotometría (Nanodrop® 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). El ADN genómico se conservó a -20°C y se utilizó posteriormente para su estudio mediante SNP-A, WES y TDS.

3. Técnicas moleculares y selección de las alteraciones genéticas a estudiar en *single cell*

3.1. Single nucleotide polymorphism arrays (SNP-A)

Para este trabajo también se utilizó el *microarray* CytoScan® HD (Affymetrix®, Thermo Fisher Scientific). Tanto para el procesamiento de las muestras como para el análisis de los resultados, se siguieron los mismos pasos que se describieron en el apartado 3 (página 52) del Trabajo I. Mediante esta técnica, se analizó el ADN tumoral *bulk* del momento del diagnóstico con su respectivo control pareado con el objetivo de detectar y seleccionar CNAs para su posterior análisis a nivel de SC.

3.2. Secuenciación del exoma (WES)

La WES permite secuenciar la porción codificante del genoma humano. Dado que los cambios en las regiones codificantes son responsables del 85% de las enfermedades genéticas conocidas, la WES constituye una potente herramienta en un entorno clínico (134).

La WES se llevó a cabo en muestras pareadas de MO total y ADN de linfocitos T-CD3+. Tanto la preparación de librerías como la secuenciación propiamente dicha se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG, Barcelona). Las librerías se prepararon a partir de 1.5 µg de ADN genómico y se usó el protocolo SureSelect Human Exome Kit 51 Mb versión 5 (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, EEUU). En un instrumento HiSeq 2500 de Illumina, se secuenciaron las muestras a una cobertura media mínima de 140x para las muestras tumorales y de 60x para las muestras control.

En cuanto al análisis, consta de los mismos pasos ya descritos en el apartado 4.2 (página 58) y que se resumen en la figura 30.



Figura 30. Resumen de los pasos seguidos para el análisis de los resultados de la secuenciación masiva (apartado 4.2, página 58).

Brevemente, las lecturas fueron alineadas contra el genoma de referencia (hg19/GRCh37) utilizando el software GEM (155). El *variant calling* se llevó a cabo con los softwares MuTect, Strelka2 y Lancet, a partir de los cuales se obtuvo una lista de variantes somáticas candidatas (156–158).

Para la anotación de variantes, se emplearon tanto bases de datos poblacionales (dbSNP, ExAC, Exome Variant Server y 1000 Genomes) como clínicas (COSMIC, ClinVar) y predictores funcionales *in silico* (SIFT, PolyPhen2, Mutation Assessor, Mutation Taster).

Para el filtrado de variantes, además de utilizar la información obtenida en la anotación de las distintas bases de datos, se llevó a cabo también un análisis visual usando el IGV (Broad Institute). Además, el origen somático de los resultados fue validado tras la comparación con los resultados de secuenciación del ADN germinal pareado de muestras de SP-CD3+. +). Se tuvieron en cuenta aquellas variantes somáticas con una VAF>5% a no ser que se tratase de variantes previamente asociadas a neoplasias mieloides. Posteriormente, se seleccionaron 4-6 SNVs candidatos para ser estudiados en SCs.

3.3. Secuenciación masiva dirigida

3.3.1. Preparación de librerías

La preparación de librerías se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante empleando un panel de captura (SureSelectQXT Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) que incluye regiones seleccionadas de 40 genes relevantes en patologías mieloides (tabla 23). Los pasos principales del protocolo se resumen en la figura 31.

Tabla 23. Lista de los 40 genes con sus respectivos exones incluidos en el panel empleado.

Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones
<i>ASXL1</i>	9, 11-12	<i>DNMT3A</i>	Todos	<i>KMT2A</i>	3-9	<i>SF3B1</i>	10-16
<i>ASXL2</i>	11-12	<i>EZH2</i>	Todos	<i>KRAS</i>	2-3	<i>SMC3</i>	Todos
<i>BCOR</i>	Todos	<i>ETV6</i>	Todos	<i>MPL</i>	Todos	<i>SRSF2</i>	1
<i>BCORL1</i>	Todos	<i>FLT3</i>	13-15, 20	<i>NF1</i>	Todos	<i>STAG1</i>	Todos
<i>BRAF</i>	15	<i>GATA1</i>	Todos	<i>NPM1</i>	10-11	<i>STAG2</i>	Todos
<i>CALR</i>	9	<i>GATA2</i>	Todos	<i>NRAS</i>	2-3	<i>TET2</i>	Todos
<i>CBL</i>	8,9	<i>IDH1</i>	Todos	<i>PTPN11</i>	Todos	<i>TP53</i>	3-11
<i>CEBPA</i>	Todos	<i>IDH2</i>	Todos	<i>RAD21</i>	Todos	<i>U2AF1</i>	2-6
<i>CSF3R</i>	Todos	<i>JAK2</i>	Todos	<i>RUNX1</i>	Todos	<i>WT1</i>	2-10
<i>CSNK1A1</i>	3-4	<i>KIT</i>	2,8-14,17	<i>SETBP1</i>	4	<i>ZRSR2</i>	Todos

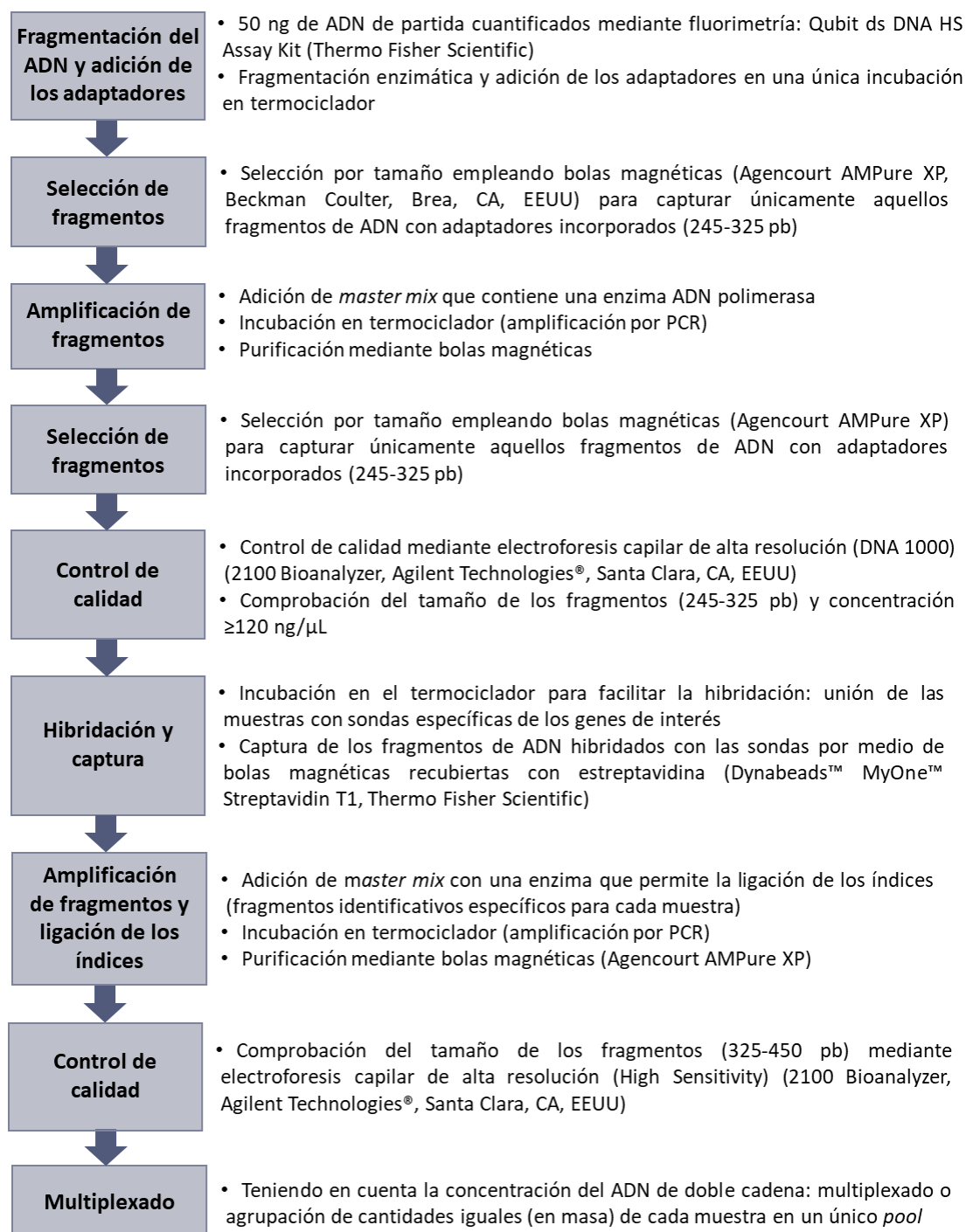


Figura 31. Etapas de la preparación de librerías con el protocolo SureSelectQXT Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies).

3.3.2. Secuenciación y análisis

La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del IGTP en un MiSeq (Illumina) realizando lecturas *pair-end* 2x75 pb a una cobertura media de 1000x. Con excepción del primer paso, el análisis bioinformático de la TDS se llevó a cabo con un *pipeline* propio descrito anteriormente en el apartado 4.2 (página 58). En la figura 28 se resumen los pasos que se siguieron para el análisis de los datos de secuenciación.

La TDS, se ha utilizado para validar los SNVs (en genes mieloides) detectados por WES y detectar otras mutaciones relevantes (en genes mieloides) que pudieran estar a muy baja frecuencia. Al secuenciar a una cobertura mayor, la sensibilidad es superior, lo cual facilitaría la detección de alteraciones a baja frecuencia.

4. Análisis en SC

4.1. Diseño y validación de ensayos

Para cada paciente incluido en este estudio, se diseñaron ensayos específicos TaqMan® (Thermo Fisher Scientific) dirigidos a detectar aquellos SNVs y CNAs seleccionados, previamente identificados mediante TDS, WES y SNP-A. Estos ensayos se basan en la utilización de sondas que emiten fluorescencia a medida que la reacción de PCR avanza, permitiendo hacer estudios en tiempo real (*real-time*).

4.1.1. Ensayos de SNVs

Para estudiar mutaciones puntuales, cada SNV se estudió con un ensayo que consiste en un par de *primers* (uno *forward* y uno *reverse*) que delimitan la región de interés, y un par de sondas específicas: una marcada con el fluorocromo VIC, que es complementaria a la secuencia *wild-type* (normal) y otra marcada con el fluorocromo FAM, que es complementaria a la secuencia mutada (Figura 32). El diseño de estos ensayos *custom* de SNV se llevó a cabo con la herramienta online Custom TaqMan Assay Design Tool (Thermo Fisher Scientific).

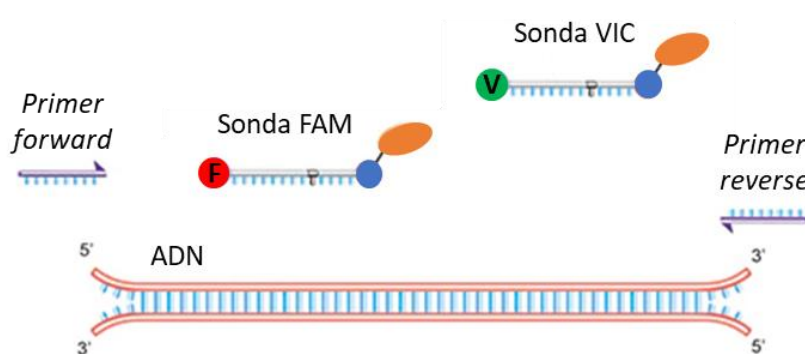


Figura 32. Representación de los componentes de los ensayos de tipo TaqMan® para el estudio de mutaciones puntuales.

El siguiente paso fue llevar a cabo la validación de los ensayos de SNV, es decir, comprobar que cada uno es específico de las alteraciones que se quieren estudiar. Esto se llevó a cabo mediante qPCR en la plataforma convencional QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Cada ensayo validado fue testado por triplicado en la muestra tumoral del paciente (ADN total de MO) y en ADN de linfocitos T-CD3+ de un control sano (control negativo).

El ensayo FAM (mutado) debe dar señal solamente en el ADN tumoral, mientras que el ensayo VIC (*wild-type*) tiene que ser positivo tanto en el ADN control como en el ADN tumoral (siempre que la mutación sea heterocigota). La diferencia entre señales tiene que ser suficiente para poder distinguir entre un ensayo positivo y otro negativo.

4.1.2. Ensayo de CNAs

En el caso de cada CNA, se seleccionaron 3 ensayos de *copy number* prediseñados (Thermo Fisher Scientific) dirigidos contra un gen localizado en la región alterada, cada uno de los cuales consiste en una pareja de *primers* que delimitan la región y una sonda específica marcada con

FAM. A diferencia de los ensayos de SNV, estos ensayos están prediseñados y validados por Thermo Fisher, por lo tanto, no requieren validación adicional.

4.1.3. Ensayos control

Además de estudiar los SNVs y CNAs seleccionados y específicos de cada paciente, en todos los casos se incluyeron los siguientes controles:

- Control positivo para los ensayos de SNVs (SNV_ref): se usó como referencia un ensayo de genotipado pre-diseñado para un locus en heterocigosis (rs346172) previamente descrito (159).
- Referencia endógena para el estudio de CNAs: número de copias del gen beta-2-microglobulina ($\beta 2M$), ya que es una región diploide del genoma (160).

4.2. Captura y procesamiento de SCs

La captura y procesamiento de SCs se llevó a cabo empleando el sistema C1 de Fluidigm® (San Francisco, CA, EEUU), empleando los chips de captura C1™ Single-Cell Open App™ IFC de 10–17 μm para la captura de células tumorales (HSPC CD34⁺CD117⁺CD45⁺CD19⁻) y los de 5–10 μm para las células control (linfocitos T-CD3⁺ de un donante sano). El protocolo que se describe a continuación se basa en el descrito por el propio fabricante para la captura de SC y pre-amplificación empleando ensayos TaqMan® (PN 100-6117) (Figura 33).



Figura 33. Esquema donde se resumen de los pasos de captura y procesamiento de *single cells* empleando el sistema C1 de Fluidigm®.

En ambos casos (células tumorales y células control) se partió de poblaciones celulares previamente separadas y criopreservadas (apartado 2.1, página 63). Para la captura de SC, la población celular de partida se descongela en medio RPMI 1640 (suplementado al 10% con suero fetal bovino) previamente atemperado a 37°C. Posteriormente, las células se centrifugan (5 minutos a 580g), se lavan con *suspension buffer* (*Hanks' Balanced Salt Solution*, [Gibco, 14175-053] suplementado con EDTA 1mM [Sigma-Aldrich, E6758] y 2% de suero fetal bovino [Gibco, 10270106]) y tras centrifugar (5 minutos a 580g) y descartar el sobrenadante, el *pellet* celular se vuelve a resuspender en *suspension buffer*. Las células se incuban durante 15-20 minutos a 37°C y posteriormente se realiza el recuento en la cámara de Neubauer para ajustar la concentración a 1000 células/ μL .

A continuación, se cargan 15 μL de suspensión celular en el chip de la C1 que cuenta con 96 sitios de captura y se procede al *loading*. En este paso, cada célula es aislada en una cámara de reacción individual. El siguiente paso consta en verificar y anotar el número de células capturadas en cada sitio. Para ello, se extrae el chip de la C1 y se visualiza cada sitio de captura con un microscopio óptico. En el análisis posterior, solo se tienen en cuenta aquellos sitios donde se ha podido verificar la captura de una única célula.

A continuación, se llevan a cabo la lisis celular y la pre-amplificación dirigida del ADN de cada SC. Tanto el *buffer* de lisis como la *master mix* de pre-amplificación se cargan en el chip, y a su vez, éste se vuelve a cargar en el sistema C1 donde tienen lugar ambas reacciones en cada uno de los sitios de captura. Por un lado, se preparan 9 µL de solución de lisis compuesta de 0.3 mg/mL de proteinasa K (Qiagen, 19131) y 0.01% de Tween 20 (Sigma Aldrich, P9416) en *buffer* salino HEPES (Sigma Aldrich, 51558). La lisis se lleva a cabo mediante una incubación de 50 minutos a 60°C seguida de 10 minutos a 98°C. En cuanto a la *master mix* de pre-amplificación, ésta se prepara con 32.5 µL de TaqMan™ PreAmp Master Mix 2X (Thermo Fisher, 4391128) y 6.5 µL de una dilución 1:100 de *primer mix* (mix compuesta por todos los ensayos de las regiones de interés. 0.18 µM de cada ensayo). La desnaturalización del ADN tiene lugar durante 15 minutos a 95°C y posteriormente se llevan a cabo 18 ciclos de amplificación: 25 segundos a 95°C seguidos de 4 minutos a 60°C.

El último paso consiste en recuperar el ADN pre-amplificado de cada SC. Para ello, se lleva a cabo una dilución 1:5 del producto de PCR empleando *C1 DNA suspensión buffer* (Fluidigm®, 100-5319) en placas de 96 pocillos que luego se conservan a -20°C.

4.3. Estudio mediante qPCR de las alteraciones genéticas en SC mediante la plataforma Biomark™ HD de Fluidigm®

El Biomark™ HD de Fluidigm® consiste en un equipo automatizado de alto rendimiento de qPCR que emplea chips con tecnología de microfluídica. Esta última característica permite llevar a cabo reacciones con volúmenes (tanto de reactivos como de muestras) del orden de nanolitros, lo que supone una ventaja en términos de costes. Se dice que es de alto rendimiento porque permite estudiar en un solo *run* (un solo estudio) miles de reacciones en simultáneo. Este equipo emplea chips IFC (*internal fluidic circuit*, circuito de fluido interno) que en su interior poseen un sistema de microcircuitos y válvulas por donde fluyen cada una de las muestras y ensayos que se van repartiendo en cada una de las cámaras de reacción. Hay chips de diferente capacidad y, en el caso de este proyecto, se emplearon los 96.96 Dynamic Array GE IFC, que poseen espacio para un máximo de 96 muestras a ser analizadas con un máximo de 96 ensayos, lo que supone un total de 9216 reacciones de PCR en simultáneo. El protocolo que se describe a continuación se basa en el descrito por el propio fabricante (PN 100-2638 D1) y se resume en la figura 34.

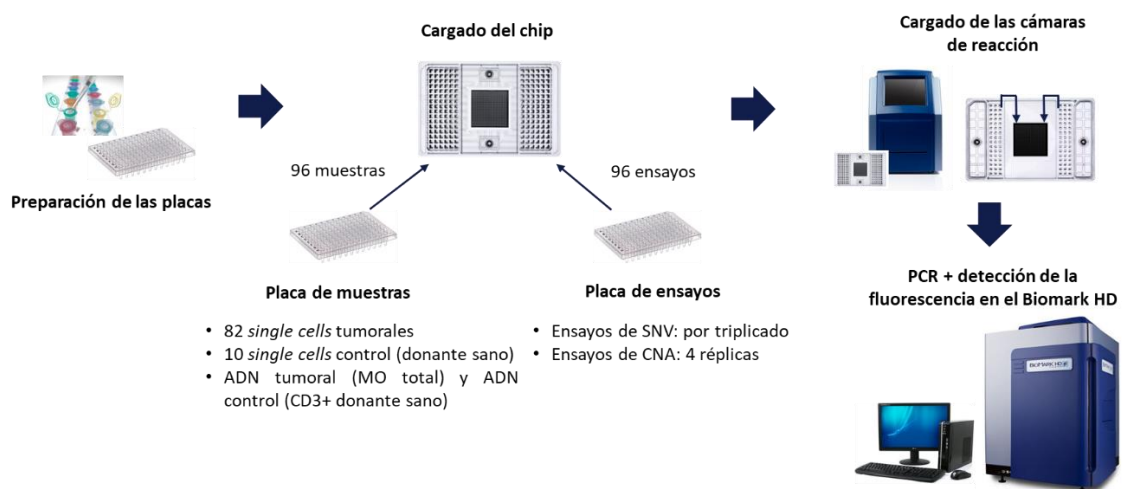


Figura 34. Representación esquemática de los pasos seguidos para el análisis de alteraciones genéticas en *single cell* empleando el Biomark™ HD (Fluidigm®). MO: médula ósea. SNV: *single nucleotide variant* (mutación puntual). CNA: *copy number alteration* (alteración en el número de copias).

Tal como se describe en el protocolo, cada chip del Biomark™ se rellena a partir de dos placas de 96 pocillos preparadas previamente y que contienen las muestras y los ensayos, respectivamente. A modo de resumen:

A) Placa de ensayos

- **Diseño de la placa:** cada ensayo de SNV se estudió por triplicado mientras que cada ensayo de CNA fue estudiado por cuadruplicado. Como se ha mencionado anteriormente, además de los SNVs y CNAs seleccionados para cada paciente, en todos los casos se incluyó el SNV_ref (rs346172, control positivo para los ensayos de SNVs) y 3 ensayos contra el gen β 2M (referencia endógena para el estudio de CNAs) (Figura 35).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SNV_1	SNV_1	SNV_1	SNV_2	SNV_2	SNV_2	SNV_3	SNV_3	SNV_3	SNV_4	SNV_4	SNV_4
B												
C	SNV_ref	SNV_ref	SNV_ref									
D												
E	CNA1_1	CNA1_1	CNA1_1	CNA1_1	CNA1_2	CNA1_2	CNA1_2	CNA1_2	CNA1_3	CNA1_3	CNA1_3	CNA1_3
F	CNA2_1	CNA2_1	CNA2_1	CNA2_1	CNA2_2	CNA2_2	CNA2_2	CNA2_2	CNA2_3	CNA2_3	CNA2_3	CNA2_3
G												
H	β 2M_1	β 2M_1	β 2M_1	β 2M_1	β 2M_2	β 2M_2	β 2M_2	β 2M_2	β 2M_3	β 2M_3	β 2M_3	β 2M_3

Figura 35. Representación del diseño de una placa de ensayos. SNV: *single nucleotide variant* (mutación puntual). SNV_ref: SNV de referencia. CNA: *copy number alteration* (alteración en el número de copias).

- **Preparación de la placa:** cada pocillo de la placa de los ensayos se preparó mezclando 3 μ L de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm® PN 100-7611) con 3 μ L del correspondiente ensayo TaqMan® a 20X (primers a 18 μ M y sondas a 4 μ M).

B) Placa de muestras

- **Diseño de la placa:** en cada placa se estudiaron, además de las células de interés, 10 SCs control (linfocitos T-CD3+ de un donante sano), ADN tumoral *bulk* del paciente en estudio, ADN total de linfocitos T-CD3+ de un donante sano (control negativo) y dos controles sin muestra o blancos (*non template control*, NTC). Teniendo en cuenta que estos controles ocupan 14 pocillos de la placa de 96, queda espacio para estudiar 84 células de interés en cada placa. Se estudiaron un promedio de 6 placas por paciente (3 al momento del DX/PRE y 3 al seguimiento). Además, para cada paciente estudiado, se incluyó una placa extra con células control: linfocitos T-CD3+ de un donante sano (células diploides). Los resultados de esta placa se utilizaron principalmente para el análisis de las CNAs.
- **Preparación de la placa:** el primer paso consiste en la preparación de la *master mix* que se compone de 360 μ L de TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix 2X no AmpErase™ UNG (Thermo Fisher, 4352042) y 36 μ L de 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm® PN 100-7610). Posteriormente, se reparten 3.3 μ L de esta *master mix* en cada pocillo y, posteriormente, se añade a cada uno 2.7 μ L de ADN pre-amplificado de la correspondiente célula de interés (proveniente de la reacción previa en el sistema C1).

Una vez cargadas las placas de ensayos y muestras en el chip, éste es introducido en el IFC Controller HX (Fluidigm®) para el *loading*. En este paso, el líquido contenido en cada pocillo se divide en nano volúmenes que se reparten entre las distintas cámaras de reacción donde se mezcla cada muestra con el respectivo ensayo. Una vez finalizado el *loading*, el chip se introduce en el Biomark™ HD, que contiene un sistema de qPCR (termociclador acoplado a un detector de fluorescencia). La reacción inicia con una *thermal phase* durante 40 minutos a 70°C y 30 segundos a 60°C, seguida de una fase *hot start* (activación de la enzima) durante 60 segundos a 98°C. Posteriormente se llevan a cabo 35 ciclos de PCR: 5 segundos a 97°C y 20 segundos a 60°C.

Una vez terminada la reacción, el *software* Biomark Data Collection (Fluidigm®) genera un archivo de salida que contiene los datos crudos de la reacción de qPCR. El archivo .bml generado es el que se utiliza para analizar los resultados de dicha reacción.

4.4. Análisis de datos

4.4.1. Análisis de los SNVs a partir de los resultados de qPCR

Para analizar los resultados de los estudios de SNVs, los archivos .bml se cargaron y analizaron en el programa Fluidigm Real-Time PCR Analysis software v.4.3.1. Los resultados se pueden visualizar en un *heatmap* o en una tabla con los valores de Ct de cada reacción (Figura 36).

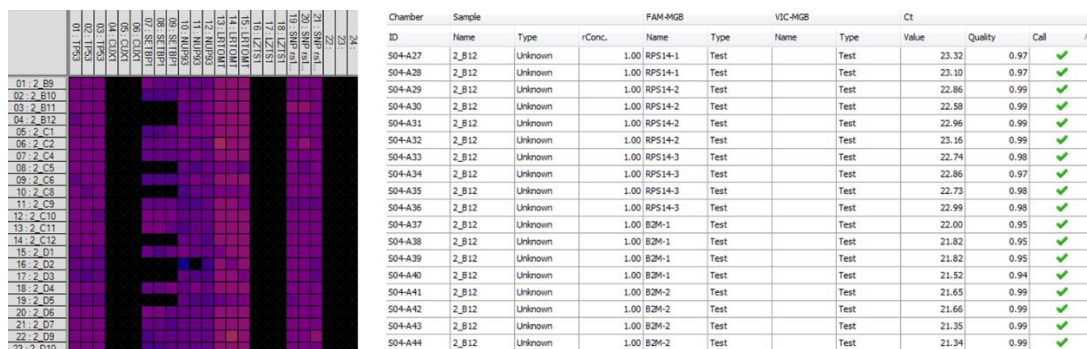


Figura 36. Representación de los resultados de qPCR tras el análisis en el Fluidigm Real-Time PCR Analysis software. A la izquierda, la representación en un *heatmap*, a la derecha en una tabla con valores de Ct.

Primero se estableció el *threshold* (umbral) para cada ensayo de forma manual, luego se visualizó el resultado de cada reacción y se descartaron aquellas células que no cumplieron con los criterios de calidad: se descartan las reacciones con Ct>30 y aquellas donde no hubo amplificación en los controles (tanto de SNVs como de CNAs). Además, siempre se comprobó que las 10 células control de la placa fuesen negativas para los ensayos de SNVs y positivas para el SNV_ref.

Se consideró que una mutación estaba presente en heterocigosis en una célula cuando se detectaron las señales de las sondas mutadas y *wild type* (FAM y VIC, respectivamente). Por el contrario, se consideró que la mutación estaba presente en homocigosis en una célula cuando solo se detectaba señal correspondiente a la sonda mutada (FAM). Los resultados se pueden exportar en formato .csv o en un archivo de Excel para integrarlos con los resultados del análisis de CNAs.

4.4.2. Análisis de copy number a partir de los resultados de qPCR

Para el análisis de los datos crudos para el estudio de CNAs, se estableció el *threshold* de forma automática y después se siguió el mismo proceso que para los SNVs en el Real-Time PCR Analysis Software (Fluidigm®). Una vez pasados los filtros de calidad y con los resultados exportados en

un archivo .csv, se tiene un listado de valores de Ct para cada uno de los ensayos de interés y el de referencia.

Para realizar el análisis de *copy number* (número de copias), se utilizó el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Applied Biosystems) para cada locus, con modificaciones para incorporar los datos de 3 ensayos distintos para la región de interés (región target) y otros 3 para la región de referencia (*reference*, en este proyecto la β2M) (161).

El método $\Delta\Delta\text{Ct}$ consiste en restar al valor de ΔCt ($\text{Ct}_{\text{target}} - \text{Ct}_{\text{reference}}$) en la muestra problema, el valor de ΔCt de la muestra calibradora (la muestra control diploide). Cada valor $\Delta\Delta\text{Ct}$ dará un valor calculado de número de copias (*calculated copy number*, cCN), a través de la siguiente relación: $\text{cCN} = 4^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. El programa CopyCaller v2.1 (Applied Biosystems) se utilizó para estimar los cCN, comparando las 3 regiones del ensayo de referencia versus las 3 regiones del ensayo *target*. De esta forma, para cada región de interés de cada célula se obtuvieron 9 cCN. A continuación, se descartaron los cCN con un valor de confianza <0.5 . Tampoco se tuvieron en cuenta aquellas células con un $\text{cCN} > 4.5$, ya que el número de réplicas utilizadas no asegura la precisión necesaria para la estimación de CN superiores a 4.5 (162). Para cada ensayo de interés, se calculó la media ponderada de los valores de CN (wCN) siempre y cuando se dispusiera del valor del cCN para un mínimo de 3/9 réplicas. Cuando el valor de la wCN era inferior a 1.5 se consideró que en esa región existía una pérdida de material genético (CN = 1), mientras que si el valor de la wCN se encontraba entre 1.5-2.5 se consideró que la región no tenía alteración en el número de copias (CN = 2). Finalmente, si el valor de la wCN era 2.4, se consideró que en dicha región había una ganancia de material genético (CN = 3).

El análisis de *copy number* de la placa de células control (células diploides) se empleó para establecer el error del método. Para cada región se calculó el porcentaje de células control cuyos valores de wCN erróneamente denotaban una pérdida o ganancia de material genético y se empleó la máxima frecuencia como *threshold* para determinar el número mínimo de células tumorales requeridas para considerar un subclon en el análisis de *copy number* (*subclonal threshold*). Solo se consideraron válidas y fueron incluidas en la etapa posterior de análisis aquellas poblaciones subclonales que superaron el *subclonal threshold*.

4.4.3. Filtrado de las poblaciones obtenidas e identificación de subclones presentes en cada muestra estudiada

El siguiente paso fue combinar el análisis de SNVs y CNAs de cada SC y agrupar aquellas células con el mismo perfil para crear subpoblaciones. Se estimó un número total de células tumorales analizadas filtradas y en base a ello se calculó el porcentaje que suponía cada subpoblación respecto al total de células. En base a esto, se propuso la arquitectura clonal para cada muestra analizada (orden de adquisición de mutaciones) y evolución clonal tras analizar las muestras pareadas de cada paciente: DX/PRE y seguimiento.

5. Análisis estadístico

Se recopilaron los datos clínicos y biológicos como variables cualitativas y cuantitativas. Primero, se realizó un análisis descriptivo de las características principales de la cohorte de pacientes. Las variables categóricas se presentaron como frecuencias y porcentajes y las variables continuas como medianas y rangos.

Resultados

Trabajo I

1. Características de los pacientes

En el estudio se incluyeron un total de 48 pacientes (30 hombres y 18 mujeres) cuyas principales características demográficas, clínicas y parámetros hematológicos se encuentran resumidos en la Tabla 24. La mediana de edad de los pacientes al diagnóstico fue de 72 años (rango: 44-85 años). De acuerdo a los criterios de clasificación de la OMS del 2017, la cohorte abarcó 38 casos con SMD, de diferentes subtipos, además de 5 casos con LMMC, 3 con LMAs y 2 con CCUS. Los pacientes con SMD-DML constituyeron el subgrupo más grande (n=20), representando el 42% del total de pacientes. Los subgrupos SMD-EB-1 y SMD-EB-2 constituyeron el 15% (n=7) y el 17% (n=8), respectivamente. Se incluyó un solo paciente de los siguientes subtipos: SMD con del(5q) aislada, SMD-SA y SMD-DU. Los pacientes fueron estratificados a nivel de pronóstico de acuerdo al IPSS-R (163,13), siempre y cuando se dispusiera de los datos clínicos necesarios para calcular el *score*. Se calculó el IPSS-R para un total de 44/48 pacientes, incluyendo los pacientes con SMD (n=36/38), así como aquellos casos con LMMC (n=5) y LMAs (n=3), ya que se ha demostrado que el IPSS-R posee valor pronóstico en estos dos subgrupos (Tabla 24 y 25). Se excluyeron los casos de CCUS (n=2), ya que el IPSS-R no es aplicable a este subgrupo.

Tabla 24. Principales características de los pacientes incluidos en el estudio (n=48)

Características	Mediana (rango)	N	% del total de 48 pacientes
Pacientes		48	
Centro			
Barcelona		21 / 48	44%
Göttingen		27 / 48	56%
Edad (años)			
	72 (44 - 85)		
<70		20 / 46	42%
≥70		26 / 46	54%
Género			
Hombre		30 / 48	63%
Mujer		18 / 48	37%
Parámetros hematológicos			
Hemoglobina (g/dL)	9.87 (6.80 - 13.90)		
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	3.30 (1.05 - 60.19)		
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	113 (4 - 661)		
RAN (x10 ⁹ /L)	1.22 (0.01 - 34.14)		
Subtipo de la enfermedad			
CCUS		2 / 48	4%
Clasificación de la OMS (2017)			
SMD con del(5q) aislada		1 / 48	2%
SMD-SA		1 / 48	2%
SMD-DU		1 / 48	2%
SMD-DML		20 / 48	42%
SMD-EB-1		7 / 48	15%
SMD-EB-2		8 / 48	17%
LMA		3 / 48	6%
LMMC		5 / 48	10%
IPSS-R			
Muy bajo		8 / 48	17%
Bajo		13 / 48	27%
Intermedio		8 / 48	17%
Alto		7 / 48	15%
Muy alto		8 / 48	17%
Indeterminado		4 / 48	8%
Blastos en MO			
	4% (0 - 36%)		
<5%		28 / 48	58%
≥5%		20 / 48	42%
Citogenética (CC/FISH)			
Cariotipo normal		31 / 48	65%
1 alteración		13 / 48	27%
2 alteraciones		1/48	2%
≥ 3 alteraciones		3/48	6%
SNP-A			
SNP-A normal		18 / 25	38%
SNP-A alterado		7 / 25	15%
Secuenciación masiva dirigida			
Normal		7 / 48	15%
Alterada		41 / 48	85%

Abreviaturas: MO: médula ósea. CC: citogenética convencional. CCUS: *clonal cytopenia of undetermined significance* (citopenia clonal de significado incierto). LMMC: leucemia mielomonocítica crónica. IPSS-R: *Revised International Prognostic Scoring System*. RAN: recuento absoluto de neutrófilos. SMD-EB: SMD con exceso de blastos. SMD-DML: SMD con displasia multilineal. SMD-SA: SMD con sideroblastos en anillo. SMD-DU: SMD con displasia unilínea. LMA: leucemia mieloide aguda secundaria. SNP-A: *single nucleotide polymorphism array*. OMS: Organización Mundial de la Salud.

Tabla 25. Resultados de la CC, SNP-A, TDS y datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.

Paciente	Subtipo de acuerdo a la OMS 2017	Edad al diagnóstico	Género	Hb [g/dL]	Recuento de leucocitos [x10 ⁹ /L]	Plaquetas [x10 ⁹ /L]	RAN [x10 ⁹ /L]	Blastos en MO [%]	Citogenética (ISCN 2016)	SNP-A (ISCN 2016)	Grupo de riesgo citogenético (163)	Score IPSS-R (13)	Grupo de riesgo (basado en el IPSS-R) (13)	Número de mutaciones
01-GOE	CCUS	76	Mujer	13.3	4.69	124	3.56	0	46,XX[25]	NR	Bueno	-	-	1
02-GOE	DML	69	Hombre	13.4	3.83	65	2.30	0	46,XY[20]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	1.5	Muy bajo	0
03-GOE	EB-2	69	Hombre	8.8	1.05	15	0.34	9	47,XY,+8[24]/46,XY[1]	NR	Intermedio	6.5	Muy alto	3
04-GOE	EB-2	73	Hombre	9.8	1.83	35	0.64	16	46,XY[40]	arr[hg19] 1q21.1q21.2(144,336,554-147,382,626)x2~3, q21.2q44(149,939,136-249,104,496)x2~3, 2p23.3(24,649,800-26,484,894)x1, 8p23.3q24.3(158,048-146,295,771)x2~3	Bueno	6.5	Muy alto	0
05-GOE	EB-1	57	Mujer	9.9	1.07	310	0.04	9	46,XX[20]	arr(1-22,X)x2	Bueno	4.5	Intermedio	2
06-GOE	DML	83	Mujer	11.5	5.24	94	3.56	2	46,XX[20]	NR	Bueno	1.5	Muy bajo	3
07-GOE	DML	74	Hombre	9.1	2.86	182	1.09	2	45,X,-Y[20]	NR	Muy bueno	1	Muy bajo	2
08-GOE	EB-2	69	Mujer	7.2	1.81	113	0.91	3	46,XX,del(5)(q13q33)[3]/45~46,idem,7,+18,der(12;18)(q10;p10),r(18)(p11?q22?),+del(18)(q12q21)[cp19]/46,idem,t(7;8)(q21;q24.2)[2]/46,XX[1]	NR	Muy malo	5.5	Alto	2
09-GOE	DML	82	Hombre	10.5	3.13	67	1.22	3	46,XY[25]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	2.5	Bajo	3
10-GOE	EB-1	75	Hombre	7.7	15.52	98	12.88	10	46,XY[25]	arr[hg19] 7q22.1q36.3(101,355,401-159,119,220)x2 hmz	Bueno	5	Alto	2
11-GOE	DU	84	Hombre	8.2	1.91	266	0.80	2	46,XY[25]	arr(1-22,X)x2	Bueno	2	Bajo	3
12-GOE	DML	75	Hombre	7.8	1.38	4	0.07	6	46,XY[26]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	6	Muy alto	2
13-GOE	DML	44	Mujer	6.8	3.4	393	2.24	7	46,XX[20]	arr[hg19] 7q22.3q36.3(105,340,046-159,119,220)x2 hmz	Bueno	4.5	Intermedio	4
14-GOE	EB-2	73	Hombre	9.7	3.12	104	1.00	15	46,XY[20]	arr(1-22,X)x2	Bueno	5	Alto	3
15-GOE	DML	78	Mujer	11.2	3.34	63	1.90	5	45,XX,-7[2]/46,XX[5] ¹	NR	Malo	5.5	Alto	2
16-GOE	DML	61	Mujer	9.6	4.75	21	2.85	4	46,XX[25]	arr(1-22,X)x2	Bueno	4	Intermedio	0
17-GOE	LMMC	85	Hombre	9.3	12.7	16	3.94	0	46,XY[25]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	3	Bajo	6
18-GOE	SA	69	Hombre	8.9	3.93	68	2.99	0	46,XY,der(7)t(1;7)(q25;q32?) [2]/46,XY,+1,der(1;14)(q10;q10)[2]/46,XY[26]	NR	Intermedio	3.5	Intermedio	4
19-GOE	EB-1	55	Mujer	10.1	4.29	219	2.40	5	46,XX[11]	NR	Bueno	3	Bajo	0
20-GOE	DML	72	Hombre	8.8	3.25	132	1.46	1	46,XY[19]	NR	Bueno	2	Bajo	2
21-GOE	CCUS	73	Hombre	10.7	9.35	220	7.48	4	46,XY[20]	NR	Bueno	-	-	1
22-GOE	EB-1	69	Hombre	13	8.13	40	5.04	9	47,XY,+8[5]/46,XY[20]	NR	Intermedio	5	Alto	6
23-GOE	DML	68	Mujer	9.9	1.63	46	0.62	2	45,XX,-7[1]/46,XX[14] ¹	NR	Malo	4.5	Intermedio	0
24-GOE	EB-1	61	Mujer	11.6	1.09	165	0.17	6	46,XX[22]	arr(1-22,X)x2	Bueno	3.5	Intermedio	1
25-GOE	sLMA	80	Hombre	10.3	2.43	103	0.12	30	47,XY,+12[2]/46,XY[23]	NR	Intermedio	5.5	Alto	1
26-GOE	DML	77	Hombre	13.1	2.53	93	0.96	3	45,X,-Y[25]	NR	Muy bueno	1.5	Muy bajo	2
27-GOE	DML	77	Hombre	8.8	5.71	226	1.60	3	46,XY[25]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	3	Bajo	3
28-BAR	DML	67	Hombre	11.7	8.1	47	4.67	4	46,XY[20]	arr[hg19] 1q22.12(36,031,042-37,417,463)x1	Bueno	3	Bajo	3
29-BAR	DML	71	Hombre	13.4	8.65	97.5	0.45	3	46,XY[20]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	3	Bajo	3
30-BAR	del(5q)	65	Mujer	8.5	2.1	306	0.87	0	46,XX,del(5)(q12q33)[12]/46,XX[3]	NR	Bueno	2	Bajo	1
31-BAR	DML	74	Hombre	11.6	9.13	282	5.72	0	46,XY[20]	arr[hg19] 7q11.23(72,404,175-72,718,124)x1-2	Bueno	1	Muy bajo	2
32-BAR	sLMA	60	Hombre	7.8	2.5	92	0.43	27	46,XY[30]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	6.5	Muy alto	2

33-BAR	sLMA	80	Mujer	8.1	1.6	10	0.52	36	45,XX,- 3,del(5)(q12q33),add(6)(p25)x2[4],der (12)t(3;12)(q13;p11.2)[cp5]/46,XX[2]	NR	Muy malo	9.5	Muy alto	1
34-BAR	EB-2	57	Hombre	6.8	3.7	225	1.85	13	46,XY,t(3;3)(q21;q26)[4]/46,XY[16]	NR	Intermedio	6.5	Muy alto	1
35-BAR	EB-2	68	Mujer	8.1	2.7	156	0.33	17	47--50,XX,- 3[16],del(3)(p13p15)[3],del(5)(q22q35 ,+10[5],del(10)(p11.2)[6],-11[5],add(1 3)(p10)[5],add(15)(p10),add(17)(p13)[14],+mar1,+mar2[cp20]	NR	Muy malo	8.5	Muy alto	1
36-BAR	DML		Hombre	-	-	-	-	4	46,XY[20]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	ND	ND	2
37-BAR	DML	76	Hombre	10.5	5.8	86	2.13	3	47,XY,+21[5]/46,XY[15]	NR	Intermedio	3.5	Intermedio	4
38-BAR	DML	56	Hombre	9.1	9.4	225	-	1	46,XY[7]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	3	Bajo	0
39-BAR	LMMC		Hombre	-	-	-	-	12	47,XY,+8[14]/46,XY[3]	NR	Intermedio	ND	ND	8
40-BAR	LMMC	79	Mujer	11.1	60.19	278	34.14	3	47,XX,+21[13]	NR	Intermedio	3	Bajo	1
41-BAR	DML	45	Hombre	9.77	2.71	216	1.24	1	46,XY[20]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	2	Bajo	0
42-BAR	EB-2	53	Mujer	10	2.7	120	0.89	18	3 metafases con inv(3)(q21q26), confirmado por FISH	NR	Malo	6	Muy alto	2
43-BAR	LMMC	70	Hombre	11.8	8.86	661	2.03	3	46,XY[20]	arr[hg19] 12q21.31q21.33(86,475,688-89,433,309)x2 hnz	Bueno	2	Bajo	5
44-BAR	EB-2	76	Mujer	9.2	1.7	53	0.01	10	46,XX[7]	arr[hg19] 5p13.2p13.1(35,659,055-38,973,499)x2-3	Bueno	5	Alto	1
45-BAR	DML	70	Mujer	10.2	2.95	230	0.79	1	46,XX[20]	NR	Bueno	1.5	Muy bajo	1
46-BAR	EB-1	67	Mujer	10.7	3.4	198	1.49	8	46,XX[20]	arr(1-22,X)x2	Bueno	3	Bajo	1
47-BAR	DML	74	Hombre	9.83	2.48	183.2	0.03	3	46,XY[20]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	3.5	Intermedio	4
48-BAR	LMMC	72	Hombre	13.9	14.9	113	1.17	2	46,XY[20]	arr(1-22)x2,(XY)x1	Bueno	1	Muy bajo	4

¹La monosomía de los casos 15-GOE y 23-GOE fueron comprobadas adicionalmente mediante FISH: 5% y 45% respectivamente. ND: no disponible. NR: no realizado. Abreviaturas: CC: citogenética convencional. CCUS: citopenia clonal de significado incierto. del(5q): SMD asociado a la delección 5q aislada. DML: SMD con displasia multilínea. DU: SMD con displasia unilínea. EB-1: SMD con exceso de blastos tipo 1. EB-2: SMD con exceso de blastos tipo 2. Hb: hemoglobina. IPSS-R: *Revised International Prognostic Scoring System*. ISCN: *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. LMAs: leucemia mielóide aguda secundaria. LMMC: leucemia mielomonocítica crónica. MO: médula ósea. OMS: Organización mundial de la salud. RAN: recuento absoluto de neutrófilos. SA: SMD con sideroblastos en anillo. SNP-A: *single nucleotide polymorphism array*.

2. Aplicación combinada de la citogenética convencional, SNP-A y TDS

La citogenética convencional (CC) fue aplicada en la totalidad de los casos incluidos, mientras que la técnica de FISH fue empleada en un caso puntual donde no se obtuvieron suficientes metafases (caso 42-BAR, Tabla 25). Por su parte, la técnica de SNP-A se aplicó en 25/31 pacientes que presentaban un cariotipo normal, lo cual permitió identificar CNAs (ganancias y pérdidas submicroscópicas) y regiones con CNN-LOH en 7/25 pacientes (Tabla 24). La combinación de la CC, FISH y SNP-A permitió detectar alteraciones cromosómicas en el 50% de los casos.

Mediante la TDS de la MO se detectaron mutaciones somáticas en el 85% de los casos (41/48 pacientes) (Tabla 24). De esta manera, se pudo confirmar la clonalidad en un mayor número de casos en comparación a si se hubiera empleado únicamente la CC. Sin embargo, en el caso 23-GOE (45,XX,-7[1]/46,XX[14]; Tabla 25) la CC permitió detectar la monosomía 7 (solo en una metafase), la cual pudo ser confirmada mediante FISH (45% de células con la monosomía), mientras que la TDS no detectó ninguna mutación. Además, el caso 04-GOE no presentaba ninguna mutación en los genes analizados, pero sí múltiples alteraciones por SNP-A (Tabla 25). En general, la aplicación combinada de la CC, FISH, SNP-A y la TDS permitió la detección de alteraciones genéticas en 43/48 (90%) pacientes analizados (Figura 37).

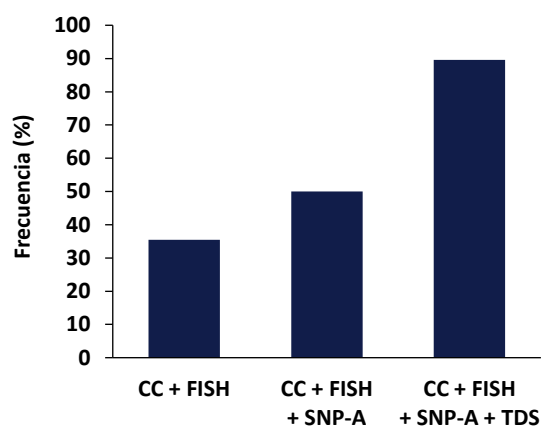


Figura 37. Frecuencia de casos en los que se ha detectado al menos una alteración empleando la combinación de técnicas mencionadas en cada caso. Abreviaturas: CC: citogenética convencional. FISH: *fluorescence in situ hybridization*. SNP-A: *single nucleotide polymorphism arrays*. TDS: *targeted deep sequencing*.

3. Aplicación de la TDS

3.1. Perfil mutacional de los pacientes

Se utilizó la muestra de MO como referencia para caracterizar el perfil mutacional de los pacientes ya que esta es la muestra que se emplea en la práctica clínica. La comparación de los resultados de la TDS de la MO con su respectiva muestra control pareada (SP-CD3+, utilizada para descartar aquellas variantes que no fueran somáticas) permitió la detección de mutaciones en 23 de los 51 genes comunes analizados. El gen más frecuentemente mutado fue *TET2*, presente en el 27% (13/48) de los pacientes (Figura 38). Otros genes frecuentemente mutados fueron: *SF3B1* (n=10, 21%), *SRSF2* (n=10, 21%), *ASXL1* (n=7, 15%), *EZH2* (n=6, 13%), *ZRSR2* (n=6, 13%), *RUNX1* (n=5, 10%), *U2AF1* (n=5, 10%) y *TP53* (n=4, 8%). Dentro de los genes mutados en menor frecuencia ($\leq 6\%$) se encontraban: *DNMT3A* (n=3), *IDH1* (n=3), *NRAS* (n=3), *STAG2* (n=3), *BCOR* (n=2), *KRAS* (n=2), *PTPN11* (n=2), *SETBP1* (n=2), *CSNK1A1* (n=1), *ETV6* (n=1), *IDH2* (n=1), *IKZF1* (n=1), *RAD21* (n=1) y *SH2B3* (n=1). Las mutaciones en los genes *CSNK1A1* y *SH2B3* solo se

detectaron mediante el panel de captura (Barcelona), puesto que los mismos no estaban incluidos en el panel de amplicones (Göttingen).

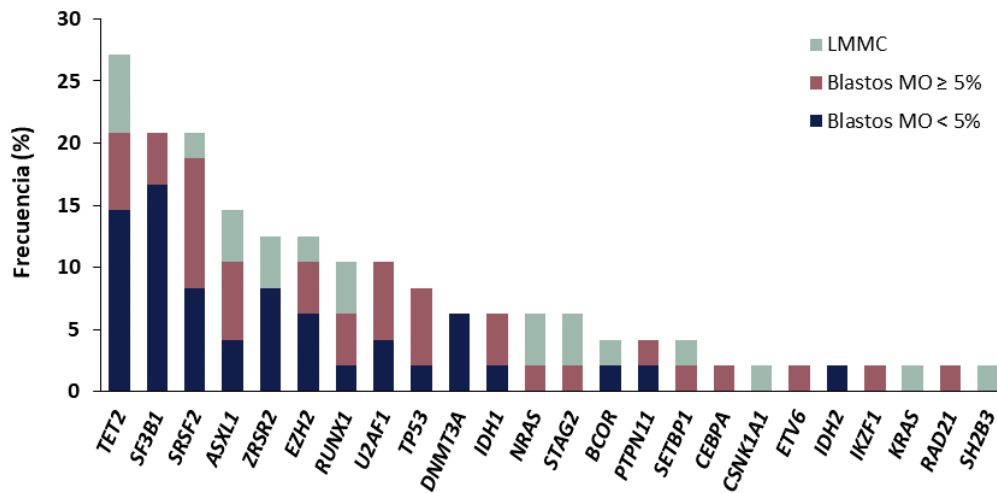


Figura 38. Frecuencia de mutaciones por gen en los 48 pacientes estudiados. En la figura se indica la frecuencia de mutaciones encontradas en aquellos pacientes con <5% de blastos en MO (SMD y CCUS, azul), ≥5% de blastos en MO (SMD y LMAs, rosa) y LMMC (verde). Abreviaturas: CCUS: *clonal cytopenia of undetermined significance* (citopenia clonal de significado incierto). LMMC: leucemia mielomonocítica crónica. SMD: síndromes mielodisplásicos. LMAs: leucemia mioide aguda secundaria. MO: médula ósea.

Las mutaciones en los genes *TP53* y *SRSF2* se encontraron predominantemente en los casos de SMD de alto riesgo (SMD-EB-1 y SMD-EB-2) y pacientes con LMAs (Figura 38). Por otro lado, las mutaciones en *DNMT3A* se encontraron exclusivamente en pacientes con un recuento de blastos inferior al 5%. Este subgrupo incluía pacientes de riesgo bajo o intermedio, que fueron clasificados como CCUS, SMD con del(5q) aislada, SMD-SA, SMD-DU o SMD-DML. Además de las mutaciones en *DNMT3A*, también se observó una prevalencia de las mutaciones en *SF3B1* en este subgrupo de pacientes.

3.2. Cantidad relativa de alteraciones de acuerdo al subtipo de la OMS y al recuento de blastos en MO

El promedio de alteraciones detectadas mediante CC, SNP-A y TDS, se correlacionó con el subgrupo de riesgo de acuerdo al IPSS-R (Figura 39A). Cabe destacar que se observó un número superior de alteraciones detectadas mediante CC y SNP-A en los pacientes clasificados de alto y muy alto riesgo de acuerdo al IPSS-R, mientras que el número de mutaciones somáticas no difirió notablemente en los distintos grupos de riesgo.

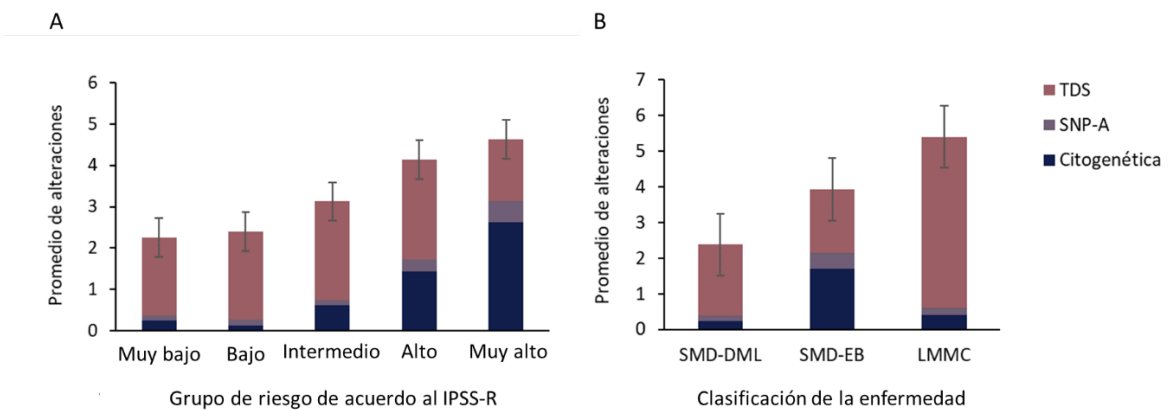


Figura 39. El promedio de alteraciones se correlaciona con la categoría de riesgo del IPSS-R y con la clasificación de la enfermedad. La figura indica el número de alteraciones detectadas mediante citogenética convencional y *fluorescence in situ hybridization* (FISH, en azul), *single nucleotide polymorphism arrays* (SNP-A, en lila) y por secuenciación masiva dirigida (TDS, en rosa). Abreviaturas: IPSS-R: *revised international prognostic scoring system*. SMD-DML: síndrome mielodisplásico con displasia multilínea. SMD-EB: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos. LMMC: leucemia mielomonocítica crónica.

De manera similar a lo observado en los grupos de riesgo del IPSS-R, se observó una correlación entre el número de alteraciones genéticas y los subtipos de SMD de acuerdo con la clasificación de la OMS (Figura 39B) (3). Se observó un incremento de la cantidad de alteraciones cromosómicas (detectadas por CC y SNP-A) en los pacientes con subtipos morfológicos de mayor riesgo (SMD-EB) comparado con los pacientes con SMD-DML o LMMC.

A parte de los pacientes con SMD, también fueron incluidos 5 pacientes con LMMC. De manera notable, el promedio de mutaciones encontradas en este subgrupo de pacientes fue de 4.8, cifra superior a cualquier otro subgrupo analizado (SMD-DML: 2.0, SMD-EB: 1.8. Figura 39B). En contraste con la alta frecuencia de mutaciones somáticas detectadas en este subgrupo de pacientes, se detectaron pocas alteraciones citogenéticas. Además, el análisis mutacional reveló un alto número de alteraciones en los genes implicados en la vía de señalización de *RAS* (*NRAS/KRAS*) y *STAG2* (Figura 38).

3.3. Detección cualitativa de mutaciones en función de la muestra utilizada

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la aplicabilidad de las muestras de SP como muestra tumoral para el estudio de los SMD mediante TDS y comparar los resultados con aquellos obtenidos a partir de MO. Como muestra alternativa a la MO, se evaluó SP-CD34+ y SP-MC. Los linfocitos T-CD3+ (SP-CD3+) fueron usados como muestra germinal (control pareado).

De manera global, se identificaron 105 mutaciones somáticas en 41 de los 48 pacientes analizados (Figura 40, Tabla 26). Un total de 93 mutaciones (89%), fueron detectadas en las 3 muestras tumorales (MO, SP-CD34+ y SP-MC). Se pudieron identificar 100/105 (95%) mutaciones en la MO, 102/105 (97%) mutaciones en las SP-CD34+ y 95/105 (90%) mutaciones en las SP-MC. Así, 10 mutaciones no fueron detectadas en las SP-MC. Hubieron solo tres casos (37-BAR, 43-BAR y 46-BAR) en los cuales una mutación se encontró de manera exclusiva en la MO y no pudo ser detectada en ninguna muestra de SP. En contrapartida, también hubo dos casos (13-GOE y 25-GOE) en los cuales se detectaron mutaciones en ambas muestras de SP pero no así en la MO. Además, se identificaron 7 mutaciones en las SP-CD34+ que estaban ausentes

en las SP-MC, dos de ellas se detectaron de manera exclusiva en las SP-CD34+ y pertenecían al mismo paciente (42-BAR).

Es de destacar que, en la mayoría de los casos mencionados anteriormente, las discrepancias entre las muestras analizadas pudieron deberse a los bajos valores de VAF (<5%) para dichas mutaciones (Tabla 26). El reanálisis de los datos de secuenciación reveló que en la mayoría de los casos, dichas mutaciones habían sido descartadas en el proceso de filtrado debido a que la VAF se encontraba por debajo del punto de corte del 5% que había sido establecido previamente. La inclusión de las variantes a VAFs tan bajas como 1%, permitió la detección de 102/105 (98%) de las mutaciones en las tres muestras analizadas (Figura 40).

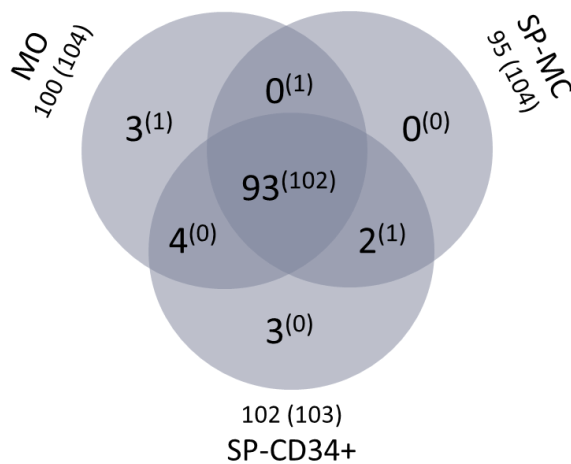


Figura 40. Diagrama de Venn con el número de mutaciones detectadas por TDS en las muestras de MO, SP-MC y SP-CD34+. Los números entre paréntesis se obtuvieron tras incluir aquellas variantes detectadas a VAFs <5% después del reanálisis. MO: médula ósea. SP-MC: células mononucleadas de sangre periférica. SP-CD34+: células CD34+ de sangre periférica. TDS: secuenciación masiva dirigida. VAF: frecuencia alélica de la variante.

Tabla 26: Mutaciones somáticas identificadas mediante secuenciación masiva dirigida

Paciente	Gen	Cr.	Coordenada de inicio (hg19)	Variante	VAF			Coverage		
					MO	SP-CD34+	SP-MC	MO	SP-CD34+	SP-MC
01-GOE	<i>DNMT3A</i>	chr2	25466791	c.1344delG p.L448fs	22	21.7	13.8	15385	12192	13022
	<i>ETV6</i>	chr12	12038873	c.1166T>G p.M389R	27	26	20.5			
03-GOE	<i>U2AF1</i>	chr21	44524456	c.101C>A p.S34Y	35.6	25.3	27.2	13324	13137	13717
	<i>IKZF1</i>	chr7	50450292	c.215A>G p.N72S	29.9	29.2	23.8			
05-GOE	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	c.284C>T p.P95L	5.8	6.4	<5.0	15302	16176	13621
	<i>IDH1</i>	chr2	209113113	c.394C>T p.R132C	25	34.2	12.9			
06-GOE	<i>SF3B1</i>	chr2	198267371	c.1986C>A p.H662Q	38.8	23.8	28.8	10519	13832	12165
	<i>TET2</i>	chr4	106156615	c.1516A>T p.R506X	41.3	28.6	30.4			
	<i>EZH2</i>	chr7	148524348	c.515_518del p.E172fs	39.1	29.2	28.2			
07-GOE	<i>TET2</i>	chr4	106193801	c.4264delA p.K1422fs	27.5	31.3	13.4	12991	9998	9593
	<i>ZRSR2</i>	chrX	15840980	c.1064_1065insCTCCT p.S355fs	34.6	50	15.3			
08-GOE	<i>TP53</i>	chr17	7577100	c.442A>G p.R148G	16	5.2	23.9	14227	6577	8362
	<i>TP53</i>	chr17	7577536	c.349A>G p.R117G	55	86.3	19.4			
09-GOE	<i>SRSF2</i>	chr17	74732960	c.283C>G p.P95A	30.1	35.5	23.1	11174	8590	8625
	<i>TET2</i>	chr4	106164065	c.3575G>T p.G1192V	29.9	39.1	25.2			
	<i>TET2</i>	chr4	106180891	c.3920delG p.R1307fs	30.1	41.5	27.1			
10-GOE	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	c.284C>A p.P95H	32.7	47.4	52	8513	6860	10449
	<i>RUNX1</i>	chr21	36259209	c.201C>A p.S67R	42.4	48.4	48.6			
11-GOE	<i>SF3B1</i>	chr2	198267371	c.1986C>G p.H662Q	40.9	39	26.3	20985	14201	16532
	<i>TET2</i>	chr4	106190830	c.4108G>A p.G1370R	34.7	28.1	16.8			
	<i>TET2</i>	chr4	106196219	c.4553delC p.S1518X	43.1	37.6	25.1			
12-GOE	<i>U2AF1</i>	chr21	44514777	c.470A>C p.Q157P	40.8	37.8	23.6	11034	7254	12480
	<i>TET2</i>	chr4	106156485	c.1387delC p.P463fs	40.6	38.6	22.7			
13-GOE	<i>SETBP1</i>	chr18	42531913	c.2608G>A p.G870S	21.8	54.5	23.9	9028	13857	10046
	<i>CEBPA</i>	chr19	33793314	c.112T>C p.S38P	N.D. ¹	11.9	7.3			
	<i>ASXL1</i>	chr20	31022441	c.1927dupG p.G643fs	16.7	38.1	21.6			
	<i>EZH2</i>	chr7	148526941	splicing	32.3	94.5	51.1			
14-GOE	<i>PTPN11</i>	chr12	112926888	c.1508G>A p.G503E	8.7	43.4	6.5	15292	13597	14795
	<i>ASXL1</i>	chr20	31023435	c.2921dupA p.Y974_C975delinsX	8.9	42.1	7.5			
15-GOE	<i>EZH2</i>	chr7	148504799	splicing	11.5	67.6	10.9	12311	10103	10936
	<i>ASXL1</i>	chr20	31023312	c.2798delC p.A933fs	5.3	7.6	5.4			
	<i>U2AF1</i>	chr21	44514777	c.470A>C p.Q157P	<5.0	5.3	<5.0			
17-GOE	<i>NRAS</i>	chr1	115258744	c.38G>A p.G13D	35.7	43.3	32.4	13969	14087	16055
	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	c.284C>A p.P95H	40.3	45.7	45.5			
	<i>ASXL1</i>	chr20	31022839	c.2324T>A p.L775X	36.4	45.6	39			
	<i>RUNX1</i>	chr21	36231783	c.520C>T p.R174X	36.8	46.5	45			
	<i>BCOR</i>	chrX	39933140	c.1458_1459insAGGG p.L487fs	63.3	94	77.4			
	<i>STAG2</i>	chrX	123184066	c.924C>A p.C308X	70.2	92.1	79.6			
18-GOE	<i>PTPN11</i>	chr12	112888163	c.179G>T p.G60V	18.5	12.9	<5.0	13277	12591	9988
	<i>DNMT3A</i>	chr2	25467132	c.1176G>C p.W392C	40.6	45.7	27.6			
	<i>SF3B1</i>	chr2	198267371	c.1986C>G p.H662Q	46.3	34.7	26.8			
	<i>U2AF1</i>	chr21	44514777	c.470A>G p.Q157R	43.8	75.7	28.6			
20-GOE	<i>DNMT3A</i>	chr2	25467132	c.1176G>C p.W392C	10.9	8.1	14.2	21348	17496	14778
	<i>SF3B1</i>	chr2	198266834	c.2098A>G p.K700E	11.2	6.2	15.3			
21-GOE	<i>SF3B1</i>	chr2	198267371	c.1986C>G p.H662Q	24.5	34.7	31.2	10410	14474	10851
	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	c.284C>T p.P95L	32.3	25.5	10.9			
	<i>RUNX1</i>	chr21	36206720	c.710dupA p.Q237fs	23.9	16.9	10.1			
	<i>TET2</i>	chr4	106158248	c.3149C>G p.S1050X	33.1	21.4	10.7			
	<i>TET2</i>	chr4	106163989	splicing	8.7	7	5			
	<i>TET2</i>	chr4	106197139	c.5473_5476del p.Q1825fs	43	27.7	38			
22-GOE	<i>RAD21</i>	chr8	117869645	c.548dupT p.L183fs	39.2	29.2	18.2	4900	9253	9461
	<i>IDH1</i>	chr2	209113113	c.394C>T p.R132C	31.1	20.4	10.2			
24-GOE	<i>IDH1</i>	chr2	209113113	c.394C>T p.R132C	31.1	20.4	10.2	14880	17154	17932
25-GOE	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	c.284C>G p.P95R	<5.0 ²	20.1	20.4	14652	5296	10531
26-GOE	<i>TET2</i>	chr4	106180781	c.3810delT p.T1270fs	23.8	40.2	20.9	19675	9990	16165
	<i>TET2</i>	chr4	106190842	c.4120T>C p.C1374R	37.5	36.7	20.9			
27-GOE	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	c.284C>G p.P95R	50.6	33.2	39.3	7234	6735	16210
	<i>TET2</i>	chr4	106157593	c.2495delT p.V832fs	37.1	37.1	33.2			

	<i>TET2</i>	chr4	106194075	c.4537G>C p.E1513Q	38.9	34.4	30.9			
28-BAR	<i>EZH2</i>	chr7	148514319	T>T/A	40.11	21.41	11.15			
	<i>U2AF1</i>	chr21	44524456	G>G/A	42.92	22.25	10.03	1088	971	1378
	<i>BCOR</i>	chrX	39932171	G>G/A	85.37	38.58	20.73			
29-BAR	<i>SF3B1</i>	chr2	198266834	T>T/C	46.59	46.93	36.24			
	<i>TET2</i>	chr4	106190858	C>C/A	48.99	41.28	40.06	959	924	1110
	<i>TET2</i>	chr4	106197285	T>T/C	49.46	43.23	38.16			
30-BAR	<i>SF3B1</i>	chr2	198266834	T>C	18.05	9.81	<5.0	1129	1117	1088
31-BAR	<i>ZRSR2</i>	chrX	15841122	C>C/-	82.55	68.56	56.36			
	<i>ZRSR2</i>	chrX	15841124	G>G/A	84.05	72.85	59.34	1087	874	854
32-BAR	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	G>G/T	27	31	8	948	1177	910
	<i>STAG2</i>	chrX	123210253	T>T/C	15.32	29.89	5			
33-BAR	<i>TP53</i>	chr17	7578272	G>G/C	36.65	50.2	25.09	900	927	873
34-BAR	<i>SF3B1</i>	chr2	198266834	T>T/C	41.98	43.4	36.78	921	394	367
35-BAR	<i>TP53</i>	chr17	7577121	G>G/A	62.93	13.04	<5.0	1492	1023	1290
36-BAR	<i>IDH1</i>	chr2	209113113	G>G/T	34.69	20	24	1276	1176	1143
	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	G>G/T	28.4	19	26			
37-BAR	<i>ZRSR2</i>	chrX	15836766	G>G/A	86.13	36.09	33.57			
	<i>ASXL1</i>	chr20	31022441	A>A/AG	34.02	14.92	15.8	1053	1049	1050
	<i>RUNX1</i>	chr21	36252875	A>A/G	8.18	10.87	8.28			
	<i>EZH2</i>	chr7	148506443	C>C/T	7.47	N.D.	<5.0			
39-BAR	<i>TET2</i>	chr4	106180891	A>A/G	44.81	49.35	46.82			
	<i>TET2</i>	chr4	106197207	G>G/-	44.36	48.28	44.12			
	<i>CSNK1A1</i>	chr5	148892670	A>A/G	6.93	6.41	7.95			
	<i>EZH2</i>	chr7	148544327	- > - /T	91.32	96.32	89.79	953	891	958
	<i>KRAS</i>	chr12	25398281	C>C/T	12.95	11.31	17.27			
	<i>KRAS</i>	chr12	25398284	C>C/A	35.06	33.13	29.54			
	<i>ZRSR2</i>	chrX	15841123	AG>AG/-	92.25	96.18	90.19			
	<i>STAG2</i>	chrX	123195628	AGAT>AGAT/-	90.17	96.89	86.08			
40-BAR	<i>RUNX1</i>	chr21	36231873	T>T/G	64.46	67.14	66.03	1004	1017	1066
42-BAR	<i>NRAS</i>	chr1	115258745	C>C/G	<5.0	29.3	<5.0	1107	1483	1854
	<i>SF3B1</i>	chr2	198266834	T>T/C	<5.0	34.63	<5.0			
43-BAR	<i>TET2</i>	chr4	106197285	T>C	50.39	49.32	45.04			
	<i>SH2B3</i>	chr12	111884838	G>A	85.05	90.61	74.81			
	<i>SH2B3</i>	chr12	111885168	C>A	5.42	<5.0	<5.0	928	834	922
	<i>SETBP1</i>	chr18	42529990	G>A	46.82	51.62	47.37			
	<i>ZRSR2</i>	chrX	15836766	G>A	93.27	92.94	80.07			
44-BAR	<i>TP53</i>	chr17	7578400	G>C	13.08	29.85	5.13	888	973	995
45-BAR	<i>SF3B1</i>	chr2	198267371	G>G/C	35.39	25.64	20.35	1660	1472	1350
46-BAR	<i>TET2</i>	chr4	106155467	- >T	5.35	N.D.	N.D.	1264	894	920
47-BAR	<i>IDH2</i>	chr15	90631934	C>C/T	44	32	19			
	<i>SRSF2</i>	chr17	74732959	G>G/T	47	33	23	921	887	910
	<i>ASXL1</i>	chr20	31022541	G>G/T	19	12	7			
	<i>ZRSR2</i>	chrX	15841224	C>C/-	92	64	45			
48-BAR	<i>NRAS</i>	chr1	115256521	A>A/C	37	30	29			
	<i>TET2</i>	chr4	106164071	C>C/T	46	43	34			
	<i>TET2</i>	chr4	106190867	A>A/G	43	42	36			
				CACCACTGCCATAGAG AGGCGGC> CACCACTGCCATAGAG AGGCGGC/-				895	995	1026
		<i>ASXL1</i>	chr20	31022403		26	28	22		

N.D. No detectada.

<5.0 Detectada, pero filtrada porque la VAF no superaba el punto de corte del 5%

¹ Detectada a una VAF del 8.8% en una muestra previa

² El análisis morfológico reveló una médula ósea hipocelular, lo cual podría explicar el bajo valor de VAF obtenido mediante TDS.

Cr: cromosoma. MO: médula ósea. SP-MC: células mononucleadas de sangre periférica. SP-CD34+: células CD34+ de sangre periférica. TDS: secuenciación masiva dirigida. VAF: frecuencia alélica de la variante.

3.4. Detección cuantitativa de mutaciones

La mayoría de las 105 mutaciones somáticas que fueron detectadas presentaban valores de VAF comprendidos entre 15% y 45% en las tres muestras tumorales estudiadas: 61 en MO, 57 en SP-CD34+ y 56 en SP-MC. De manera notable, la distribución de los valores de VAF obtenidos a partir de muestras de MO (mediana: 36.4%, 5.0 - 93.3) y SP-CD34+ (mediana: 34.7%, 5.2 - 96.9) no diferían significativamente ($p=0.954$). En contraste, la TDS de la SP-MC reveló valores de VAF significativamente más bajos (mediana: 25.1%, 5.0 - 90.2) que los obtenidos en el caso de la MO ($p=0.002$) y de las SP-CD34+ ($p=0.001$; Figura 41A).

Con el objetivo de comparar los valores de VAF obtenidos de las muestras de MO, SP-CD34+ y SP-MC de cada mutación individual, se llevó a cabo un análisis de correlación lineal (Figura 41B, y C). Este análisis reveló nuevamente una alta concordancia entre los valores de VAF obtenidos a partir de la TDS de la MO y de las SP-CD34+, puesto que la mayoría de los valores (representados por puntos) se agruparon cerca de la línea de bisección, indicando que los valores de VAF serían convergentes. La concordancia entre la línea de bisección y la línea de regresión (coeficiente de correlación $R=0.46$, $p=3.10 \times 10^{-6}$) de los valores de VAF enfatiza esta observación (Figura 41B).

En contraste, los valores de VAF determinados para las muestras de SP-MC son significativamente más bajos para la mayoría de las mutaciones en comparación a sus respectivos valores en MO. Esta tendencia también se refleja en la incrementada desviación de la línea de regresión ($R=0.57$, $P=2.33 \times 10^{-09}$) con respecto a la línea de bisección (Figura 41C).

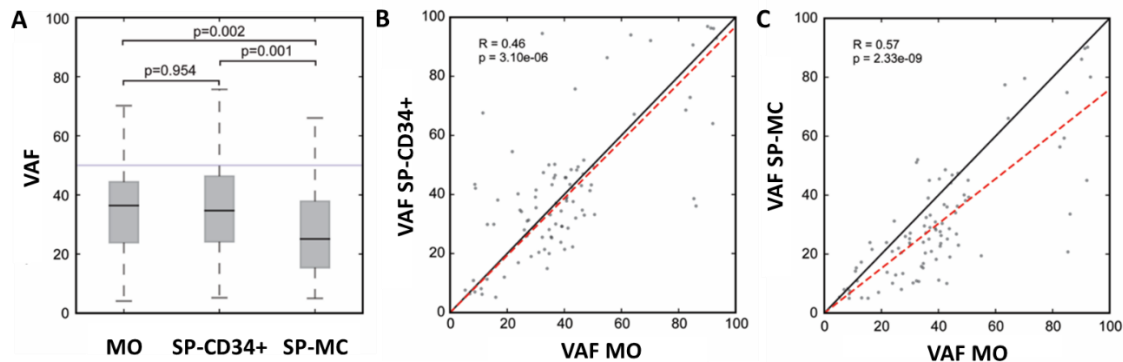


Figura 41. Comparación de la carga mutacional detectada por TDS en las muestras de MO, SP-CD34+ y SP-MC. A) Distribución de los valores de VAF para las 3 muestras analizadas. Los valores de VAF del segundo y tercer cuartil se encuentran entre el 15% y 45% en los tres tipos de muestras analizadas. La mediana de los valores de VAF (línea horizontal negra) en la MO, la SP-CD34+ y la SP-MC es de 36.4%, 34.7% y 25.1%, respectivamente. B y C) Correlación de los valores de VAF para las mutaciones identificadas en las muestras de SP-CD34+ y SP-MC con respecto a la MO, respectivamente. Los puntos denotan los valores de VAF para cada una de las mutaciones, las líneas de bisección y regresión están representadas en negro y rojo, respectivamente. R: coeficiente de correlación de Spearman.

Cabe destacar que los valores de VAF representados en la figura 41 van del 0 al 100%, ya que representan los datos de VAF absoluta obtenidos de la TDS, y por tanto no están ajustados por el número de copias ni la cigosidad. Así por ejemplo, las mutaciones en los genes *BCOR*, *STAG2* y *ZRSR2*, localizados en el cromosoma X, presentan una $VAF > 50\%$ (en torno al 90%) en aquellos pacientes hemicigotos (6 hombres: 17-GOE, 31-BAR, 37-BAR, 39-BAR, 43-BAR y 47-BAR. Tabla 26). Otra variante a destacar, cuyo valor promedio de VAF en las tres muestras analizadas es de 83%, es una mutación en el gen *SH2B3* (43-BAR. Tabla 26). En este caso, la región del 12q,

que es donde se encuentra codificado el gen, coincidentemente también se vio afectada por una CNN-LOH, por lo que el paciente presenta una mutación de *SH2B3* homocigota. La mutación de *EZH2* detectada en el paciente 39-BAR también presenta una VAF elevada (91% en MO). Dado que este paciente no tenía alteraciones en el cromosoma 7 detectadas por cariotipo, esta VAF sugiere que podría haber una CNN-LOH en esta región, pero no se pudo confirmar ya que no pudo realizarse el SNP-A. También destaca la variante detectada en el gen *RUNX1* en el paciente 40-BAR a una VAF del 64% en MO. Teniendo en cuenta que el cariotipo ha revelado una trisomía 21, de origen somático, y que el gen *RUNX1* se encuentra codificado en el cromosoma 21, la VAF sugiere que la mutación podría encontrarse en 2 de las 3 copias de dicho cromosoma.

Trabajo II

1. Características de los pacientes

En este estudio se incluyeron cuatro pacientes con SMD que, de acuerdo a los criterios de la OMS del 2017, fueron diagnosticados de SMD con delección 5q aislada (3). Todos los casos correspondían a mujeres, con una mediana de edad al diagnóstico de 78 años (rango: 69-83 años). Dichas pacientes se estudiaron al DX/PRE y, en el caso de tres de ellas, se incluyó al menos una muestra durante el seguimiento (mínimo: 3 meses, máximo: 33 meses). En la Tabla 27 se recogen las principales características clínicas y parámetros hematológicos de todos los momentos estudiados.

Tres pacientes presentaban la delección 5q como única alteración citogenética al diagnóstico, mientras que la paciente P3 presentaba además una traslocación recíproca entre ambos cromosomas 1. De acuerdo a los criterios de la OMS del 2017, esta alteración acompañante se admite para seguir categorizando a la paciente dentro del subgrupo de SMD con delección 5q aislada (3,6). Además, todas las pacientes presentaron valores bajos de hemoglobina (mediana: 9.9 g/dL; rango: 8.8 - 10.8), reflejo de la anemia, que es otra de las principales características de esta entidad.

Tabla 27. Características clínicas y hematológicas de las pacientes incluidas en el estudio

Paciente	Edad al DX y sexo	Momento de la muestra	Hb (g/dL)	Leucocitos (x10 ⁹ /L)	Plaquetas (x10 ⁹ /L)	RAN (x10 ⁹ /L)	Blastos en MO (%)	Cariotipo (ISCN)	IPSS-R	Tratamiento
P1	79 Mujer	DX	10.8	3.20	221	1.10	1.0	46,XX,del(5)(q13q33)[15]/46,XX[2] arr[hg19] 5q14.3q34(89575437-163450743)x1	1 Muy bajo	SINTRA-REV
P1		S1 (14 meses)	10.2	3.20	252	1.00	0.0	46,XX,del(5)(q13q33)[17]/46,XX[3]	1 Muy bajo	
P1		S2 (33 meses)	9.1	3.60	374	1.10	3.0	46,XX,del(5)(q13q33)[20]	3 Bajo	
P2	69 Mujer	PRE: 4 años desde el DX sin tratamiento	8.8	4.10	233	2.10	0.5	46,XX,del(5)(q22q33)[6]/46,XX[14] arr[hg19] 5q21.2q34(102986652-162755919)x1, Xp22.31(6449753-8135644)x1	2 Bajo	SINTRA-REV
P2		S1 (14 meses)	9.3	4.60	262	1.52	0.5	46,XX[20]	2 Bajo	
P2		S2 (22 meses)	8.4	5.20	353	1.80	1.0	46,XX[20]	2 Bajo	
P3	77 Mujer	PRE: 2 años post DX (previamente: SINTRA-REV, soporte transfusional)	10.5	6.40	166	3.90	1.5	46,XX,t(1;1)(p35;p36),del(5)(q12q33)[20] arr[hg19] 5q14.3q34(86255729-166126310)x1	2 Bajo	Lenalidomida
P4	83 Mujer	DX	9.3	3.95	262	2.44	3.0	46XX,del(5)(q13q32)[9]/46,XX[11] arr[hg19] 5q21.3q34(107937392-165840296)x1	3 Bajo	Lenalidomida
P4		S1 (20 meses)	11.7	3.66	106	1.47	4.0	46XX,del(5)(q13q32)[9]/46,XX[11]	2 Bajo	

SINTRA-REV: estudio en Fase III, multicéntrico, aleatorio, doble ciego, de Revlimid (lenalidomida) versus placebo en pacientes con síndrome mielodisplásico de bajo riesgo (IPSS bajo e intermedio-1) con alteración en 5q- y anemia sin necesidades transfusionales. En el momento de la muestra, S1 y S2 indican el seguimiento 1 y 2, respectivamente.

Abreviaturas: CC: citogenética convencional. DX: diagnóstico. Hb: hemoglobina. IPSS-R: *Revised International Prognosis Scoring System*. MO: médula ósea. PRE: pre-tratamiento. RAN: recuento absoluto de neutrófilos. S1: seguimiento 1. S2: seguimiento 2. SNP-A: *single nucleotide polymorphism array*. Tto: tratamiento.

2. Perfil mutacional de las pacientes

Para estudiar el perfil mutacional de las pacientes, se utilizó el ADN tumoral *bulk* (MO total) del momento del DX/PRE con su respectivo control pareado (linfocitos T-CD3+ de SP) para llevar a cabo la WES y el análisis mediante SNP-A para detectar mutaciones y CNAs, respectivamente. Paralelamente, se secuenció a mayor profundidad (1000x) el ADN tumoral *bulk* del DX/PRE y del último seguimiento disponible mediante TDS de un conjunto de genes relacionados con las neoplasias mieloides. Después de analizar estos resultados, se seleccionaron las alteraciones candidatas para ser estudiadas a nivel de SC.

2.1. Detección de mutaciones mediante WES y TDS

En la Tabla 28 se resumen las principales características de las mutaciones detectadas en cada paciente mediante WES al momento del DX/PRE. En la misma tabla, se señalan aquellas que también se detectaron mediante TDS en la misma muestra y en el último seguimiento disponible.

Mediante WES, se detectó una media de 7 mutaciones por paciente al momento del DX/PRE. Como era de esperarse, los valores de VAF detectados mediante TDS y WES fueron similares en las muestras de DX/PRE. En lo que respecta a las muestras de seguimiento, se detectaron las mismas mutaciones que al DX/PRE, a excepción de la paciente P4, y se observaron pocas variaciones en los valores de VAF. En dicha paciente se detectó una mutación en el gen *TP53* en la TDS de la muestra del seguimiento que no había sido detectada previamente en la muestra del DX, ni por WES ni por TDS, lo que sugiere que fue una mutación adquirida durante el tratamiento con lenalidomida.

En total, en las cuatro pacientes se detectaron 29 mutaciones, donde la alteración más frecuente fueron los SNV no sinónimos, o variantes *missense* (25/29 mutaciones), seguidos de los SNVs que generan una ganancia de un codón *stop*, o mutaciones *nonsense* (3/29 mutaciones), y 1 SNV que genera un cambio en un sitio de *splicing* (Figura 42).

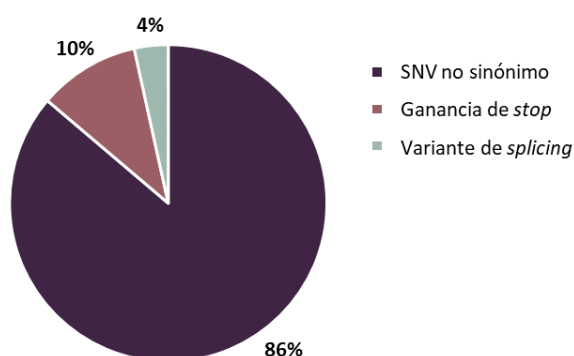


Figura 42. Distribución de las 29 mutaciones detectadas en las cuatro pacientes mediante WES al DX/PRE. Abreviaturas: DX: diagnóstico. PRE: pre-tratamiento. SNV: *single nucleotide variant* (variación de un único nucleótido). WES: *whole exome sequencing* (secuenciación masiva del exoma).

Para los estudios en SC, se seleccionaron todos los SNVs detectados mediante TDS y la mayoría de SNVs detectados mediante WES, priorizando aquellos genes cuya función pudiese ser relevante en la hematopoyesis. Finalmente, y después de descartar aquellos ensayos de SNV cuya especificidad no pudo ser validada, se estudió una mediana de 4 (rango 3-6) SNVs por

paciente. En la Tabla 28 se resaltan en verde aquellos SNVs seleccionados y en la Tabla 29 se incluyen las secuencias de los ensayos diseñados para la detección de los mismos.

Tabla 28. SNVs detectados mediante WES y TDS al DX/PRE y último seguimiento disponible.

Pac.	Gen	Cr.	Transcrito	Tipo de variante	Cambio de secuencia	Cambio de aminoácido	WES DX/PRE	VAF (%)	
								TDS DX/PRE	TDS Seg.
P1	<i>CUX1</i>	7	NM_001202543	Ganancia de stop	c.3019C>T	p.Arg1007*	3		
	<i>SETBP1</i>	18	NM_015559	SNV no sinónimo	c.2612T>C	p.Ile871Thr	15	14	17
	<i>MAP7D2</i>	X	NM_001168465	SNV no sinónimo	c.116A>G	p.Asn39Ser	24		
	<i>TENM1</i>	X	NM_014253	SNV no sinónimo	c.3857G>T	p.Cys1286Phe	27		
	<i>LRTOMT</i>	11	NM_001145310	SNV no sinónimo	c.671G>A	p.Arg224His	34		
	<i>CCDC168</i>	13	NM_001146197	SNV no sinónimo	c.122A>C	p.Gln41Pro	34		
	<i>TP53</i>	17	NM_001126115	SNV no sinónimo	c.448C>T	p.Arg150Trp	39	38	42
	<i>NUP93</i>	16	NM_001242795	SNV no sinónimo	c.473C>A	p.Ala158Asp	40		
	<i>UNC79</i>	14	NM_020818	SNV no sinónimo	c.7055T>A	p.Val2352Glu	44		
P2	<i>LRRC45</i>	17	NM_144999	SNV no sinónimo	c.1670A>G	p.Glu557Gly	7		
	<i>CRIPAK</i>	4	NM_175918	SNV no sinónimo	c.25A>C	p.Asn9His	7		
	<i>CACHD1</i>	1	NM_020925	SNV no sinónimo	c.1161G>T	p.Arg387Ser	9		
	<i>IL21R</i>	16	NM_181078	SNV no sinónimo	c.179A>G	p.Asp60Gly	27		
	<i>SF3B1</i>	2	NM_012433	SNV no sinónimo	c.2098A>G	p.Lys700Glu	40	39	43
	<i>YLPM1</i>	14	NM_019589	Ganancia de stop	c.4087C>T	p.Arg1363*	46		
P3	<i>CGNL1</i>	15	NM_001252335	SNV no sinónimo	c.3481C>A	p.Arg1161Ser	7		
	<i>IBSP</i>	4	NM_004967	SNV no sinónimo	c.231G>T	p.Glu77Asp	8		
	<i>SLC22A12</i>	11	NM_144585	SNV no sinónimo	c.232C>T	p.Pro78Ser	14		
	<i>TRIM24</i>	7	NM_015905	SNV no sinónimo	c.263A>G	p.Tyr88Cys	14		
	<i>SETD2</i>	3	NM_014159	SNV no sinónimo	c.6197A>G	p.Asp2066Gly	21		
	<i>FAT1</i>	4	NM_005245	SNV no sinónimo	c.1507G>A	p.Ala503Thr	23		
	<i>TCHH</i>	1	NM_007113	SNV no sinónimo	c.3770A>G	p.Gln1257Arg	28		
	<i>PPM1D</i>	17	NM_003620	Ganancia de stop	c.1434C>A	p.Cys478*	29		
	<i>SS18L1</i>	20	XM_005260390	SNV no sinónimo	c.604A>G	p.Ser202Gly	29		
P4	<i>TP53</i>	17	NM_001276761	SNV no sinónimo	c.283T>C	p.Phe95Leu			7
	<i>SCUBE1</i>	22	NM_173050	SNV no sinónimo	c.1700C>T	p.Ala567Val	8		
	<i>BMP7</i>	20	NM_001719	SNV no sinónimo	c.908G>A	p.Arg303His	14		
	<i>NUP85</i>	17	NM_024844	SNV no sinónimo	c.877G>C	p.Ala293Pro	17		
	<i>DNMT3B</i>	20	NM_006892	Variante de <i>splicing</i>	c.1906-1G>T	NA	21		

Se resaltan en verde aquellas alteraciones seleccionadas para los estudios en *single cell*.

Abreviaturas: Cr: cromosoma. DX: diagnóstico. Pac: paciente. PRE: pre-tratamiento. Seg: seguimiento. SNV: *single nucleotide variant* (variación de un único nucleótido). TDS: *targeted deep sequencing* (secuenciación masiva dirigida). VAF: *variant allele frequency* (frecuencia alélica de la variante). WES: *whole exome sequencing* (secuenciación masiva del exoma).

Tabla 29. Ensayos específicos diseñados para los SNVs seleccionados para cada paciente incluido en el estudio.

Paciente	Gen	Mutación	Primer forward	Primer reverse	Sonda específica del alelo mutado (FAM)	Sonda específica del alelo wild-type (VIC)
P1	<i>NUP93</i>	p.Ala158Asp	ACCCTTGACTGTCTTTGGAAATT	TCAGGAACTTCGAACCAATTGGTAA	CCAGCTGGTCCTGATG	CAGCTGGGCCTGATG
	<i>TP53</i>	p.Arg150Trp	CTTTCTTGCGGAGATTCTCTCCT	GCTTTGAGGTGCGTGTTTGTG	TGCGCCAGTCTCT	TGCGCCGGTCTCT
	<i>LRTOMT</i>	p.Arg224His	CCGCTTCTTGCAATGCTAAG	GATGGCAGGGAAGTCTGGAA	CGTACCACTGCCG	CGTACCGCTGCCG
	<i>SETBP1</i>	p.Ile871Thr	TCCCACAGTGAGGAGACGAT	CTTGGTCAGAAGTGCTGTTGTTG	CTGTCCCAGTGCCGC	TCTGTCCAATGCCGC
	<i>CUX1</i>	p.Arg1007*	CGAAGCCATGGAGCAAGCT	CAGAGCTGCATCCGGATGA	AGGGTTCTCAGCCTTT	AGGGTTCTCGGCCTTT
P2	<i>SF3B1</i>	p.Lys700Glu	TGGCCAAAGCACTGATGGT	TGGTTTTGTAGGTCTTGTGGATGAG	AGCAGGAAGTTTCG	CAGCAGAAAGTTTCG
	<i>YLMP1</i>	p.Arg1363*	GGAGAGAAGAAAGAAATCGAGAGCAT	TCGAATCCTCAACTCACCCCTAT	ACGGAAATCTCAATCATA	CACGGAAATCTCGATCATA
	<i>CACHD1</i>	p.Arg387Ser	CATGATGGTGCTGAATCAGTTGAG	ATCCGTTGGGAAGGTTTGT	TGGGCAGTTTCTAC	TGGGCAGTTTCTAC
P3	<i>PPM1D</i>	p.Cys478*	CCCTCAAAGATCCAGAACCACTTG	CCAATTGGAAGGCTATTATTCAAAGAATCA	CTTTAGCTCAATTTTC	TTAGCGCAATTTTC
	<i>SETD2</i>	p.Asp2066Gly	GGAGCTTCTTCGTTTCTTTCTCT	CCCGAAGACTCCTAATAGGTCAAG	CCCAGGCAAGCAA	AGACCCAGACAAGCAA
	<i>SS18L1</i>	p.Ser202Gly	GTCGTTCACTCCATGATGCA	CGACTGGCCCTGGTAGTG	CGCACTACGGCTCG	TCGCACTACAGCTCG
	<i>FAT1</i>	p.Ala503Thr	CAATCGCAAACGGCACATGAT	GTGAGAACGGGTACGTGACAT	ACAGTATCACAAATTT	CAGTATCGCAAATTT
	<i>SLC22A12</i>	p.Pro78Ser	TGAGGCCCTCCTGGCTATTT	GAAGCGGCGGCACTG	CCCGGCGAGATGG	CCCGGCGGGATGG
	<i>TRIM24</i>	p.Tyr88Cys	CCCTGCCTGCACTCTTTCTG	GGCCGAGCCCAGCAT	CAGCGCTGCCTCAT	CCAGCGCTACCTCAT
P4	<i>TP53</i>	p.Phe95Leu	GTGGAATCAACCCACAGC	AACTCTGTCTCCTCCTCTTC	AGATGCTTTGCC	CAAGATGTTTTGCCA
	<i>NUP85</i>	p.Ala293Pro	AGAGTTCAGCACAAATGTCTCT	GTACAAGAGCCGAGTCACT	AAGCTCCCTTG	AAGCTGCCTTG
	<i>BMP7</i>	p.Arg303His	CTAAGCATACCTGCCACG	TCCACTTCCGCAGCAT	TGGAGTGGTTC	TGGAGCGGTTTC

Abreviatura: SNV: *single nucleotide variant* (variaciones de un solo nucleótido).

2.2. Detección de CNAs mediante SNP-A

En la Tabla 30 se detallan las características de las alteraciones detectadas en las cuatro pacientes mediante SNP-A. En todos los casos, se pudo confirmar la delección 5q previamente detectada mediante CC (Figura 43). Gracias a la técnica de SNP-A se definieron de forma más exacta los puntos de rotura de la delección 5q de cada paciente. En el caso de la paciente P2 también se detectó una microdelección del brazo corto del cromosoma X de 1.67 Mb. Dicha alteración se encuentra por debajo del límite de resolución de la CC, por lo que únicamente se detectó mediante SNP-A (125,126). La paciente P3 presentaba una translocación recíproca entre ambos cromosomas 1, que no se detectó mediante SNP-A, ya que se trata de un reordenamiento balanceado que no genera cambios en el número de copias. Para los estudios de SC se tuvieron en cuenta todas las CNAs mencionadas en la Tabla 30.

Tabla 30. Alteraciones detectadas mediante SNP-A

Pac.	Cr.	Citobandas		Coordenadas		Número de copias	Tipo de alteración	Tamaño (Mb)
		Inicio	Final	Inicio	Final			
P1	5	q14.3	q34	89575437	163450743	1	Pérdida	73.88
P2	5	q21.2	q34	102986653	162755919	1	Pérdida	59.77
	X	p22.31	p22.31	6449753	8135644	1	Pérdida	1.67
P3	5	q14.3	q34	86255729	166126310	1	Pérdida	79.87
P4	5	q21.3	q34	107937392	165840296	1	Pérdida	57.90

Abreviaturas: Cr: cromosoma. Mb: megabases. Pac: paciente. SNP-A: *single nucleotide polymorphism array*

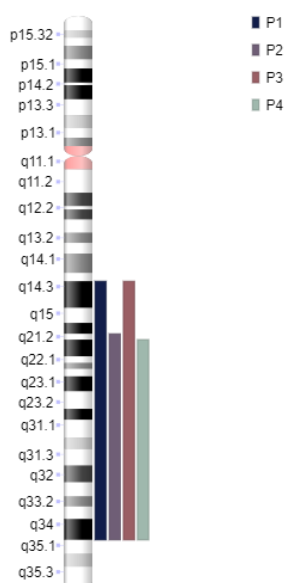


Figura 43. Representación del cromosoma 5 y los puntos de corte de la del(5q) en cada paciente.

3. Arquitectura clonal en HSPC CD34⁺CD117⁺CD45⁺CD19⁻ a partir del análisis de SC

Una vez aplicados los filtros correspondientes (Materiales y métodos, apartado 4.4, página 71) en cada muestra estudiada, se calculó el número de células tumorales analizadas filtradas y en base a ello se calculó el porcentaje que suponía cada subpoblación respecto al total de células. Se obtuvo una mediana de 175 células por muestra (rango: 94-201), en base a las cuales se propuso la arquitectura clonal (orden de adquisición de mutaciones) y evolución clonal tras analizar las muestras pareadas de cada paciente: DX/PRE y seguimientos.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos para cada una de las pacientes incluidas en el estudio con los respectivos clones detectados y la arquitectura clonal inferida en cada caso.

3.1. Arquitectura clonal de la paciente 1

En el caso de la paciente 1 (P1), se estudiaron un total de 6 alteraciones (5 SNVs y la del(5q)) al momento del diagnóstico y en dos muestras de seguimiento (Tablas 27,28 y 30). En la figura 44 se representan los clones detectados y la arquitectura clonal propuesta para cada muestra analizada.

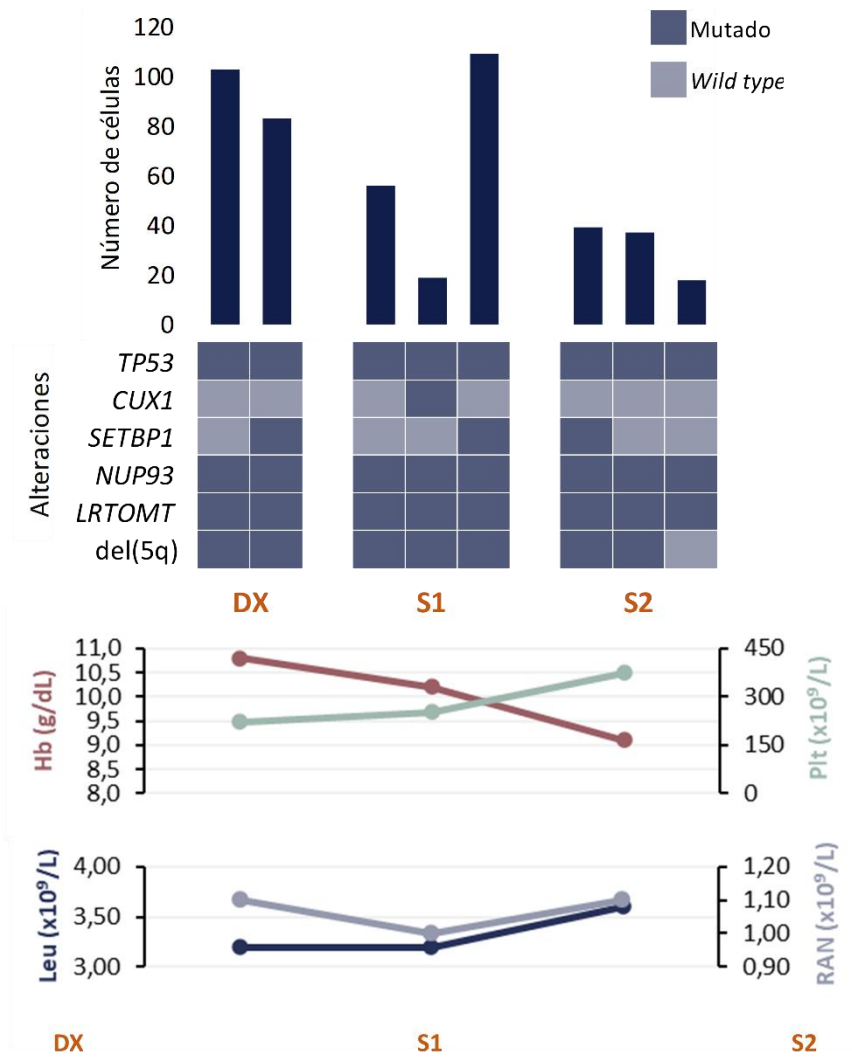
En el momento del diagnóstico, se detectó un clon mayoritario con las mutaciones en *TP53*, *LRTOMT*, *NUP93* y la del(5q). Siguiendo un proceso de evolución lineal este clon dio lugar a otro que tenía, además de las anteriores, una mutación en *SETBP1*.

Al comparar las muestras de seguimiento estudiadas con la del diagnóstico, se siguieron detectando ambos clones. Si bien aparecieron otros, estos dos continuaron estando en mayor proporción. Adicionalmente, se detectó un subclon transitorio (solo detectado en el primer seguimiento) con una mutación en *CUX1*. En la muestra del segundo seguimiento, este pequeño clon no se detectó y, en cambio, se detectó otro con los SNVs *TP53*, *LRTOMT*, *NUP93* pero sin la del(5q). Se infiere que dicho clon podría preceder a todos los demás.

Teniendo en cuenta que esta paciente se encontraba dentro del ensayo clínico SINTRA-REV, y que al momento de la redacción de la presente tesis dicho ensayo aún no ha finalizado, no es posible saber si la paciente había sido tratada o no con lenalidomida.

En el momento en que fueron obtenidas las muestras de seguimiento, la paciente se encontraba estable, es decir; no había evidencia de mejora ni de progresión a nivel clínico. Teniendo en cuenta esta situación, se plantean dos posibles escenarios:

- A) Placebo: si la paciente no hubiese recibido tratamiento, los resultados podrían estar reflejando el curso natural de la enfermedad ya que no se observaron grandes cambios a nivel molecular ni se vieron nuevas alteraciones cromosómicas. Esta explicación sería plausible considerando que, de acuerdo a los criterios del IPSS-R, esta paciente cae en la categoría de muy bajo riesgo, y por tanto no se esperarían signos de progresión de la enfermedad en los seguimientos estudiados (13).
- B) Lenalidomida: por el contrario, si la paciente se hubiese encontrado bajo tratamiento con lenalidomida, la persistencia de la del(5q) podría ser un reflejo de la no respuesta al tratamiento. Esta hipótesis estaría sustentada por el hecho de que la paciente presenta una mutación en el gen *TP53* desde el momento del diagnóstico. Varios estudios previos han asociado la presencia de esta mutación con menores tasas de respuesta al tratamiento con lenalidomida (75,76).



46,XX,del(5)(q13q33)[15]/46,XX[2] 46,XX,del(5)(q13q33)[17]/46,XX[3] 46,XX,del(5)(q13q33)[20]

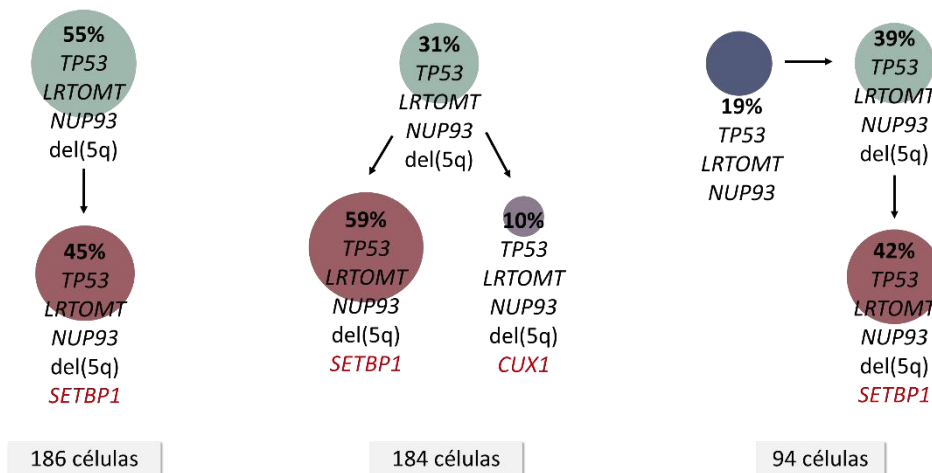


Figura 44. Clones detectados y arquitectura clonal propuesta para cada muestra analizada de la paciente 1 (P1). En la parte superior de la figura se representan los clones detectados al DX (diagnóstico) S1 (seguimiento 1) y S2 (seguimiento 2) con los respectivos valores de Hb (hemoglobina) Plt (plaquetas), Leu (leucocitos) y RAN (recuento absoluto de neutrófilos). En la parte inferior, se representa la arquitectura clonal propuesta para cada muestra analizada junto con el cariotipo correspondiente y el número de células estudiadas en cada momento. Se señalan en rojo las alteraciones que diferencian a cada clon.

3.2. Arquitectura clonal de la paciente 2

En el caso de la paciente 2 (P2), en los estudios de SC se incluyeron 3 SNVs y 2 CNAs (Tablas 27, 28 y 30). Además de la del(5q), se incluyó la del(Xp) que se detectó únicamente mediante SNP-A.

Los resultados al momento del pretratamiento revelaron la presencia de un clon con las mutaciones *SF3B1*, *YLPM1* y la del(Xp) (Figura 45). Siguiendo un proceso de evolución ramificada este clon dio lugar a dos más: uno con la del(5q) y un subclon que en su lugar tenía una mutación en el gen *CACHD1*. A diferencia del primer caso estudiado, en esta paciente la del(5q) se encuentra en un clon secundario que en el momento del pretratamiento constituye el clon mayoritario dentro del compartimento de las HSPC CD34⁺CD117⁺CD45⁺CD19⁻.

Después de 14 meses dentro del ensayo clínico SINTRA-REV, la paciente presentó un cariotipo normal aunque los estudios de SC demostraron que el clon con la del(5q) seguía presente en dicho momento, aunque solo se detectó en un 5% del total de células analizadas. En la segunda muestra de seguimiento (22 meses después de la muestra inicial), la del(5q) ya no se detectó ni por citogenética ni mediante estudios de SC. Por su parte, la proporción del subclon detectado en la muestra inicial (*SF3B1*, *YLPM1*, *CACHD1* y la del(Xp)) fue incrementando a lo largo de las muestras estudiadas. A pesar de que la anemia persistió, estos resultados sugieren que la paciente se encontraba dentro de la rama del ensayo con tratamiento con lenalidomida y que adquirió una respuesta citogenética completa, ya que se logró eliminar el clon que contenía la del(5q).

Además, cabe destacar que este es el único de los cuatro casos analizados donde se detecta una mutación en homocigosis. El SNV en *YLPM1*, que se había detectado a una VAF de 46% mediante WES, en los estudios de SC se detecta únicamente la señal FAM, lo que indica que, en cada célula analizada ambos alelos poseen la mutación. Teniendo en cuenta la VAF, no se esperaría que la mutación fuese homocigota, sin embargo, la diferencia probablemente se deba al hecho de que la WES se llevó a cabo a partir de ADN de MO total, donde la población estudiada mediante técnicas de SC (HSPC CD34⁺CD117⁺CD45⁺CD19⁻) constituye solo una fracción de la población total analizada mediante WES.

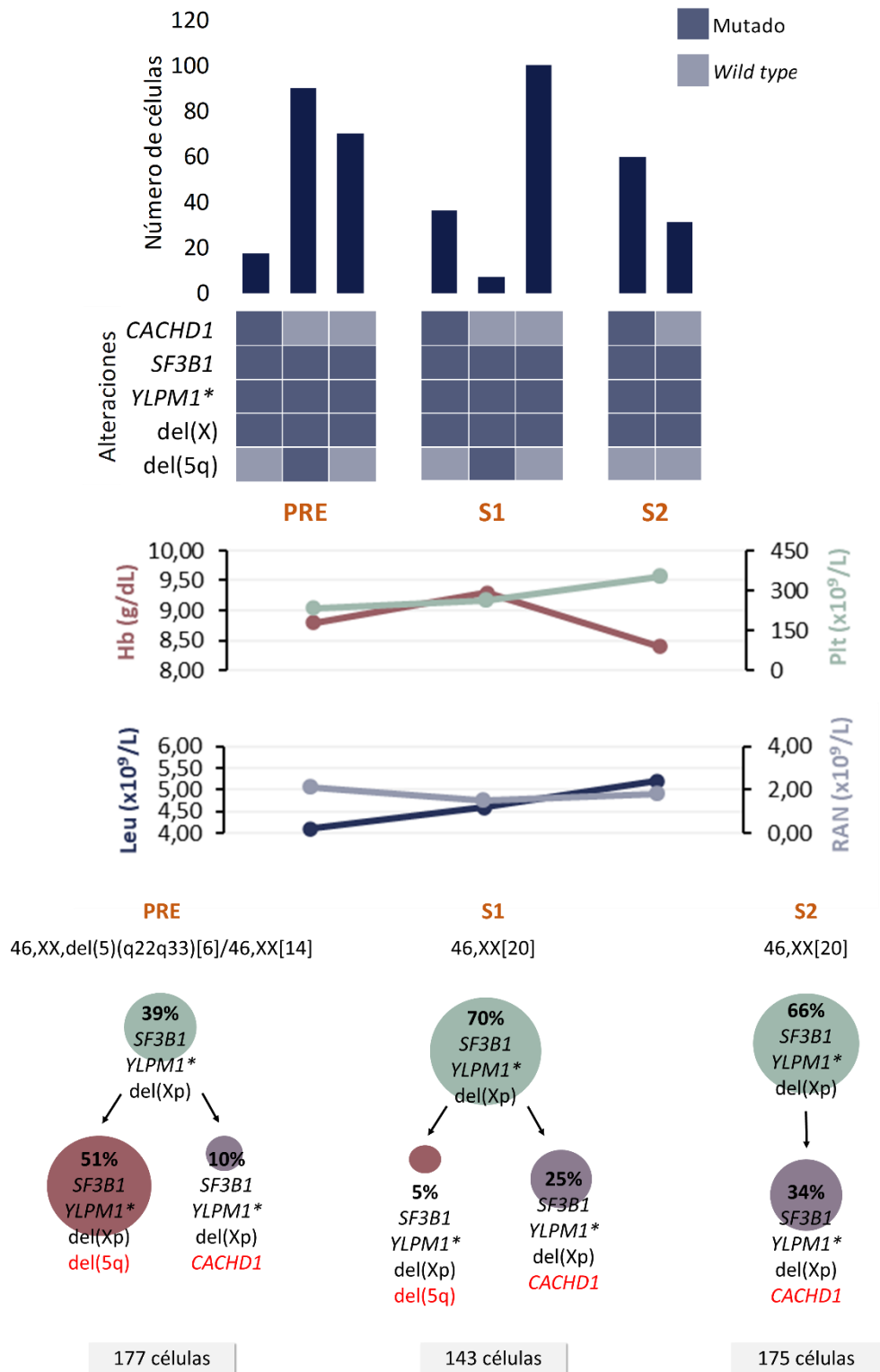


Figura 45. Clones detectados y arquitectura clonal propuesta para cada muestra analizada de la paciente 2 (P2). En la parte superior de la figura se representan los clones detectados al PRE (pretratamiento) S1 (seguimiento 1) y S2 (seguimiento 2) con los respectivos valores de Hb (hemoglobina) Plt (plaquetas), Leu (leucocitos) y RAN (recuento absoluto de neutrófilos). En la parte inferior, se representa la arquitectura clonal propuesta para cada muestra analizada junto con el cariotipo correspondiente y el número de células estudiadas en cada momento. * mutación en homocigosis. Se señalan en rojo las alteraciones que diferencian a cada clon.

3.3. Arquitectura clonal de la paciente 3

Para los estudios de SC de la paciente 3 (P3), se seleccionaron 6 SNVs y la del(5q) como única CNA (Tablas 27, 28 y 30). Los resultados al momento del pretratamiento revelaron la presencia de dos clones cuya única diferencia era la alteración en el gen *TRIM24* (Figura 46). Dos meses después de la obtención de esta muestra, la paciente progresó a una mielofibrosis y no se pudieron obtener más muestras de MO para los estudios de SC, debido a la fibrosis medular. Lamentablemente, la paciente fue exitus antes de poder obtener otra muestra de seguimiento.

Considerando las alteraciones seleccionadas, y que se detectaron solo dos clones en la muestra de estudio, esta paciente no presenta una gran complejidad a nivel intratumoral. De hecho, no se espera una gran complejidad para ninguno de los pacientes incluidos en este estudio, al tratarse de pacientes de bajo riesgo.

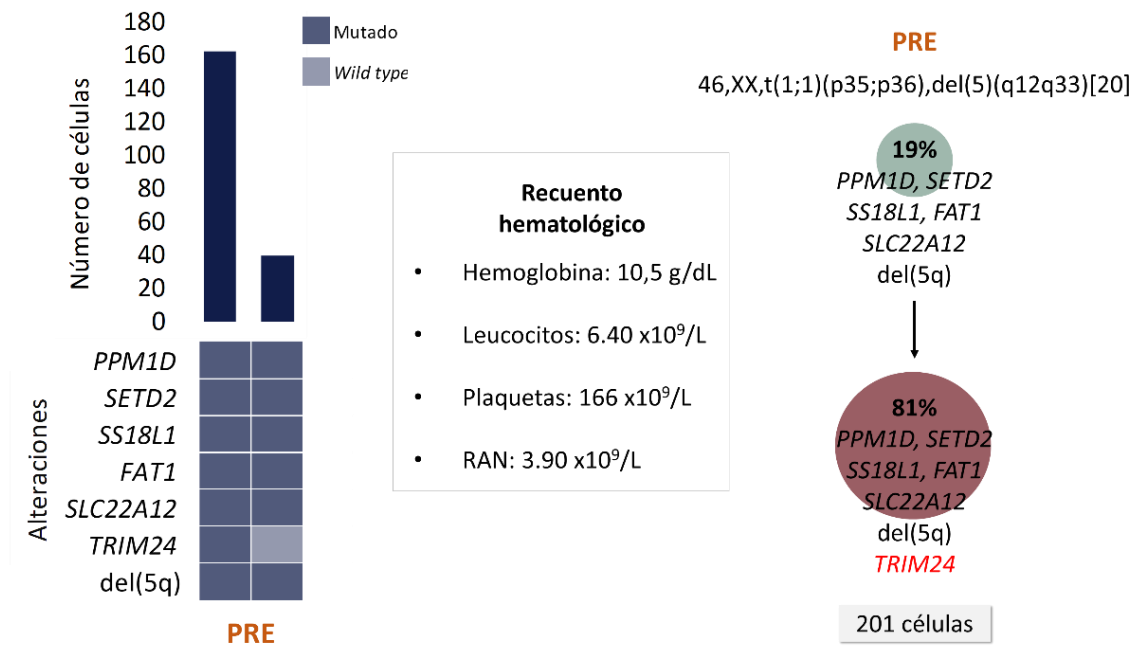


Figura 46. Clones detectados y arquitectura clonal propuesta para la muestra analizada de la paciente 3. A la izquierda de la figura se representan los clones detectados al PRE (pretratamiento) con los respectivos valores de Hb (hemoglobina) Plt (plaquetas), Leu (leucocitos) y RAN (recuento absoluto de neutrófilos). A la derecha, se representa la arquitectura clonal propuesta para la muestra analizada junto con el cariotipo correspondiente y el número de células estudiadas. Se señala en rojo la alteración que diferencia a un clon del otro.

3.4. Arquitectura clonal de la paciente 4

En este último caso (P4), para los estudios en SC, se seleccionaron 3 SNVs y la del(5q) como única CNA (Tablas 27, 28 y 30).

Los resultados de los estudios de SC al diagnóstico revelan la presencia de un único clon que presenta, además de la del(5q), las mutaciones en *NUP85* y *BMP7* (Figura 47). Posteriormente, se analizó una muestra de seguimiento obtenida 20 meses después del diagnóstico, mientras la paciente se encontraba en tratamiento con lenalidomida. En este punto, se observó que el clon detectado en el diagnóstico dio lugar a otro que había adquirido una mutación en *TP53* y que, en proporción, constituye el clon mayoritario. Tal como se mencionó anteriormente, las mutaciones en *TP53* se asocian con una menor respuesta al tratamiento con lenalidomida (75,76), lo cual estaría en línea con el hecho de que la paciente no adquirió una respuesta citogenética (en el cariotipo del seguimiento se seguía detectando la del(5q)) por más de que se hubiera alcanzado una respuesta hematológica que se traduce en una mejora en los niveles de hemoglobina.

Paralelamente, también se detectó otro conjunto de células sin alteraciones genéticas. Lo más probable es que éstas correspondan a una población de células no tumorales, es decir, HSPC normales, sanas. Sin embargo, no se puede descartar que estas células tengan otras alteraciones (SNVs o pequeñas CNAs) que no fueron detectadas teniendo en cuenta que la WES y SNP-A solo se llevaron a cabo en las muestras de DX/PRE. Por más que se haya estudiado la MO *bulk* del seguimiento por TDS y CC, no se puede descartar la presencia de mutaciones en genes no incluidos en el panel así como CNAs por debajo de los límites de resolución y sensibilidad de la CC (164).

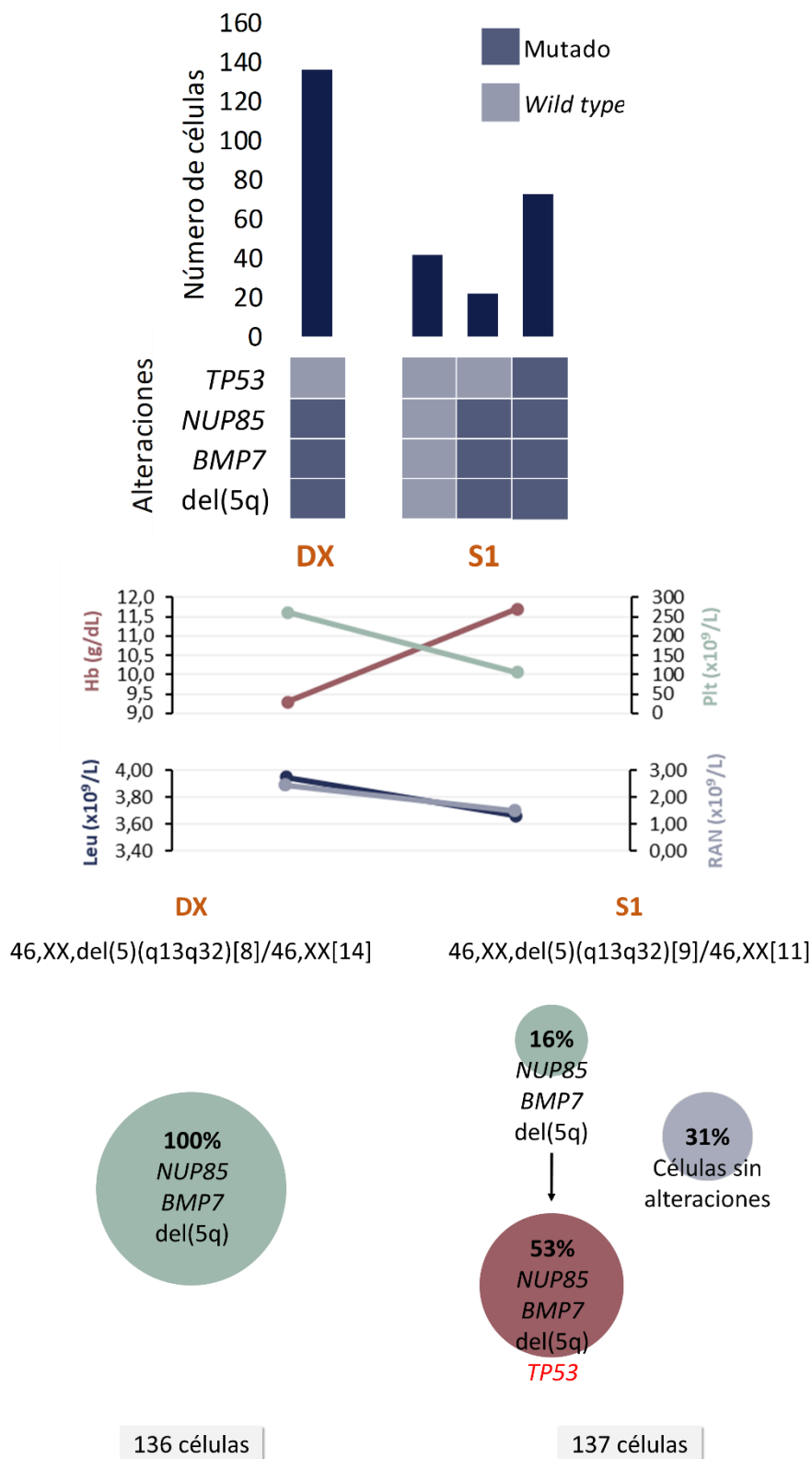


Figura 47. Clones detectados y arquitectura clonal propuesta para cada muestra analizada de la paciente 4 (P4). En la parte superior de la figura se representan los clones detectados al DX (diagnóstico) y S1 (seguimiento 1) con los respectivos valores de Hb (hemoglobina) Plt (plaquetas), Leu (leucocitos) y RAN (recuento absoluto de neutrófilos). En la parte inferior, se representa la arquitectura clonal propuesta para cada muestra analizada junto con el cariotipo correspondiente y el número de células estudiadas en cada momento. Se señala en rojo la alteración que diferencia a un clon del otro.

Discusión

Los SMD constituyen un grupo de enfermedades hematológicas clonales muy heterogéneo que se caracteriza por tener una hematopoyesis ineficaz, citopenias en SP y displasia en uno o más linajes mieloides. Basándose principalmente en estas características, y en un análisis morfológico de la SP y de la MO, la OMS distingue actualmente 8 subgrupos de la enfermedad (3,12). Si bien el SMD con del(5q) aislada es el único de ellos cuyo diagnóstico se asocia a una alteración citogenética concreta, la CC constituye una valiosa herramienta a la hora de evaluar el pronóstico de los SMD y asignar el *score* pronóstico de acuerdo al IPSS-R (55). Por su parte, si bien a día de hoy las técnicas de secuenciación no se encuentran incorporadas como parte de los estudios de rutina para el diagnóstico y seguimiento de los SMD, numerosos estudios han demostrado que las mutaciones en un grupo reducido de genes pueden tener impacto en el pronóstico del paciente e influenciar la respuesta a ciertos tratamientos (36,37,67).

Uno de los subtipos de SMD mejor caracterizado es el SMD con del(5q) aislada. Además de la alteración citogenética que define a esta entidad, entre sus características destacan la anemia típicamente macrocítica y la displasia comúnmente megacariocítica. Ocurre con mayor frecuencia en mujeres y se caracteriza por un riesgo de progresión a LMA relativamente bajo (73). Esta entidad ha sido ampliamente caracterizada mediante técnicas de SNP-A (164,165,74,166,167) y estudios de secuenciación masiva (36,37,115,168). Los otros subtipos de SMD suelen presentar una mayor heterogeneidad y se clasifican en función al número de líneas con displasia, la presencia de SA en la MO (la presencia de mutaciones en *SF3B1*), y el porcentaje de blastos en MO y SP (3,12).

Esta tesis se centra en la caracterización genética de los pacientes con SMD empleando principalmente la secuenciación masiva y el análisis de SC.

En el Trabajo I se estudiaron mediante TDS muestras pareadas de MO, SP-MC y SP-CD34+ de una cohorte de 48 pacientes con SMD. Este trabajo se centró en evaluar la utilidad de emplear las muestras obtenidas a partir de SP como material alternativo para el estudio genético en los SMD.

El Trabajo II se enfocó en el estudio de cuatro pacientes con SMD con del(5q) aislada. En primer lugar, mediante la combinación de la CC, SNP-A, TDS y WES, se llevó a cabo la caracterización molecular de estos pacientes en muestras de MO al DX/PRE. A partir de estos estudios, se seleccionaron una serie de alteraciones para cada paciente que, posteriormente, se estudiaron mediante el análisis de SC de HSPC de la MO en muestras al DX/PRE y los seguimientos disponibles. Los resultados de este análisis fueron correlacionados con las características clínicas, citológicas, citogenéticas y la evolución clínica de los pacientes, incluyendo la respuesta al tratamiento en aquellos pacientes tratados con lenalidomida.

1. Utilidad de la CC y SNP-A en el estudio de los SMD

La CC juega un papel importante en el estudio de los SMD, y de otras neoplasias mieloides relacionadas, ya que las alteraciones citogenéticas son fundamentales a la hora de establecer el diagnóstico y definir pronóstico de esta enfermedad (78).

Tras estudiar la totalidad de los pacientes del Trabajo I de esta tesis mediante CC, se detectaron alteraciones en el 35% de los casos. Esta cifra es considerablemente inferior a la prevista de acuerdo a la literatura (aproximadamente 50%) (79,82), probablemente debido a la inclusión de casos con CCUS y LMMC los cuales no suelen presentar alteraciones citogenéticas. La CCUS hace

referencia a aquellos casos de citopenia de significado incierto que se caracterizan por presentar un componente clonal definido por la presencia una mutación somática, mientras que aproximadamente entre el 70-75% de los casos de LMMC suelen cursar con un cariotipo normal (23,169).

En aquellos casos donde se observó un cariotipo normal mediante CC, la tasa de resultados positivos mediante SNP-A fue del 15%, lo cual confirma que la aplicación de esta técnica permite incrementar considerablemente la detección de alteraciones en estos pacientes y la consecuente confirmación de la clonalidad, especialmente dentro del contexto de un resultado de cariotipo normal. Este porcentaje se encuentra debajo de lo reportado anteriormente en la literatura (alrededor del 25%), probablemente debido a que no fue posible llevar a cabo el estudio mediante SNP-A en todos los casos con cariotipo normal debido principalmente a la insuficiencia de material (170,171). De forma global, mediante la combinación de la CC y SNP-A se pudo confirmar la clonalidad en un 50% de los casos, en comparación con un 35% de los casos que se hubiese obtenido considerando únicamente la CC. Muchas veces el diagnóstico de los SMD puede ser difícil ya que hay una serie de condiciones clonales y no clonales que de manera similar a un SMD, pueden generar displasia y/o citopenia. Es por ello que la confirmación de una alteración clonal puede ayudar en el proceso de diagnóstico (16). Así también, confirmar la clonalidad en un proceso de ICUS, redefiniría la condición del paciente a una CCUS, entidad que presenta un riesgo superior de progresión a SMD en comparación a un caso de ICUS (23).

Por su parte, en el Trabajo II, la aplicación de los SNP-A permitió establecer de forma más precisa los puntos de rotura en 5q, lo cual es importante por dos motivos principales. Primeramente, en un estudio realizado por Jerez *et al.* en el año 2012 (166), determinaron que los pacientes con deleciones que involucran los extremos de las regiones centromérica y telomérica, se asociaban a un curso clínico más agresivo. Por otro lado, también es importante definir el punto de rotura para delimitar los genes implicados en la región delecionada. Se han descrito dos CDR en la región 5q: una que abarca las citobandas 5q32 y 5q33 y que contiene 44 genes (58,59,56,57) y otra en 5q31 que se encuentra más asociada a LMA y casos avanzados de SMD (59). Lo cierto es que en la mayoría de los pacientes las deleciones abarcan ambas CDR (166), tal como se pudo verificar en los cuatro casos de SMD con del(5q) aislada que fueron estudiados en el Trabajo II. A nivel técnico, esto fue relevante para los posteriores análisis en SC, ya que el gen seleccionado para el estudio de la del(5q) mediante dicha técnica fue el *RPS14*, que se encuentra en la CDR que abarca la citobanda 5q33.1. La deleción de dicha citobanda no se reportó en el resultado de la CC de la paciente P10, sin embargo, se pudo detectar mediante SNP-A (Tablas 27 y 30).

2. Secuenciación masiva en el estudio de los SMD

2.1. Perfil mutacional

En el Trabajo I de esta tesis se caracterizó el perfil mutacional de una cohorte de 48 pacientes, compuesta principalmente por pacientes con SMD (80%), mediante TDS a partir de muestras de MO. Se observó que el 85% de los pacientes de la cohorte presentaban al menos una mutación somática. Dicha cifra es comparable con lo reportado anteriormente en otros estudios llevados a cabo con cohortes ampliamente superiores donde también se observó que los genes más frecuentemente mutados fueron los mismos: *TET2*, *SF3B1*, *SRSF2* y *ASXL1* (Figura 48) (36,37).

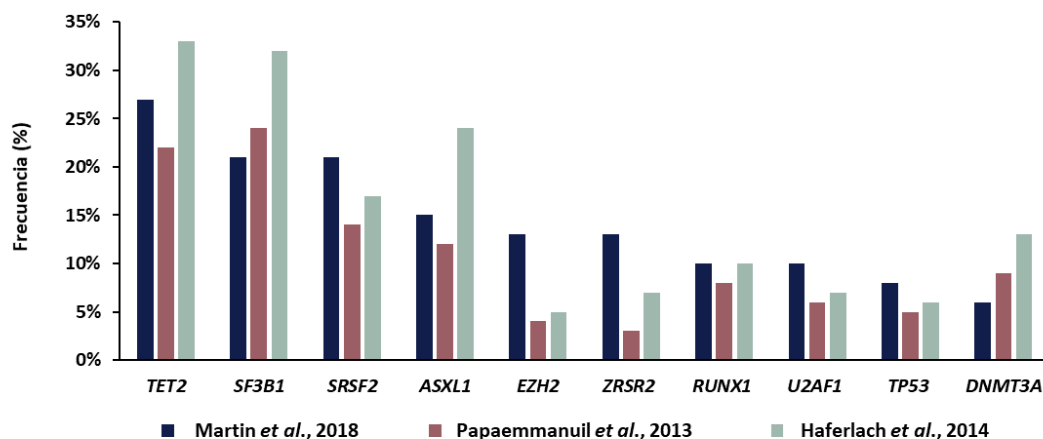


Figura 48. Comparación de los 10 genes más frecuentemente mutados en el Trabajo I (Martin et al., 2018)(172) frente a los estudios de Papaemmanuil *et al.*, 2013 (37) y Haferlach *et al.*, 2014 (36).

La subdivisión de la cohorte de pacientes de acuerdo al porcentaje de blastos en MO en <5% y \geq 5%, demostró una prevalencia de las mutaciones en *SF3B1*, *DNMT3A* y *ZRSR2* en el grupo con un bajo porcentaje de blastos en MO (<5%) (Figura 38). Resultados similares con los genes *SF3B1* y *DNMT3A* fueron reportados anteriormente por Haferlach *et al.* y Pappaemanuil *et al.* (36,37). La prevalencia de la mutación en *SF3B1* en el grupo de pacientes con blastos en MO <5% se asocia a la presencia de SA, lo cual constituye un marcador de buen pronóstico y bajo riesgo de progresión a LMA (29,173).

Las mutaciones en el gen *TP53* se encontraron predominantemente en el grupo con \geq 5% de blastos en MO (Figura 38). Esta asociación es esperable, ya que tanto las mutaciones en *TP53* como el número elevado de blastos se asocian a un peor pronóstico. Además, los tres pacientes de la serie que presentan cariotipo complejo, presentan al menos una mutación en dicho gen. Esta asociación ha sido previamente descrita y se asocia a su vez con un pronóstico adverso, menor SG y mayor riesgo de progresión a LMA (101,107,174–176).

Tal como lo demostraron en un estudio previo Haferlach *et al.* (36), hemos observado un mayor número de alteraciones genéticas (mutaciones y CNAs) en aquellos subgrupos morfológicos de mayor riesgo de acuerdo a la clasificación de la OMS (SMD-EB-1 y SMD-EB-2) al ser comparados con el subtipo morfológico de riesgo intermedio SMD-DML (Figura 39). Paralelamente, hemos encontrado una buena correlación entre el promedio de alteraciones genéticas con el *score* pronóstico del IPSS-R (Figura 39). La proporción de alteraciones citogenéticas es superior en aquellos pacientes de alto y muy alto riesgo, sugiriendo que las alteraciones que afectan a una mayor cantidad de material genético podrían ser eventos secundarios subsecuentes a las mutaciones somáticas puntuales o pequeñas inserciones y deleciones.

El estudio también incluyó pacientes con LMMC, entidad que posee características tanto displásicas como proliferativas, además de características moleculares distintivas (177,178). En concordancia con lo reportado previamente, observamos en dichos pacientes un mayor número de mutaciones y una alta prevalencia de las mismas en genes involucrados en la vía de señalización *RAS* (*NRAS/KRAS*) (Figuras 38 y 39) (179,180,177). Esta vía de señalización está implicada en la regulación de la proliferación celular, por lo cual es esperable que dichas mutaciones sean más frecuentes en las LMMC que tienen un componente proliferativo (181). Adicionalmente, las mutaciones en *STAG2* (gen implicado en la formación del complejo de las

cohesinas) también han sido reportadas previamente dentro de las más frecuentes en los pacientes con LMMC (10%) en comparación con otras neoplasias mieloides (SMD y LMA: 6%) (182). A diferencia de otros estudios, no hemos podido observar una mayor prevalencia de mutaciones en *TET2*, *ASXL1* ni *SRSF2* (componente del spliceosoma) en los pacientes con LMMC, probablemente debido al limitado número de casos incluidos en nuestra cohorte (37,179,180).

2.2. Utilidad de la SP como muestra alternativa a la MO

2.2.1. Detección cualitativa de mutaciones en función de la muestra utilizada

La MO constituye la muestra de elección para el diagnóstico y el estudio de los SMD en la práctica clínica y también para su estudio mediante técnicas de secuenciación masiva.

El objetivo central del Trabajo I de esta tesis fue evaluar la utilidad del empleo de las muestras obtenidas a partir de SP como material alternativo para el estudio genético mediante TDS en los SMD. El diseño experimental fue similar al empleado en estudios previos, excepto por el análisis de la fracción celular SP-CD34+ obtenida a partir de SP total (183). De manera similar a lo reportado por Mohamedali *et al.*, nuestros resultados confirman que mediante la TDS es posible la detección de mutaciones somáticas a partir de muestras tanto de MO como de SP (Figura 41) (183). Por otro lado, hay una pequeña fracción (4%) de mutaciones somáticas que se encuentran en la MO que se pueden detectar a través el enriquecimiento de la fracción tumoral (mediante la separación de células CD34+) en muestras de SP, pero no así en las SP-MC. Teniendo en cuenta que se había establecido el 5% de VAF como límite de detección, hubo solo tres mutaciones presentes en MO cuya detección no fue posible en ninguna muestra de SP, probablemente debido al bajo valor de las VAFs de las mutaciones (Figura 40). En este caso, los valores bajos de VAF hacen referencia a una carga tumoral baja determinada por la presencia de pequeños subclones en la MO que es posible que no estuviesen presentes en la SP o estuviesen presentes pero por debajo del límite de detección establecido. Si bien fijamos un *cutoff* del 5%, con la mejora continua y optimización de las técnicas de preparación de librerías para la secuenciación, tales como la introducción de *barcodes* moleculares, se incrementará la sensibilidad de la técnica ya que se facilitaría el filtrado de artefactos técnicos con lo cual se podría bajar el límite de detección a valores de VAFs de entre 1-5% (40–42).

Sin embargo, también se observó que dos mutaciones solo fueron detectadas en ambas muestras de SP pero no en la MO (Tabla 26). Para el caso 13-GOE, nuevamente el bajo valor de VAF de la mutación (c.112T>C p.S38P) en *CEBPA* (SP-CD34+: 11.9%, SP-MC: 7.3%) podría ser el motivo por el cual no se detectó esta mutación en la MO. No obstante, se pudo detectar esta mutación en una muestra anterior de MO de dicho paciente (VAF: 8.8%). En el segundo caso, 25-GOE, se detectó una mutación en *SRSF2* (c.284C>G p.P95R) en la MO justo por debajo del límite de detección del 5%.

Considerando aquellas mutaciones con una VAF por debajo del límite de detección previamente establecido (<5%), fuimos capaces de detectar prácticamente la totalidad de mutaciones (102/105) en las tres muestras tumorales: MO, SP-CD34+ y SP-MC.

Nuestros hallazgos son equivalentes a los resultados de estudios previos llevados a cabo por Braulke *et al.* focalizados en alteraciones citogenéticas. Ellos demostraron una mejora en la detección de las alteraciones citogenéticas mediante FISH cuando se concentraba la fracción SP-

CD34+ en comparación con muestras de SP total (184,185). En nuestro caso, el enriquecimiento de la fracción CD34+, nos permitió detectar el 97% de las mutaciones somáticas en las SP-CD34+.

2.2.2. Detección cuantitativa de mutaciones somáticas

Además de la detección cualitativa de las mutaciones somáticas, la TDS permite la cuantificación relativa de la carga tumoral de acuerdo a la estimación del tamaño del clon mediante el valor de la VAF. En general, los valores de VAF obtenidos fueron más bajos en las SP-MC en comparación con los valores en MO (Tabla 26, Figura 41). En la SP, la carga tumoral es inferior en comparación con la MO, ya que en proporción en la SP hay menos células tumorales respecto a la celularidad total. Es por ello, que al enriquecer la fracción CD34+ de la SP, se enriquece la fracción tumoral y en consecuencia la carga tumoral sería equivalente a la de la MO. Los valores bajos de VAFs en la SP también fueron reportados previamente por Mohamedali *et al.*, pero a diferencia de nuestro estudio, ellos reportaron que dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas (183). Esta discrepancia es probablemente debida a un filtrado más estricto en nuestro análisis, lo cual en parte fue posible gracias al análisis pareado de muestras control (SP-CD34+) que permitió descartar aquellas variantes presentes en el tejido germinal y obtener en el filtrado final únicamente mutaciones somáticas.

Los bajos valores de VAF obtenidos al secuenciar las muestras de SP-MC podrían explicar la reducción en la tasa de detección de mutaciones en esta muestra. Se esperaría que aquellas mutaciones que de por sí tenían valores bajos de VAF en la MO (5-15%), cayeran por debajo del límite de detección fijado inicialmente en el análisis (5%) en la SP-MC (Tabla 26). Como material alternativo en la SP, tanto para la detección como para la cuantificación de la carga tumoral, se analizó también el ADN obtenido a partir de células CD34+ enriquecidas a partir de SP. Una aproximación similar fue empleada por Braulke *et al.* en dos estudios previos donde seleccionaron y compararon células CD34+ obtenidas a partir de MO y SP como material de partida para el análisis mediante FISH (184,185). Sin embargo, dichos estudios revelan que los tamaños de los clones determinados a partir del análisis de SP-CD34+ mediante FISH son ligeramente inferiores (aunque no significativos) en comparación a los valores obtenidos a partir de células CD34+ de MO. Por su parte, en nuestro estudio no observamos una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de VAF obtenidos a partir de la TDS de la MO y la SP-CD34+ (Figura 41). Como se comentó antes, y a diferencia del estudio llevado a cabo por Braulke *et al.*, al enriquecer la fracción CD34+ de la SP, se enriquece la fracción tumoral y en consecuencia la carga tumoral sería equivalente a la de la MO. Además, la TDS permite el análisis simultáneo de múltiples secuencias individuales por cada mutación que se quiere estudiar, lo que incrementa la sensibilidad de la técnica, en comparación con la FISH en la que solo se evalúan 100-200 células.

Paralelamente, en varios estudios (186–188) se ha analizado la utilidad del ADN tumoral circulante (ctADN) como alternativa a la MO en los estudios de TDS tanto en los SMD como en la LMA. El ctADN forma parte del ADN libre circulante (en inglés, *cell-free DNA*, cfDNA), que constituye ADN altamente fragmentado que se encuentra en el plasma y puede provenir de 3 posibles procesos celulares: apoptosis, necrosis y secreción celular activa (189). La fracción del cfDNA proveniente de células tumorales se denomina ctADN. En el estudio llevado a cabo en el 2017 por Yeh *et al.* en muestras de pacientes con SMD, comparan la carga tumoral cuantificada mediante TDS y PCR digital a partir de muestras de MO y ctADN obtenido a partir de muestras de plasma (187). Los autores demuestran que es posible detectar y cuantificar la carga tumoral a partir de ambas muestras y que los valores de VAF determinados a partir del ctADN son

comparables con los obtenidos a partir de la MO, tal como lo hemos demostrado en el caso de las células SP-CD34+. Tanto Yeh *et al.* como el trabajo de la presente tesis, proveen evidencias de que empleando el ADN obtenido a partir de la SP se podría realizar el seguimiento de la evolución clonal en los pacientes con SMD (187). No obstante, se debe tener en cuenta que el ctADN se encuentra altamente fragmentado y que su concentración puede ser baja en proporción al cfDNA total por lo que la detección de mutaciones a partir de este tipo de muestras conlleva dificultades biológicas y técnicas asociadas (190). Es por ello, que creemos el ctADN constituye una alternativa especialmente útil en tumores sólidos, donde muchas veces la ubicación del tumor hace que la obtención de una muestra más adecuada sea aún más complicada (189). Por su parte, en los SMD y otras neoplasias mieloides, se puede obtener ADN tumoral de buena cantidad y calidad a partir de las propias células que se encuentran en la sangre.

Además de lo expuesto anteriormente, el uso de muestras obtenidas a partir de SP como material alternativo para el análisis mediante TDS en los SMD presenta varias ventajas a nivel práctico: primeramente, es un material que se puede obtener a partir de un procedimiento mínimamente invasivo para el paciente, lo cual a su vez facilitaría la toma de muestra periódica para un seguimiento y monitorización frecuente. Esto facilitaría la evaluación molecular de la respuesta a los tratamientos, así como la detección precoz de una posible evolución hacia formas más agresivas de la enfermedad. Además, alrededor del 10-20% de los pacientes con SMD pueden cursar con fibrosis medular, situación que de manera similar a una MO hipocelular dificultaría obtener material en cantidad y calidad adecuada y donde la SP podría ser especialmente útil para los estudios de TDS (191,192).

2.3. Utilidad de la muestra control pareada en los estudios de secuenciación

En los estudios de secuenciación masiva, la utilización de tejido germinal como control pareado no siempre es posible, debido a la disponibilidad del mismo y también al incremento del coste que implica el estudio de dos muestras por cada paciente. No obstante, hay situaciones en las que es de especial utilidad contar con dichos controles. Se estima que el exoma comprende el aproximadamente el 1-2% del genoma y que los cambios en las regiones codificantes son responsables del 85% de las enfermedades genéticas conocidas (134). Es por ello que, para los estudios de WES y secuenciación del genoma (en inglés, *whole genome sequencing*, WGS) resulta prácticamente imprescindible utilizar tejido germinal como control pareado para poder identificar variantes germinales y variantes somáticas raras a partir de este tipo de estudios (193). En cambio, en la TDS, nos focalizamos en genes que han estado previamente descritos en la enfermedad, por lo tanto, el empleo de muestra control pareada no es tan crucial como en el caso de la WES o WGS, pero puede ser de gran utilidad en aquellos casos en los que se detecta una variante a una VAF sugestiva de que la misma podría ser germinal (valores en torno al 50% o 100%) y los predictores funcionales indican que la variante podría ser patogénica en la neoplasia de estudio (177,194).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en la presente tesis, se utilizó ADN de linfocitos T-CD3+ de SP como tejido control en los estudios de TDS del Trabajo I y en los estudios de WES del Trabajo II. En el primer trabajo, permitió un análisis más refinado gracias a que se pudo descartar con certeza aquellas variantes que ya se sospechaba que podrían tener un origen germinal. Además de las características recientemente mencionadas, por lo general, se trataba de variantes que estaban reportadas en las bases de datos poblacionales, aunque a una frecuencia inferior al 1%, por lo cual no pasaban el *cutoff* establecido para ser descartadas de acuerdo a

nuestro proceso de filtrado (Figura 28). De manera similar, en el Trabajo II de esta tesis, gracias al empleo del control germinal pareado se ha podido caracterizar el perfil mutacional de las pacientes teniendo en cuenta estrictamente las variantes somáticas.

En línea con el uso de muestras control, un punto de debate en este ámbito es la fuente de células a utilizar como control germinal. En el caso de los tumores sólidos, se suelen emplear muestras de SP (195,196), pero en el caso de los SMD, dicho tejido se encuentra infiltrado con células tumorales. Muchos estudios coinciden en que, en el caso de los SMD y otras neoplasias mieloides, la mejor fuente de ADN germinal son los fibroblastos derivados de una biopsia de piel (197–200). Sin embargo, la obtención de dicho material implica un proceso invasivo para el paciente, no es un tejido que habitualmente se almacene en los biobancos, y además se recomienda un cultivo celular previo de 3-6 semanas para obtener suficiente ADN (197). Padrón *et al.* han estudiado diversos tejidos alternativos (folículos pilosos, frotis bucal y SP-CD3+) dentro del contexto de la detección de variantes somáticas en los SMD. De acuerdo con ellos, a pesar del origen hematopoyético de los linfocitos T-CD3+, estas células son fáciles de obtener en cantidades suficientes a partir de la SP y constituyen un buen control germinal cuando se alcanzan niveles de pureza >95%, condición que se pudo cumplir en la mayoría de las muestras de los trabajos llevados a cabo en esta tesis.

2.4. Retos en la introducción de la secuenciación masiva en la práctica clínica

Si bien la introducción de la secuenciación masiva ha supuesto una revolución en el ámbito de la investigación básica y aplicada, a nivel clínico y particularmente en los SMD, ha contribuido a una mejor caracterización de la enfermedad a través de la identificación de mutaciones genéticas recurrentes que, como bien se ha comentado anteriormente, contribuyen al diagnóstico (mutaciones de *SF3B1* en pacientes con SA) y, especialmente, a una mejor estratificación pronóstica del paciente. Concretamente, el uso de la TDS se ha ido introduciendo en los laboratorios clínicos y, como consecuencia de dicho proceso, han ido surgiendo retos en su implementación. Más allá del coste o de la implementación de la técnica en el laboratorio, los mayores retos derivan principalmente del análisis y la interpretación de los resultados (154,201). Respecto la interpretación de los resultados hay dos aspectos principales a tener en cuenta: primeramente, la identificación de las variantes somáticas, que son las implicadas en la patogénesis de los SMD y, posteriormente, la interpretación de las mismas dentro del contexto clínico del paciente.

A su vez, en el proceso de identificación de las variantes somáticas, que son las que están realmente implicadas en la patogénesis de la enfermedad de estudio, pueden interferir factores tanto biológicos como técnicos (201). Dentro de los aspectos biológicos, la dificultad radica en distinguir las mutaciones somáticas de principalmente tres eventos: polimorfismos, mutaciones germinales (discutido en el apartado anterior) y casos de CHIP.

En cuanto al primer evento, no hay un *cutoff* estandarizado para definir a los polimorfismos, pero en nuestro caso hemos seguido los criterios propuestos en las Guías del Grupo Español de SMD (GESMD) (Figura 28) (154), que proponen considerar polimorfismo a toda variante cuya frecuencia del alelo menor (MAF) en la población sea $\geq 1\%$. Para ello, existen bases de datos poblacionales como 1000 Genomes, gnomAD, dbSNP, entre otras, que proporcionan esta información a partir de grandes estudios llevados a cabo en individuos en principio sanos (202–204).

En referencia a las mutaciones germinales, consideraríamos como tales aquellas variantes que se encuentran presentes en el tejido germinal del paciente. Los polimorfismos son un ejemplo de variantes de tipo germinal, pero gracias al uso de bases de datos poblacionales, son fáciles de identificar. En cambio, detectar variantes germinales con una frecuencia poblacional $<1\%$ sin el uso de muestra pareada, puede resultar complicado. En primer lugar, estas variantes presentan una VAF cercana al 50%. También se debe considerar que, por lo general, son variantes que no tienen un impacto en la función de la proteína, dicho de otro modo, variantes benignas. Para ello, son útiles los predictores funcionales (algoritmos que ayudan a predecir *in silico* el impacto que tendría una mutación en la proteína) tales como SIFT, Polyphen, MutationTaster, entre otros (205). Cuantas más bases de datos poblacionales y predictores funcionales se puedan emplear, mayor será la información de la que dispondremos para evaluar una variante.

La misma expansión de la secuenciación masiva ha permitido ver que la adquisición de mutaciones somáticas en genes comúnmente asociados a neoplasias mieloides (como *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, entre otros) no se restringe únicamente a aquellos individuos con SMD, NMP o LMA, sino que dichas mutaciones pueden presentarse en individuos aparentemente sanos. Esta condición conocida como CHIP, fue descrita por Steensma *et al.* en el 2015 (21). La misma implica la presencia de una población clonal en la SP caracterizada por la presencia de una mutación somática en un gen asociado a una neoplasia hematológica a una VAF $\geq 2\%$ en la ausencia de citopenias (21,23). Es por ello que es fundamental la interpretación de estos posibles hallazgos teniendo en cuenta todo el contexto clínico del paciente, ya que, si bien presentan una mutación asociada a una neoplasia hematológica, los individuos con CHIP no reúnen los criterios establecidos para el diagnóstico de ninguna de estas entidades, incluso aunque presentaran citopenias (en este caso hablaríamos de CCUS). Reportes posteriores estiman que solo el 0.5-1% de los casos de CHIP progresarán a una neoplasia hematológica (21). Sin embargo, un estudio llevado a cabo por Malcovati *et al.*, demostró que aquellos casos con CCUS presentaban una ratio de progresión de 13.9 y una probabilidad de progresión en 10 años del 95% *versus* 9% en aquellos pacientes con ICUS (24). Para todos estos casos, no hay ningún estudio en la actualidad que demuestre que una intervención pueda modificar el riesgo de evolución, por lo que hoy en día se recomienda un seguimiento más constante de estos casos, llevando a cabo recuentos hematológicos de forma periódica a fin de detectar precozmente cualquier signo adicional de progresión (206).

Finalmente, los artefactos de PCR y errores generados durante el proceso de secuenciación pueden ser factores técnicos que interfieran a la hora de distinguir una variante somática. Como se mencionó en el apartado 2.2.1, la introducción de *barcodes* moleculares, *también llamados unique molecular identifiers* (UMIs), pueden ayudar a filtrar artefactos técnicos, con lo cual permitiría bajar el límite de detección (aumentar la sensibilidad) con mayor fiabilidad (Figura 49) (207–209). Los UMIs son secuencias nucleotídicas cortas que identifican a cada molécula de ADN original generadas después de la fragmentación de una muestra y adicionadas antes de las sucesivas rondas de amplificación por PCR durante la preparación de las librerías. De esta manera, durante el proceso de análisis bioinformático posterior, es posible identificar y agrupar todos los *reads* que tengan un mismo UMI y posteriormente diferenciar aquellas SNVs que constituyen una variante real de un artefacto.

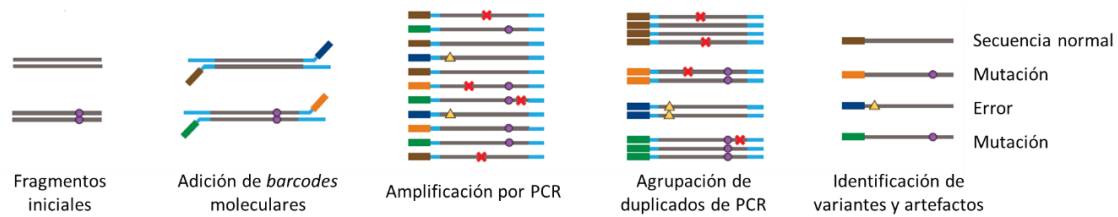


Figura 49. Utilización de *barcodes* moleculares durante la preparación de librerías. Abreviatura: PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Adaptada de Salk *et al.*, 2018 (209).

Si bien la implementación de estas técnicas en los laboratorios clínicos puede contribuir a mejorar el manejo del paciente, siempre hay que tener en cuenta la integración de todas las disciplinas (morfología, inmunofenotipo, citogenética y datos clínicos) para un correcto manejo de los pacientes.

3. Estudios de SC

3.1. Análisis de la HIT mediante estudios de SC

El término HIT hace referencia a la coexistencia de diferentes subpoblaciones celulares dentro de un tumor, que a su vez aportan la diversidad genética que promueve la evolución tumoral. Si bien no es un concepto nuevo, la mayor parte de nuestro conocimiento actual acerca de la HIT deriva de los estudios llevados a cabo mediante técnicas de secuenciación masiva a partir de muestras tumorales *bulk*. Sin embargo, parte de la HIT viene dada como consecuencia de la mezcla de células normales y de diversos clones y subclones con diferentes características genéticas cuyas particularidades quedan enmascaradas al emplear dicha aproximación. Mediante la secuenciación de una muestra *bulk*, la VAF puede dar una idea del tamaño del clon que presenta una mutación concreta y, a partir de estos resultados, se puede inferir el orden de adquisición de cada mutación. Sin embargo, cuando dichos valores de VAF son muy cercanos entre sí, esta aproximación puede llevar a agrupar erróneamente en un mismo clon dos mutaciones que en realidad podrían encontrarse en clones distintos. Además, mediante esta aproximación no se puede discernir la cigosidad, es decir, si una determinada mutación se encuentra en uno en ambos alelos. De este modo, se pueden perder eventos raros en una población tumoral ante la posibilidad de que ciertos subclones, que pueden ser justamente los responsables de la resistencia a un tratamiento, queden enmascarados (108,138,147). Todos estos inconvenientes se pueden resolver en gran parte mediante el uso de las técnicas de análisis de SC que surgieron en la última década y, desde entonces, han experimentado grandes avances técnicos.

Salvo un estudio llevado a cabo recientemente por Chen *et al.*, a diferencia de otras patologías como la LMA o el mieloma múltiple donde varios estudios mediante técnicas de análisis de ADN de SC se han publicado en los últimos años (159,210–212,147,213,214), los estudios en el ámbito de los SMD son escasos. En el Trabajo II de la presente tesis se empleó el análisis de SC en un grupo de pacientes con SMD con del(5q) aislada, a partir de las HSPC de la MO, para estudiar los cambios genéticos al momento del DX/PRE y durante el curso de la enfermedad (tratamiento con lenalidomida y/o durante la progresión).

Los estudios llevados a cabo por Nilsson *et al.* en la primera década de los años 2000 (215,216) sustentaban que la del(5q) constituye un evento temprano en la patología en aquellos pacientes con SMD con la del(5q) aislada. Este hecho también fue constatado en los estudios llevados a cabo por Woll *et al.* en el año 2014 (217). En nuestro caso, en 3 de las 4 pacientes estudiadas,

podimos verificar la presencia de dicha alteración en todas las células analizadas por SC, lo que sugiere que ésta se encuentra presente en los clones más ancestrales detectados al momento del diagnóstico, con excepción de la paciente P2 donde la del(5q) se detectó en un clon secundario. Es de destacar que en esta paciente el clon que precedía a la del(5q) presentaba una mutación en el gen *SF3B1*, mutación que, de acuerdo a la literatura, suele representar una mutación *driver* ancestral en los SMD, y se detecta en un 20% de los casos con este subtipo de SMD (29). Este hallazgo está en línea con lo reportado por Mossner *et al.*, quienes contrariamente a lo reportado antes, demostraron que la del(5q) constituía un evento secundario en el 62% (13/21) de los casos con SMD con del(5q) aislada que incluyeron en su cohorte (115). Paralelamente, dentro de los estudios de Woll *et al.*, hubo cuatro casos donde la mutación en *SF3B1* precedía a la del(5q), aunque se trataban de casos con diagnóstico de ARSA y CRDM y SA. Mian *et al.*, estudiaron el papel de esta mutación en una cohorte de pacientes con SMD con SA y concluyeron que la misma tendría un rol como evento inicial en la patogénesis de dichos casos (218). La co-ocurrencia de la mutación en el gen *SF3B1* y la del(5q) fue un tema tratado en una publicación reciente del *International Working Group for the Prognosis of Myelodysplastic Syndromes (IWG-PM)* (173), donde propusieron que aquellos casos de SMD con la mutación del gen *SF3B1* deberían considerarse un subtipo de SMD diferente. Esta entidad se denominaría SMD con *SF3B1* mutado y estaría definida por la presencia de citopenia, una mutación somática en *SF3B1*, displasia (con o sin SA), y blastos en MO y SP por debajo del 5% y 1%, respectivamente. En cuanto a los casos con mutación de *SF3B1* y del(5q) argumentaron que, si bien el orden de adquisición de las alteraciones podría ayudar a discernir si se trata de un caso de SMD con SA o SMD con del(5q) aislada, este examen no siempre es posible en la práctica clínica, por lo cual hoy por hoy estos casos continuarían clasificándose de acuerdo a los actuales criterios de la OMS dentro de la entidad de SMD con del(5q) aislada (3).

Es bien sabido que el SMD con del(5q) aislada se asocia a un pronóstico favorable, donde menos del 10% de los casos progresa a LMA (3,54,76). Normalmente, y tal como lo reflejan los cuatro casos del estudio, son pacientes que se sitúan en la categoría de muy bajo o bajo riesgo de acuerdo a los criterios del IPSS-R. El curso clínico es variable y, en los casos más leves, el paciente incluso puede presentar un curso clínico indolente o bien cursar con anemia, que puede ser controlada con tratamientos de soporte (transfusiones, agentes quelantes y agentes estimulantes de la eritropoyesis) durante meses e incluso años (219–221). Este es el caso de la paciente P2, quien estuvo sin tratamiento los primeros cuatro años posteriores al diagnóstico.

A día de hoy, en Europa, el tratamiento con lenalidomida está aprobado para pacientes con SMD con del(5q) aislada con dependencia transfusional y bajo riesgo cuando otras opciones terapéuticas son inadecuadas o insuficientes (221). Si bien este fármaco permite alcanzar la independencia transfusional en el 56% al 67% de los casos, no todos responden adecuadamente y el 50% de los pacientes puede presentar recaída clínica y citogenética después de 2-3 años de tratamiento (71,220–222). En nuestro estudio, dos pacientes (P3 y P4) recibieron lenalidomida y dos (P1 y P2) se encontraban dentro del ensayo clínico SINTRA-REV (lenalidomida *versus* placebo).

De estos últimos, se puede afirmar casi con certeza que la paciente P2 se encontraba dentro del ensayo en la rama de tratamiento con lenalidomida, ya que 14 meses después de su inclusión en el mismo, la paciente adquirió una respuesta citogenética completa acompañada de un ligero incremento en los niveles de hemoglobina. Sorprendentemente, el estudio de la MO en este punto mediante análisis de SC, reveló que el clon con la del(5q) seguía presente en dicho

momento, aunque solo se detectó en un 5% del total de células analizadas. En la muestra obtenida 22 meses después, ya no se detectó dicho clon. Este hallazgo pone de manifiesto la elevada sensibilidad del análisis de SC, que dependerá también del número de células analizadas. Si bien en este caso se pudo verificar la desaparición del clon con la del(5q) en una muestra posterior, podrían darse casos como los reportados en el estudio llevado a cabo recientemente por Ediriwickrema *et al.* en pacientes con LMA, donde demostraron mediante estudios de SC que ciertas alteraciones persistentes al momento de la remisión se expandieron convirtiéndose posteriormente en el clon dominante al momento de la recaída (213).

En el caso de la paciente P1, que también se encontraba dentro del ensayo clínico, atendiendo los resultados obtenidos junto con las características clínicas de la paciente, no es posible inferir si la misma había recibido o no lenalidomida. La del(5q) estaba presente en todas las muestras estudiadas y, además, los valores de hemoglobina fueron decayendo gradualmente a la par que la puntuación en el IPSS-R aumentó y la paciente pasó de muy bajo a bajo riesgo. Esto podía ser consistente con el hecho de que la paciente estuviera en la rama placebo, pero a su vez podría reflejar una no respuesta a la lenalidomida, en el caso de estar incluida en la rama de tratamiento. Este hecho, estaría reforzado por la presencia de una mutación en el gen *TP53* que se detectó al momento del diagnóstico de la paciente. Estos resultados estarían en línea con lo reportado por Jädersten *et al.*, quienes demostraron que, en un grupo de pacientes de su cohorte de estudio, la mutación en *TP53* se encontraba en etapas muy tempranas de la enfermedad, muchos años antes de la progresión de la misma, y que su presencia se asociaba a una menor respuesta a la lenalidomida y a un riesgo incrementado de evolución a LMA (76). Solo en la última muestra de seguimiento analizada se detectó un clon sin la del(5q) pero sí con la mutación en *TP53*, lo que podría sugerir que, en esta paciente, la mutación precedía a la deleción. Por el contrario, si bien los resultados de la CC sugieren que la proporción de células con la del(5q) fue en aumento, los resultados no son comparables con los del análisis de SC, ya que la población celular estudiada mediante cada técnica no es la misma y, además, en ambas solo se recoge una muestra del total de células que componen la MO. Para validar esta hipótesis, lo ideal hubiese sido poder analizar muestras previas al diagnóstico de SMD. Incluso teniendo muestras de SP, podríamos haber secuenciado las mismas en búsqueda de la mutación en *TP53* y estudiar la presencia de la del(5q) mediante FISH tal como Bräulke *et al.* demostraron que es posible a partir de estas muestras (184,185,223).

Si bien está reportado que alrededor del 20% de los pacientes con SMD con del(5q) aislada presentan mutaciones en el gen *TP53* (76), Scharenberg *et al.* han sugerido que en la mayoría de los casos dicha mutación ocurre durante la evolución de la enfermedad, especialmente después del tratamiento con lenalidomida (77). Este parece ser el caso de la paciente P4, en la que se detecta dicha mutación mediante TDS solo en la muestra de seguimiento a una VAF del 7%, sugiriendo un evento subclonal. Este hecho se pudo comprobar mediante el análisis de SC, que reveló que el único clon detectado en el diagnóstico dio lugar a otro que había adquirido una mutación en *TP53* y que, en proporción, constituye el clon mayoritario en el seguimiento. Paralelamente, se ha asociado la presencia de esta mutación con una menor respuesta citogenética (77,167), pero no con una menor respuesta eritroide (73,76,115). Esto también está en línea con las características clínicas de la paciente P4. Si bien la CC revela el mismo número de metafases con la del(5q) en ambos momentos, hubo una mejora significativa en los niveles de hemoglobina (que a su vez repercutió en un descenso en la puntuación IPSS-R). El análisis de SC también reveló otro conjunto de células sin alteraciones genéticas. Lo más probable es que éstas correspondan a una población de células no tumorales, es decir, HSPC normales, sanas y

que podrían formar parte del *pool* de células que estuviesen contribuyendo a la mejora clínica mencionada anteriormente.

Si bien estudiamos un número muy limitado de pacientes, en general no se observan cambios muy drásticos en la arquitectura clonal, lo cual es esperable atendiendo que, de por sí, los SMD con del(5q) aislada son una entidad asociada al bajo riesgo, ya que por lo general no suelen presentar otras citopenias más allá de la anemia, tienen un porcentaje de blastos inferior al 5% y no tienen alteraciones citogenéticas de alto riesgo (3). En línea con este bajo riesgo, no suelen presentar muchas mutaciones, alteraciones por SNP-A o una heterogeneidad intratumoral compleja (36,167), a diferencia de otros subgrupos morfológicos de mayor riesgo, como los pacientes con SMD-EB. Por otro lado, considerando que la media de la SG de los pacientes se sitúa entre los 66-145 meses (3), también cabe esperar estos resultados ya que el máximo seguimiento realizado dentro del estudio fue de 33 meses.

3.2. Limitaciones de los estudios en SC y perspectivas futuras

En los últimos tres años la tecnología de SC ha experimentado un gran avance tanto a nivel instrumental como a nivel de análisis (224), y principalmente en combinación con la secuenciación masiva. La mayoría de los nuevos instrumentos utilizan sistemas microfluídicos donde se generan miles de gotas que portan las células individuales con oligonucleótidos de captura y reactivos, ya sea para la generación de librerías para estudios transcriptómicos (mediante la retrotranscripción previa del ARN) o para la generación de librerías para estudios genómicos (a partir del ADN). Los oligonucleótidos de captura contienen una secuencia que identifica a todas las moléculas que provienen de una misma célula. Es por ello que, una vez que estén marcadas con dicha secuencia específica, estas gotas se pueden juntar y se puede llevar a cabo, mediante secuenciación masiva, la reacción de miles de células en un solo tubo (146,147).

En este Trabajo se empleó el sistema C1 (Fluidigm), el primer instrumento de SC automatizado que salió al mercado en el 2012, donde la captura celular se lleva a cabo dentro de un chip microfluídico dotado de un sistema de microcanales en el que las células son capturadas en cámaras de reacción individuales. Así, a diferencia de los nuevos instrumentos que permiten la captura simultánea de miles de células en un solo experimento, en la C1 el número de células capturadas viene limitado por la capacidad del chip (213,224). En nuestro caso, empleamos un promedio de 4 chips con capacidad máxima de 96 células por cada muestra estudiada. Además de que la eficiencia de la captura se situaba en aproximadamente el 60-70%, posteriormente se descartaban células en el proceso de filtrado, sobre todo en el análisis de CNAs y en el filtrado de las poblaciones obtenidas e identificación de subclones. La suma de todos estos factores hizo que finalmente estudiáramos una mediana de 175 células por muestra (rango: 94-201), en base a las cuales se propuso la arquitectura clonal en el DX/PRE y seguimientos de cada paciente.

Como punto a favor de la tecnología que hemos utilizado y, a diferencia de las nuevas, los chips empleados en la C1 permiten un análisis visual de los sitios de captura, previamente a los pasos de lisis y retrotranscripción y/o amplificación. De esta forma, se puede tener la certeza de que posteriormente se seleccionan para el análisis solo aquellos sitios de captura con una sola célula. Si bien los nuevos instrumentos permiten capturar muchas más células en poco tiempo y la técnica es menos laboriosa y menos costosa (en cuanto al coste por célula), se asume una tasa de error debido a la doble captura que es imposible de verificar como en el caso de la C1.

En el Trabajo II de esta tesis hemos podido estudiar la HIT de cuatro pacientes con SMD con del(5q) aislada mediante el análisis de SC en más de un momento de la enfermedad. Si bien es un número limitado de casos, en comparación con otros estudios que han reunido una cohorte más grande de pacientes (217,115,225,114,226), en dichos estudios, la composición clonal y los patrones de evolución fueron reconstruidos en base a las VAFs de las mutaciones estudiadas en cada caso a partir de muestras *bulk*. A pesar de estas diferencias en cuanto a técnicas y número de casos analizados, los estudios llevados a cabo por Woll *et al.*, Mossner *et al.* y el nuestro, demuestran que una alteración que en un paciente aparece como evento ancestral dentro del orden de adquisición de mutaciones, en otro paciente puede aparecer como evento secundario (115,217). Este hecho resalta la elevada heterogeneidad de los SMD y la importancia de la caracterización molecular específica en cada paciente.

Teniendo en cuenta el gran avance de la tecnología de SC, discutida en el apartado anterior, y el mayor uso de estas técnicas, es esperable que con los años se vuelva más coste-efectiva, y por tanto más accesible. Tal como sucedió con la secuenciación masiva, donde el proyecto genoma humano costó 2.7 billones de dólares, mientras que hoy en día ya es posible secuenciar un genoma humano por menos de 1000 dólares (227,228). Esto, sumado a la posibilidad de combinar el análisis de SC tanto a nivel de ADN como ARN e incluso estudiar los aspectos epigenéticos de la enfermedad, nos permitirá avanzar en el conocimiento de esta patología sumamente heterogénea.

Conclusiones

1. La caracterización genética llevada a cabo mediante TDS en una cohorte de pacientes con SMD, a partir de muestras de SP y MO muestra que:
 - 1.1. La combinación de la CC con técnicas moleculares, como los SNP-A y la TDS, permite confirmar la clonalidad en un mayor número de casos en pacientes con SMD.
 - 1.2. La TDS permite la detección de las mutaciones somáticas a partir de muestras de MO, SP-MC y SP-CD34+.
 - 1.3. La población tumoral es menos abundante en la fracción de SP-MC, por lo que la detección, y especialmente la cuantificación de la carga tumoral, es menos recomendable a partir de este tipo de muestras.
 - 1.4. El uso de la fracción CD34+ enriquecida a partir de muestras de SP provee datos equivalentes, y por lo tanto resultados comparables, a los de la MO mediante TDS.
 - 1.5. En los SMD, el uso de SP-CD34+ como material alternativo para el análisis mediante TDS facilitaría la toma de muestra periódica para un seguimiento y monitorización frecuente.
 - 1.6. La TDS a partir de SP-CD34+ sería recomendable para el análisis mutacional en aquellos casos de SMD que cursan con hipocelularidad o fibrosis medular.

2. La caracterización genética llevada a cabo mediante el análisis de SC en un grupo de pacientes con SMD con la del(5q) aislada, muestra que:
 - 2.1. El análisis de SC permitió llevar a cabo un estudio más preciso al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad de los SNVs y CNAs detectados previamente mediante CC, SNP-A, WES y TDS.
 - 2.2. La del(5q) suele representar un evento ancestral en pacientes con SMD con del(5q) aislada. Sin embargo, el orden de adquisición de las alteraciones genéticas es variable, pudiendo una misma alteración aparecer como un evento ancestral en un paciente y en otros como un evento secundario. En concreto, en este trabajo, se observó dicha variabilidad con la del(5q) y la mutación del gen *TP53*.
 - 2.3. En general, los pacientes con SMD con del(5q) aislada no presentan una gran heterogeneidad intratumoral ni presentan cambios muy drásticos en la arquitectura clonal.

Bibliografía

1. Kumar A, D'Souza SS, Thakur AS. Understanding the Journey of Human Hematopoietic Stem Cell Development. *Stem Cells Int.* 2019;2019:1–13.
2. Blank U, Karlsson S. TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells. 2015;125(23):10.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.
4. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937–51.
5. Patnaik MM, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93(6):824–40.
6. Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016;16(11):607–9.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick H, et al. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol.* 1994;87(4):746–54.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982;51(2):189–99.
9. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic Syndromes — Coping with Ineffective Hematopoiesis. *N Engl J Med.* 2005;352(6):536–8.
10. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2016;128(16):2096–7.
11. Verburgh E, Achten R, Louw VJ, Brusselmans C, Delforge M, Boogaerts M, et al. A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. *Leukemia.* 2007;21(4):668–77.
12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405.
13. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454–65.
14. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2014;124(18):2793–803.

15. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos y Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (GESMD y SEHH). Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. 2a edición. Boletín del GESMD. 2020; 8; 1-56.
16. Bejar R. Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing? *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10(3):282–91.
17. 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. *Leuk Res*. 2007;31(6):727–36.
18. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477–87.
19. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488–98.
20. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014;20(12):1472–8.
21. 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*. 2015;9–16.
22. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(2):111–21.
23. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia*. 2017;31(9):1869–71.
24. Malcovati L, Gallì A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*;129(25):3371-3378
25. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018;93(1):129–47.
26. Bennett JM. A Comparative Review of Classification Systems in Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Semin Oncol*. 2005;32:3–10.
27. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292–302.
28. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239–46.
29. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384–95.

30. Germing U, Lauseker M, Hildebrandt B, Symeonidis A, Cermak J, Fenaux P, et al. Survival, prognostic factors and rates of leukemic transformation in 381 untreated patients with MDS and del(5q): A multicenter study. *Leukemia*. 2012;26(6):1286–92.
31. Mallo M, Luño E, Sanzo C, Cervera J, Haase D, Schanz J, et al. Clinical impact of the clone size in MDS cases with monosomy 7 or 7q deletion, trisomy 8, 20q deletion and loss of Y chromosome. *Leuk Res*. 2011;35(6):834–6.
32. Germing U, Strupp C, Giagounidis A, Haas R, Gattermann N, Starke C, et al. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2012;36(6):727–34.
33. Malcovati L, Porta MGD, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(30):7594–603.
34. Germing U, Strupp C, Kuendgen A, Isa S, Knipp S, Hildebrandt B, et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2006;91(12):1596–604.
35. Maassen A, Strupp C, Giagounidis A, Kuendgen A, Nachtkamp K, Hildebrandt B, et al. Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res*. 2013;37(1):64–70.
36. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241–7.
37. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616–27.
38. Xu L, Gu Z-H, Li Y, Zhang J-L, Chang C-K, Pan C-M, et al. Genomic landscape of CD34+ hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome and gene mutation profiles as prognostic markers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8589–94.
39. Cazzola M, Rossi M, Malcovati L, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(2):260–9.
40. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jädersten M, Jansson M, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015;126(2):233–41.
41. Patnaik MM, Tefferi A. Refractory anemia with ring sideroblasts and RARS with thrombocytosis. *Am J Hematol*. 2015;90(6):549–59.
42. Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res*. 2000;24(12):983–92.

43. Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, et al. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2013;92(1):1–9.
44. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011;478(7367):64–9.
45. Strupp C, Gattermann N, Giagounidis A, Aul C, Hildebrandt B, Haas R, et al. Refractory anemia with excess of blasts in transformation: analysis of reclassification according to the WHO proposals. *Leuk Res.* 2003;27(5):397–404.
46. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2007;92(6):744–52.
47. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;119(14):3211–8.
48. Patnaik MM, Hanson CA, Hodnefield JM, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic study of 277 patients. *Leukemia.* 2012;26(1):101–5.
49. Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer.* 2010;10:401.
50. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Gallì A, Della Porta MG, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood.* 2014;124(9):1513–21.
51. Knipp S, Strupp C, Gattermann N, Hildebrandt B, Schapira M, Giagounidis A, et al. Presence of peripheral blasts in refractory anemia and refractory cytopenia with multilineage dysplasia predicts an unfavourable outcome. *Leuk Res.* 2008;32(1):33–7.
52. Steensma DP, Dewald GW, Hodnefield JM, Tefferi A, Hanson CA. Clonal cytogenetic abnormalities in bone marrow specimens without clear morphologic evidence of dysplasia: a form fruste of myelodysplasia? *Leuk Res.* 2003;27(3):235–42.
53. VAN DEN BERGHE H, CASSIMAN J-J, DAVID G, FRYNS J-P, MICHAUX J-L, SOKAL G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of No. 5 chromosome. *Nature.* 1974;251(5474):437–8.
54. Giagounidis AAN, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C, et al. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia.* 2004;18(1):113–9.
55. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and

- Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820–9.
56. Ebert BL. Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia*. 2009;23(7):1252–6.
 57. Talati C, Sallman D, List AF. SOHO State of the Art and Next Questions: Management of Myelodysplastic Syndromes With Deletion 5q. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(10):629–35.
 58. Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Gama S, Kearney L, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5qX syndrome. 2002;99(12):4.
 59. Lai F, Godley LA, Joslin J, Fernald AA, Liu J, Espinosa R, et al. Transcript Map and Comparative Analysis of the 1.5-Mb Commonly Deleted Segment of Human 5q31 in Malignant Myeloid Diseases with a del(5q). *Genomics*. 2001;71(2):235–45.
 60. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335–9.
 61. Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, Holmes LR, Lorenzo-Abalde S, Lane AL, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med*. 2010;16(1):59–66.
 62. Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011;117(9):2567–76.
 63. Pellagatti A, Boultonwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015;95(1):3–15.
 64. Kumar MS, Narla A, Nonami A, Mullally A, Dimitrova N, Ball B, et al. Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. 2011;118(17):8.
 65. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010;16(1):49–58.
 66. Schneider RK, Ademà V, Heckl D, Järås M, Mallo M, Lord AM, et al. Role of Casein Kinase 1A1 in the Biology and Targeted Therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell*. 2014;26(4):509–20.
 67. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood*. 2019;1049–1059.
 68. Pellagatti A, Jadersten M, Forsblom A-M, Cattani H, Christensson B, Emanuelsson EK, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(27):11406–11.

69. Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, MacBeth KJ, Hurst SN, Udeshi ND, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature*. 2015;523(7559):183–8.
70. Järås M, Miller PG, Chu LP, Puram RV, Fink EC, Schneider RK, et al. Csnk1a1 inhibition has p53-dependent therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia. *J Exp Med*. 2014;211(4):605–12.
71. 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.
72. Platzbecker U, Fenaux P, Adès L, Giagounidis A, Santini V, van de Loosdrecht AA, et al. Proposals for revised IWG 2018 hematological response criteria in patients with MDS included in clinical trials. *Blood*. 2019;133(10):1020–30.
73. List A, Ebert BL, Fenaux P. A decade of progress in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Leukemia*. 2018;32(7):1493–9.
74. Mallo M, Cervera J, Schanz J, Such E, García-Manero G, Luño E, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*. 2011;25(1):110–20.
75. Mallo M, Del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoz MJ, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol*. 2013;162(1):74–86.
76. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(15):1971–9.
77. Scharenberg C, Giai V, Pellagatti A, Saft L, Dimitriou M, Jansson M, et al. Progression in patients with low- and intermediate-1-risk del(5q) myelodysplastic syndromes is predicted by a limited subset of mutations. *Haematologica*. 2017;102(3):498–508.
78. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008;87(7):515–26.
79. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385–95.
80. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(12):849–59.
81. McGowan-Jordan, Jean, Simons, Annet, Schmid, Michael, International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature. *ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature (2016)*. Switzerland: Karger; 2016.
82. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2005;90(9):1168–78.

83. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079–88.
84. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496–506.
85. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, Abdel-Wahab O, Steensma DP, Galili N, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30(27):3376–82.
86. Steensma DP. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(7):969–83.
87. Steensma DP. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J*. 2018;8(5):47.
88. Malcovati L. Impact of transfusion dependency and secondary iron overload on the survival of patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2007;31:S2–6.
89. Steensma DP. Hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol*. 2011;38(5):635–47.
90. Brierley CK, Steensma DP. Thrombopoiesis-stimulating agents and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2015;169(3):309–23.
91. Mittelman M, Platzbecker U, Afanasyev B, Grosicki S, Wong RSM, Anagnostopoulos A, et al. Eltrombopag for advanced myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukaemia and severe thrombocytopenia (ASPIRE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2018;5(1):e34–43.
92. Stahl M, DeVeaux M, de Witte T, Neukirchen J, Sekeres MA, Brunner AM, et al. The use of immunosuppressive therapy in MDS: clinical outcomes and their predictors in a large international patient cohort. *Blood Adv*. 2018;2(14):1765–72.
93. Jabbour E, Short NJ, Montalban-Bravo G, Huang X, Bueso-Ramos C, Qiao W, et al. Randomized phase 2 study of low-dose decitabine vs low-dose azacitidine in lower-risk MDS and MDS/MPN. *Blood*. 2017;130(13):1514–22.
94. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):968–74.
95. Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016;769:47–62.
96. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):5–19.
97. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Peng J, Tang G, et al. TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2015;8(1):45.

98. Maciejewski JP, Padgett RA. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. *Br J Haematol.* 2012;158(2):165–73.
99. Spaulding TP, Stockton SS, Savona MR. The evolving role of next generation sequencing in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2019;1–16.
100. for the International Working Group for MDS Molecular Prognostic Committee, Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, Maciejewski JP, Nazha A, et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia.* 2019;33(7):1747–58.
101. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol.* 2013;160(5):660–72.
102. on behalf of the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM), Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia.* 2011;25(7):1147–52.
103. Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarroki A, Jankowska AM, Hasrouni E, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia.* 2014;28(1):78–87.
104. 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.* 2017;376(6):536–47.
105. 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.* 2017;129(17):2347–58.
106. Della Porta MG, Galli 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. *J Clin Oncol.* 2016;34(30):3627–37.
107. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P, et al. Somatic Mutations Predict Poor Outcome in Patients With Myelodysplastic Syndrome After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2014;32(25):2691–8.
108. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(2):81–94.
109. Martelotto LG, Ng CK, Piscuoglio S, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res.* 2014;16(3):210.
110. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012;481(7381):306–13.
111. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell.* 2017;168(4):613–28.

112. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23–8.
113. Hossfeld DK, Sandberg AA. [Philadelphia chromosome]. *Klin Wochenschr*. 1970;48(24):1431–41.
114. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2017;49(2):204–12.
115. 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*. 2016;128(9):1246–59.
116. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506–10.
117. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264–78.
118. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525–30.
119. Egan JB, Shi C-X, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012;120(5):1060–6.
120. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1067–76.
121. Landau DA, Carter SL, Getz G, Wu CJ. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia*. 2014;28(1):34–43.
122. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med*. 2017;23(10):1135–45.
123. O'Connor, C. Karyotyping for Chromosomal Abnormalities. *Nature Education*. 2008;1(1):27.
124. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Ades L, Cermak J, del Canizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943–64.
125. Saldarriaga W, García-Perdomo HA, Arango-Pineda J, Fonseca J. Karyotype versus genomic hybridization for the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities: a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(3):330.e1-330.e10.
126. Schoumans J, Suela J, Hastings R, Muehlematter D, Rack K, van den Berg E, et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders: ARRAY GUIDELINES FOR HAEMATOLOGICAL NEOPLASIA. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55(5):480–91.

127. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, et al. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia*. 2005;19(8):1424–31.
128. Rigolin G, Bigoni R, Milani R, Cavazzini F, Roberti M, Bardi A, et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia*. 2001;15(12):1841–7.
129. Brammer S, Vasconcelos S, Poersch L, Oliveira A, Brasileiro-Vidal A. Genomic in situ Hybridization in Triticeae: A Methodological Approach. In 2013. p. 3–22.
130. McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2000;2000:1–14.
131. Maciejewski JP, Tiu RV, O’Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2009;146(5):479–88.
132. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
133. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008;26(10):1135–45.
134. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15(9):733–47.
135. Hagemann IS. Chapter 1 - Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. In: Kulkarni S, Pfeifer J, editors. *Clinical Genomics*. Boston: Academic Press; 2015. p. 3–19.
136. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *J Invest Dermatol*. 2013;133(8):1–4.
137. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53–9.
138. Kuipers J, Jahn K, Beerenwinkel N. Advances in understanding tumour evolution through single-cell sequencing. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2017;1867(2):127–38.
139. Loo PV. Single cell analysis of cancer genomes. 2014;10.
140. Taniguchi K, Kajiyama T, Kambara H. Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR. *Nat Methods*. 2009;6(7):503–6.
141. Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front. Cell Dev. Biol*. 2016; 4, 116.
142. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*. 2009;6(5):377–82.

143. Navin N. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472(7341):90-4.
144. Valihrach L, Androvic P, Kubista M. Platforms for Single-Cell Collection and Analysis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):807.
145. Chung W, Eum HH, Lee H-O, Lee K-M, Lee H-B, Kim K-T, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun*. 2017;8(1):15081.
146. Zheng GXY, Terry JM, Belgrader P, Rykin P, Bent ZW, Wilson R, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):14049.
147. Xu L, Durruthy-Durruthy R, Eastburn DJ, Pellegrino M, Shah O, Meyer E, et al. Clonal Evolution and Changes in Two AML Patients Detected with A Novel Single-Cell DNA Sequencing Platform. *Sci Rep*. 2019;9(1):11119.
148. Paolillo C, Londin E, Fortina P. Single-Cell Genomics. *Clin Chem*. 2019;65(8):972–85.
149. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754–60.
150. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297–303.
151. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078–9.
152. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*. 2009;25(17):2283–5.
153. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16):e164–e164.
154. Palomo L, Ibáñez M, Abáigar M, Vázquez I, Álvarez S, Cabezón M, et al. Spanish Guidelines for the use of targeted deep sequencing in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;188(5):605-622.
155. Marco-Sola S, Sammeth M, Guigó R, Ribeca P. The GEM mapper: fast, accurate and versatile alignment by filtration. *Nat Methods*. 2012;9(12):1185–8.
156. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):213–9.
157. Kim S, Scheffler K, Halpern AL, Bekritsky MA, Noh E, Källberg M, et al. Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat Methods*. 2018;15(8):591–4.
158. Narzisi G, Corvelo A, Arora K, Bergmann EA, Shah M, Musunuri R, et al. Genome-wide somatic variant calling using localized colored de Bruijn graphs. *Commun Biol*. 2018;1(1):20.

159. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*. 2014;28(8):1705–15.
160. Potter NE, Ermini L, Papaemmanuil E, Cazzaniga G, Vijayaraghavan G, Tittley I, et al. Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer. *Genome Res*. 2013;23(12):2115–25.
161. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
162. Weaver S, Dube S, Mir A, Qin J, Sun G, Ramakrishnan R, et al. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods*. 2010;50(4):271–6.
163. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820–9.
164. Maciejewski JP, Tiu RV, O’Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2009;146(5):479–88.
165. Makishima H, Rataul M, Gondek LP, Huh J, Cook JR, Theil KS, et al. FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: Improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8 and del(20q). *Leuk Res*. 2010;34(4):447–53.
166. Jerez A, Gondek LP, Jankowska AM, Makishima H, Przychodzen B, Tiu RV, et al. Topography, Clinical, and Genomic Correlates of 5q Myeloid Malignancies Revisited. *J Clin Oncol*. 2012 Apr 20;30(12):1343–9.
167. Mallo M, del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoiz MJ, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol*. 2013;162(1):74–86.
168. Adema V, Palomo L, Toma A, Kosmider O, Fuster-Tormo F, Benito R, et al. Distinct mutational pattern of myelodysplastic syndromes with and without 5q- treated with lenalidomide. *Br J Haematol*. 2020. doi: 10.1111/bjh.16558.
169. Such E, Cervera J, Costa D, Sole F, Vallespi T, Luno E, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(3):375–83.
170. Tiu RV, Gondek LP, O’Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*. 2011;117(17):4552–60.
171. Gondek LP, Tiu R, O’Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008;111(3):1534–42.

172. Martin R, Acha P, Ganster C, Palomo L, Dierks S, Fuster-Tormo F, et al. Targeted deep sequencing of CD34+ cells from peripheral blood can reproduce bone marrow molecular profile in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2018;93(6):E152–4.
173. Malcovati L, Stevenson K, Papaemmanuil E, Neuberg D, Bejar R, Boultonwood J, et al. SF3B1-mutant myelodysplastic syndrome as a distinct disease subtype - A Proposal of the International Working Group for the Prognosis of Myelodysplastic Syndromes (IWG-PM). *Blood*. 2020. doi: 10.1182/blood.2020004850.
174. Takahashi K, Patel K, Bueso-Ramos C, Zhang J, Gumbs C, Jabbour E, et al. Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget*. 2016;7(12):14172-87
175. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations With Loss of Heterozygosity of p53 Are Common in Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia After Exposure to Alkylating Agents and Significantly Associated With Deletion or Loss of 5q, a Complex Karyotype, and a Poor Prognosis. *J Clin Oncol*. 2001;19(5):1405–13.
176. 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. *bioRxiv*. 2019. doi.org/10.1101/2019.12.19.868844
177. Palomo L, Garcia O, Arnan M, Xicoy B, Fuster F, Cabezón M, et al. Targeted deep sequencing improves outcome stratification in chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features. *Oncotarget*. 2016 Aug 30;7(35):57021-57035
178. Patel BJ, Huang D, Thota S, Przychodzen BP, Sakaguchi H, Kojima S, et al. Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Can be Categorized By Ancestral Mutational Events. *Blood*. 2014;124(21):1893–1893.
179. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic Score Including Gene Mutations in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2428–36.
180. Elena C, Gallì 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*. 2016;128(10):1408–17.
181. Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, et al. RAS Mutations Contribute to Evolution of Chronic Myelomonocytic Leukemia to the Proliferative Variant. *Clin Cancer Res*. 2010;16(8):2246–56.
182. Kon A, Shih L-Y, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232–7.
183. Mohamedali AM, Gäken J, Ahmed M, Malik F, Smith AE, Best S, et al. High concordance of genomic and cytogenetic aberrations between peripheral blood and bone marrow in myelodysplastic syndrome (MDS). *Leukemia*. 2015;29(9):1928–38.

184. Braulke F, Schanz J, Jung K, Shirneshan K, Schulte K, Schuetze C, et al. FISH analysis of circulating CD34+ cells as a new tool for genetic monitoring in MDS: Verification of the method and application to 27 MDS patients. *Leuk Res.* 2010;34(10):1296–301.
185. Braulke F, Jung K, Schanz J, Götze K, Müller-Thomas C, Platzbecker U, et al. Molecular cytogenetic monitoring from CD34+ peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes: First results from a prospective multicenter German diagnostic study. *Leuk Res.* 2013;37(8):900–6.
186. Albitar F, Ma W, Diep K, De Dios I, Agersborg S, Thangavelu M, et al. Deep Sequencing of Cell-Free Peripheral Blood DNA as a Reliable Method for Confirming the Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. *Genet Test Mol Biomark.* 2016;20(7):341–5.
187. Yeh P, Dickinson M, Ftouni S, Hunter T, Sinha D, Wong SQ, et al. Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2017;129(12):1685–90.
188. Short NJ, Patel KP, Albitar M, Franquiz M, Luthra R, Kanagal-Shamanna R, et al. Targeted next-generation sequencing of circulating cell-free DNA vs bone marrow in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2020;4(8):1670–7.
189. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019;17:100087.
190. Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC — challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(9):577–86.
191. Maschek H, Georgii A, Kaloutsi V, Werner M, Bandekar K, Kressel M-G, et al. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 1992;48(4):208–14.
192. Ramos F, Robledo C, Izquierdo-García FM, Suárez-Vilela D, Benito R, Fuertes M, et al. Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including mutational analysis. *Oncotarget.* 2016;7(21):30492-503.
193. Goh L, Chen GB, Cutcutache I, Low B, Teh BT, Rozen S, et al. Assessing Matched Normal and Tumor Pairs in Next-Generation Sequencing Studies. Khanin R, editor. *PLoS ONE.* 2011;6(3):e17810.
194. Montgomery ND, Selitsky SR, Patel NM, Hayes DN, Parker JS, Weck KE. Identification of Germline Variants in Tumor Genomic Sequencing Analysis. *J Mol Diagn.* 2018;20(1):123–5.
195. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330–7.
196. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61–70.
197. The University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood.* 2016;128(14):1800–13.

198. Akpan IJ, Osman AEG, Drazer MW, Godley LA. Hereditary Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis, Questions, and Controversies. *Curr Hematol Malig Rep.* 2018;13(6):426–34.
199. Padron E, Ball MC, Teer JK, Painter JS, Yoder SJ, Zhang C, et al. Germ line tissues for optimal detection of somatic variants in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2018;131(21):2402–5.
200. Rio-Machin A, Vulliamy T, Hug N, Walne A, Tawana K, Cardoso S, et al. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. *Nat Commun.* 2020;11(1):1044.
201. Bacher U, Shumilov E, Flach J, Porret N, Joncourt R, Wiedemann G, et al. Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood Cancer J.* 2018;8(11):113.
202. Sherry ST. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308–11.
203. The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061–73.
204. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *bioRxiv.* 2019. doi.org/10.1101/531210
205. Ghosh R, Oak N, Plon SE. Evaluation of in silico algorithms for use with ACMG/AMP clinical variant interpretation guidelines. *Genome Biol.* 2017;18(1):225.
206. Bejar R, Sekeres MA. Attack of the clones: CHIP in the clinic. *The Hematologist.* 2019;16(1).
207. Kou R, Lam H, Duan H, Ye L, Jongkam N, Chen W, et al. Benefits and Challenges with Applying Unique Molecular Identifiers in Next Generation Sequencing to Detect Low Frequency Mutations. Wang J, editor. *PLOS ONE.* 2016;11(1):e0146638.
208. Smith T, Heger A, Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res.* 2017;27(3):491–9.
209. Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):269–85.
210. Paguirigan AL, Smith J, Meshinchi S, Carroll M, Maley C, Radich JP. Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2015;7(281): 281re2.
211. 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.* 2019;25(1):103–10.
212. McMahon CM, Ferng T, Canaani J, Wang ES, Morrisette JJD, Eastburn DJ, et al. Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* 2019;9(8):1050–63.

213. Ediriwickrema A, Aleshin A, Reiter JG, Corces MR, Köhnke T, Stafford M, et al. Single-cell mutational profiling enhances the clinical evaluation of AML MRD. *Blood Adv.* 2020;4(5):943–52.
214. Miles LA, Bowman RL, Merlinsky TR, Csete IS, Ooi A, Durruthy-Durruthy R, et al. Single cell mutational profiling delineates clonal trajectories in myeloid malignancies. *bioRxiv.* 2020. doi.org/10.1101/2020.02.07.938860
215. Nilsson L, Åstrand-Grundstrom I, Arvidsson I, Jacobsson B, Hellstrom-Lindberg E, Hast R, et al. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *2000;96(6):10.*
216. Nilsson L, Edén P, Olsson E, Månsson R, Åstrand-Grundström I, Strömbeck B, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q– myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2007;110(8):3005–14.
217. Woll PS, Kjällquist U, Chowdhury O, Doolittle H, Wedge DC, Thongjuea S, et al. Myelodysplastic Syndromes Are Propagated by Rare and Distinct Human Cancer Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell.* 2014;25(6):794–808.
218. Mian SA, Rouault-Pierre K, Smith AE, Seidl T, Pizzitola I, Kizilors A, et al. SF3B1 mutant MDS-initiating cells may arise from the haematopoietic stem cell compartment. *Nat Commun.* 2015;6(1):10004.
219. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2008;111(10):4841-51.
220. Tehranchi R, Woll PS, Anderson K, Buza-Vidas N, Mizukami T, Mead AJ, et al. Persistent Malignant Stem Cells in del(5q) Myelodysplasia in Remission. *N Engl J Med.* 2010;363(11):1025–37.
221. 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.* 2019;3(6):e314.
222. Göhring G, Giagounidis A, Büsche G, Kreipe HH, Zimmermann M, Hellström-Lindberg E, et al. Patients with del(5q) MDS who fail to achieve sustained erythroid or cytogenetic remission after treatment with lenalidomide have an increased risk for clonal evolution and AML progression. *Ann Hematol.* 2010;89(4):365–74.
223. Bräulke F, Schulz X, Germing U, Schuler E, Platzbecker U, Nolte F, et al. Peripheral blood cytogenetics allows treatment monitoring and early identification of treatment failure to lenalidomide in MDS patients: results of the LE-MON-5 trial. *Ann Hematol.* 2017;96(6):887–94.
224. Valihrach L, Androvic P, Kubista M. Platforms for Single-Cell Collection and Analysis. *Int J Mol Sci.* 2018;20.
225. 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.* 2017;8(1):15099.

226. Nagata Y, Makishima H, Kerr CM, Przychodzen BP, Aly M, Goyal A, et al. Invariant patterns of clonal succession determine specific clinical features of myelodysplastic syndromes. *Nat Commun.* 2019;10(1):5386.
227. Collins FS. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. *Science.* 2003;300(5617):286–90.
228. National Human Genome Research Institute. The cost of sequencing a human genome. 2016. <https://www.genome.gov/27565109/the-cost-ofsequencing-a-human-genome/> Acceso: 8 de Mayo de 2020.

Anexos

Anexo I: Metodología Suplementaria

1. Procesamiento de muestras de médula ósea y sangre periférica

1.1. Reactivos

Reactivos	Componentes/Fabricante
PBS 1X	450 mL H ₂ O + 50 mL PBS 10X
Lymphoprep (Ficoll)	STEMCELL Technologies (Referencia: 07811)
Dextrano 2%	2 g dextrano + 100 mL suero
Tampón de Lisis Eritrocitaria (TLE)	84 g NH ₄ Cl + 0,35g EDTA + 100 mL HEPES (enrasar 1 L H ₂ O)
Trypan Blue	Merck (Referencia: T8154)
Suero fetal bovino (FBS)	Gibco (Referencia: 10270106). Previamente descomplementado mediante incubación a 56°C durante 30 minutos
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Merck (Referencia: 276855)
Medio de criopreservación	80% FBS, 20% DMSO

1.2. Materiales

- Tubos falcon de 15 mL y 50 mL
- Pipetas serológicas de 5 mL y 10 mL
- Pipetas Pasteur de plástico
- Pipetas de vidrio de 230mm
- Eppendorfs 1.5mL
- Jeringa de 20 mL o 50 mL
- Agujas de palomilla o tipo mariposa
- Tapones para tubos de 50 mL
- Puntas P1000, P200 y P10
- Criotubos de 2 mL

1.3. Muestras

- Médula ósea, de preferencia en EDTA como anticoagulante o en su defecto en Heparina sódica.
- Sangre periférica en anticoagulante EDTA.

1.4. Protocolos

A) Médula ósea

- 1) Llenar con TLE un tubo de 50mL hasta 20-25 mL y traspasar la médula ósea (MO) con una pipeta Pasteur de plástico.
- 2) Lisar en agitador: 20 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Centrifugar: 580g, 10 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
- 4) Resuspender en PBS 1X según el tamaño del pellet (rango 1-3mL). Este será el Volumen total MO (V_T).
- 5) Hacer el recuento celular (Protocolo D).
- 6) Criopreservar (Protocolo F).

B) Sangre periférica – separación células mononucleadas de sangre periférica (SP-MC)

La proporción de los mL Ficoll / mL muestra / mL PBS 1X tiene que ser 1:1:1. Suponiendo que partimos de un volumen de 4 mL de SP:

- 1) Mezclar 4 mL de sangre con 4 mL de PBS 1X en un tubo con una pipeta Pasteur de plástico.
- 2) Poner 4 mL de Ficoll en un tubo de 15 mL. Añadir la sangre mezclada con el PBS 1X al tubo con una pipeta Pasteur de plástico o de vidrio de forma muy lenta de manera que queden dos fases.
- 3) Centrifugar: 810g, 20 minutos con el freno desactivado y a temperatura ambiente.

Al terminar se obtendrán diferentes fases: de arriba a abajo: plasma (amarillo), anillo blanquecino de SP-MC, solución transparente de Ficoll y al fondo el botón de eritrocitos y células polimorfonucleadas (rojo).

- 4) Recoger las SP-MC con una pipeta Pasteur de vidrio de 230 mm con algodón y pasarlas a un tubo nuevo de 50 mL. Llenar el tubo con PBS 1X y mezclar por inversión.
- 5) Centrifugar: 460g, 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Aspirar el sobrenadante con la bomba de vacío y una pipeta Pasteur de vidrio.
- 7) Resuspender en PBS 1X según la medida del pellet (1-5 mL). Éste será el volumen total SP-MC (V_T).
- 8) Hacer el recuento celular (Protocolo E).
- 9) Criopreservar (Protocolo F).

C) Separación de células polimorfonucleadas (SP-PMNC)

Se parte del tubo donde previamente se ha recogido el anillo de SP-MC:

- 1) Descartar el sobrenadante (plasma, Ficoll y posibles restos de plaquetas) con una pipeta Pasteur de plástico. Quedarse con el botón celular de SP-MC y eritrocitos.
- 2) Añadir PBS 1X en igual volumen (1:1) que el botón de células que hay en el tubo y resuspender hasta homogeneizar con una pipeta Pasteur de plástico. Recoger la mezcla y pasarla a una jeringa a la que previamente se ha sacado el émbolo y puesto un tapón.
- 3) Añadir el mismo volumen de dextrano 2% que el que hay de mezcla en la jeringa.
- 4) Poner el émbolo en la jeringa. Invertir dos o tres veces. Sacar el tapón y el aire de la jeringa con mucho cuidado.

- 5) Dejar sin mover, en vertical 30 minutos. Las SP-PMNC se separarán de los eritrocitos y quedarán en la parte superior, los eritrocitos, por sedimentación, quedarán en la fase inferior.
- 6) Preparar la mariposa: cortar la aguja (tirar al contenedor de material punzante) y por el otro extremo acoplar el tubo a la jeringa.
- 7) Recuperar la fase superior de la jeringa (subiendo el émbolo de la jeringa) en un tubo de 50 mL. Rellenar con PBS 1X para lavar.
- 8) Centrifugar: 580g, 10 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Aspirar con cuidado el sobrenadante con la bomba de vacío y una pipeta Pasteur de vidrio.
- 10) Resuspender en PBS 1X según el tamaño del pellet (1-5 mL). Este será el Volumen total SP-PMNC (VT).
- 11) Hacer el recuento celular (Protocolo E).
- 12) Criopreservar (Protocolo F).

D) Recuento celular con cámara de Neubauer

- 1) Partiendo del V_T de MO, hacer una dilución (si es necesario) con PBS 1X en un eppendorf: 1/10 (10 μ L + 90 μ L PBS), 1/25 (10 μ L + 240 μ L PBS), 1/50 (10 μ L + 490 μ L PBS). Se puede hacer la dilución que convenga. Apuntar el factor de dilución₁ (ejemplo: $FD_1= 10$ si la dilución hecha es una 1/10. Si la dilución es una 1/25, FD_1 es 25).
- 2) Mezclar 10 μ L de la muestra directa o diluida + 10 μ L de Trypan Blue (TB). Este será el FD_2 ($FD_2= 2$, porque es una dilución 1/2: 10 μ L muestra + 10 μ L TB).
- 3) Cámara de Neubauer: añadir 10 μ L (muestra + TB) en cada uno de los lados de la cámara de Neubauer.

El TB es un colorante para ensayos de viabilidad. Se incorpora a las células muertas y las tiñe de azul, mientras que las células vivas mantienen la viabilidad de la membrana y no dejan pasar el TB por lo cual se ven blancas.

- 4) Contar el número de células vivas en cada uno de los 4 cuadrantes de cada uno de los 2 lados de la cámara de Neubauer (en total 8 cuadrantes) (Figura I).

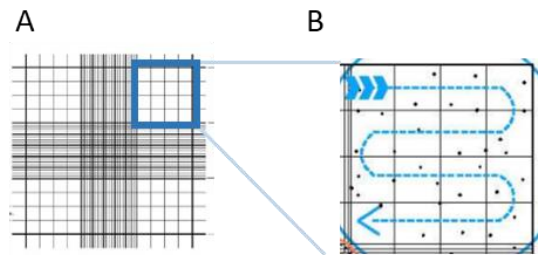


Figura I. Cámara de Neubauer. A) En un recuadro azul se señala uno de los cuatro cuadrantes (de uno de los lados de la cámara) a considerar para el recuento celular. B) Representación del patrón a seguir para el conteo de células en uno de los cuadrantes

- 5) Calcular la media de células por cuadrante (número total de células/8).
- 6) Partiendo del número de células por cuadrante, hacer el cálculo de la cantidad de células totales:

$$\text{Número de células/cuadrante} \times \text{FD}_2 \times \text{FD}_1 \times 10^4 \times V_T \text{ (mL)} = \text{número de células totales}$$

E) Recuento celular con el hemocitómetro (Auto Hematology Analyzer BC-3200, Mindray Medical International Limited)

- 1) Diluir una alícuota de 20 μL de la muestra con 700 μL de diluyente (lo hace la máquina).
- 2) Pasar la alícuota de células por el hemocitómetro (aspira 200 μL y hace el recuento).
- 3) La máquina muestra los millones de células totales por mL.
- 4) Hacer los cálculos pertinentes, teniendo en cuenta el volumen total de PBS 1X en el que se ha resuspendido las células.

$$\text{Número de células/mL} \times V_T \text{ (mL)} = \text{número de células totales}$$

F) Criopreservación celular

Se criopreserva a una concentración de 10×10^6 células/mL. Como el volumen máximo por criotubo es 1.8 mL, idealmente se criopreservarán 18×10^6 células/1.8 mL.

- 1) Centrifugar los V_T de MO, SP-MC y SP-PMNC durante 5 minutos a 460g a temperatura ambiente. Aspirar el sobrenadante con la bomba de vacío.

A partir del siguiente paso, se trabajará a 4°C (en hielo y reactivos en frío).

- 2) Una vez se tienen los *pellets* celulares, resuspender el pellet (MO, SP-MC, SP-PMNC) en el volumen correspondiente de FBS.
- 3) Repartir el volumen correspondiente de suspensión celular en los criotubos que sean necesarios con tal de seguir la concentración de 10×10^6 células/mL.

- 4) Añadir gota a gota el volumen correspondiente de medio de criopreservación a cada criotubo.
- 5) Rápidamente tapar los criotubos, invertir dos veces y colocar en la cubeta de hielo. Después colocar en el recipiente de congelación (Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo Fisher Scientific) previamente atemperado a 4°C y poner dentro del congelador a -80°C, para hacer la rampa de temperatura.
- 6) Una vez transcurridas 24 horas, traspasar los criotubos del recipiente de congelación a un tanque de nitrógeno líquido.

Anexo II: Presentación en congresos de los trabajos de esta tesis

Trabajo I

- **Acha P**, Martin R, Palomo L, Ganster C, Dierks S, Mallo M, Ademà V, Fuster-Tormo F, Gómez-Marzo P, De Haro N, Jiménez-García F, Solanes N, Zamora L, Xicoy B, Kominowski A, Stromburg M, Brockmann A, Trümper L, Solé F, Haase D. **Targeted Deep Sequencing of peripheral CD34+ cells can reproduce bone marrow molecular profile in MDS patients.** 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. 3-6 de Mayo de 2017. Valencia. [Poster]
- Martin R, Palomo L, Ganster C, **Acha P**, Dierks S, Mallo M, Adema V, Fuster-Tormo F, Gomez-Marzo P, De Haro N, Solanes N, Zamora L, Xicoy B, Kominowski A, Stromburg M, Brockmann A, Truemper L, Sole F, Haase D. In MDS **Targeted Deep Sequencing of CD34+ Blood Cells but Not Peripheral Blood Mononuclear Cells Give Results Which Are Representative for Bone Marrow.** Blood 128 (22). 58th American Society of Hematology Annual Meeting. 3-6 de Diciembre de 2016. San Diego [Poster]

Trabajo II

- **P. Acha**, L. Palomo, F. Fuster-Tormo, B. Xicoy, M. Mallo, P. Gómez-Marzo, N. de Haro, J. Grau, S. Marcé, L. Zamora, F. Solé. **Analysis of the intratumoral heterogeneity in myelodysplastic syndromes associated with del(5q) using a single cell approach.** 15th International Symposium on MDS. 8-11 Mayo de 2019. Copenhague. [Poster]
- Palomo L, **Acha P**, Fuster-Tormo F, Xicoy B, Derdak S, Mallo M, de Haro N, Gómez-Marzo P, Solanes N, Grau J, Marcé S, Zamora L, Solé F. **Estudio de la arquitectura clonal de un paciente con síndrome mielodisplásico 5q- mediante secuenciación del exoma y estudios de single cell.** LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. 26 – 28 Octubre de 2017. Málaga. [Poster]

Anexo III: Publicaciones elaboradas durante la realización de la tesis doctoral

1. Publicaciones como autora

- **Acha P**, Xandri M, Fuster-Tormo F, Palomo L, Xicoy B, Cabezón M, Marcé S, Granada I, Vela D, Sagüés M, Boque C, Plensa E, Pineda A, Feliu E, Solé F, Zamora L. **Diagnostic and prognostic contribution of targeted NGS in patients with triple-negative myeloproliferative neoplasms**. Am J Hematol. 2019 Oct;94(10):E264-E267.

2. Publicadas como colaboradora

- Palomo L, Ibáñez M, Abáigar M, Vázquez I, Álvarez S, Cabezón M, Tazón-Vega B, Rapado I, Fuster-Tormo F, Cervera J, Benito R, Larrayoz MJ, Cigudosa JC, Zamora L, Valcárcel D, Cedena MT, **Acha P**, Hernández-Sánchez JM, Fernández-Mercado M, Sanz G, Hernández-Rivas JM, Calasanz MJ, Solé F, Such E; Spanish Group of MDS (GESMD). **Spanish Guidelines for the use of targeted deep sequencing in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia**. Br J Haematol. 2020 Mar;188(5):605-622.
- Martin R, **Acha P**, Ganster C, Palomo L, Dierks S, Fuster-Tormo F, Mallo M, Ademà V, Gómez-Marzo P, De Haro N, Solanes N, Zamora L, Xicoy B, Shirneshan K, Flach J, Bräulke F, Schanz J, Kominowski A, Stromburg M, Brockmann A, Trümper L, Solé F, Haase D. **Targeted deep sequencing of CD34+ cells from peripheral blood can reproduce bone marrow molecular profile in myelodysplastic syndromes**. Am J Hematol. 2018 Jun;93(6):E152-E154.

