

Informe final publicable de proyecto

Implementación de la Secuenciación Masiva en el estudio de pacientes con citopenias persistentes

Código de proyecto ANII: FSS_X_2018_1_149692

24/05/2022

GRILLE MONTAUBAN, Sofia (Responsable Técnico - Científico)

BOADA BURUTARÁN, Matilde (Investigador)

CATALAN SCALDAFERRO, Ana Ines (Investigador)

IRIARTE ODINI, Andrés (Investigador)

LENS ROSSINI, Daniela (Investigador)

OTTATI BRASELLI, María Carolina (Investigador)

PAGNUSSAT RUSSO, Federico Alejandro (Investigador)

TRÍAS DE SOZA, Natalia (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \ \

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Resumen del proyecto

El diagnóstico y manejo de pacientes con citopenias persistentes (anemia, trombopenia y/o neutropenia) representa un gran desafío diagnóstico y un problema de salud. Una proporción mayoritaria de estos pacientes corresponden a Síndromes Mielodisplásicos (SMD) y el resto a citopenias de significado incierto con o sin hematopoyesis clonal. La evidencia actual muestra que el estudio de variantes génicas en pacientes con citopenias o SMD por secuenciación masiva (NGS) contribuye a mejorar el diagnóstico, a la estratificación pronóstica y en la decisión terapéutica. En este proyecto hemos diseñado y validado técnica y clínicamente un panel de NGS para el estudio de pacientes con neoplasias mieloides. Hemos implementado dicho estudio en el workflow diagnóstico de pacientes portadores de citopenias persistente y en SMD. Esto hace que el diagnóstico molecular de estas patologías, como lo realizábamos en forma tradicional (gen por gen), comience ser sustituido por la NGS que permite estudiar en forma simultánea múltiples genes y regiones génicas.

Desde el punto de vista clínico iniciamos la caracterización molecular completa de nuestra población de pacientes con citopenias de origen incierto y en pacientes con SMD. Los hallazgos encontrados hasta el momento fueron similares a los publicados en la literatura internacional.

En conclusión: contamos en nuestro país con una herramienta diagnóstica validada para el estudio de pacientes con neoplasias mieloides que permitirá conocer mejor el pronóstico, adecuar el tratamiento e identificar nuevos blancos terapéuticos.

Ciencias Médicas y de la Salud / Ciencias de la Salud / Ciencias y Servicios de Cuidado de la Salud / Hematología

Palabras clave: secuenciación masiva / hematopoyesis clonal / citopenias /

Introducción

La presencia de citopenias en sangre periférica (anemia, trombocitopenia y/o neutropenia) es un hecho común en adultos, especialmente en los añosos, pudiendo ser un hecho inconsecuente o corresponder a una enfermedad grave. Si bien frecuentemente se realiza diagnóstico con una adecuada historia clínica y exámenes básicos de laboratorio, en un elevado número de casos no se logra determinar la causa de la/s citopenia/s [1]. La presencia de citopenias no explicadas en un adulto son frecuentemente debidas a Síndromes Mielodisplásicos (SMD), pero en un elevado número de casos no se configura un SMD y adquieren otras denominaciones dependiendo de la presencia/ ausencia de hematopoyesis clonal. Para describir a los pacientes que tienen citopenias, mutaciones en genes que es sabido se asocian a neoplasias hematológicas (hematopoyesis clonal) o ambas y no constituyen o cumplen con los criterios diagnósticos de SMD se han utilizado numerosas terminologías: CHIP (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential), ICUS (Idopathic Cytopenia of Undetermined Significance, CCUS (Clonal Cytopenia of Undetermined Significance)[2], (definiciones en Tabla 1). Estas últimas entidades no han sido, por el momento, establecidas en la clasificación de neoplasias hematológicas de la Organización Mundial de la Salud (WHO) 2016 dado que no son consideradas claramente neoplasias y faltan datos para conocer verdaderamente su pronóstico y riesgo de progresión a SMD o a leucemia aguda mieloblástica (LAM)[2].

SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Los SMD constituyen un grupo de heterogéneo de hemopatías clonales caracterizadas por hematopoyesis ineficaz con citopenias en sangre periféricas y riesgo de progresión a LAM. Representan una de las neoplasias hematológicas más frecuentes en personas de edad avanzada, con una incidencia anual de 4-5/100.000 habitantes, con un gradual incremento con la edad[3]. Las manifestaciones clínicas de estos pacientes son derivadas de las citopenias que presentan (anemia, trombopenia, leucopenia), junto con las comorbilidades previas que se pueden ver agravadas por esta condición. El manejo terapéutico de los SMD es complejo debido, generalmente, a la edad relativamente avanzada de los pacientes, junto con comorbilidades no hematológicas, y a la relativa incapacidad de estos pacientes para ser tratados con regímenes quimioterápicos intensivos y trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH). Por todo esto, el mayor conocimiento de esta enfermedad, tanto del diagnóstico diferencial frente a otras situaciones no neoplásicas, como de los factores pronósticos, constituye un objetivo importante para poder afrontar el tratamiento de los pacientes de forma correcta, con un balance adecuado entre los beneficios aportados y los riesgos derivados del tratamiento.

El diagnóstico de los SMD resulta complejo. La sospecha diagnóstica se establece frente a un paciente que se presenta habitualmente con una o más citopenias inexplicadas. Frente a dicha sospecha se ponen en marcha una serie de

procedimientos diagnósticos con el fin de descartar diagnósticos diferenciales o causas reactivas de displasia. El diagnóstico se base principalmente en la presencia de citopenias persistentes, estudio morfológico y citogenético de médula ósea. En la tabla 2 se muestran los criterios diagnósticos mínimos de los SMD[4,5].

Clasificación y estratificación pronóstica: La historia natural de los SMD es muy variada, lo que refleja las diferencias existentes en la biología de los diferentes subtipos de SMD. Las clasificaciones patológicas descritas como la de la WHO-2016 son útiles para realizar el diagnóstico y la clasificación diagnóstica de la enfermedad, pero con muy limitada utilidad en realizar una estratificación pronóstica. Para esto se han publicado numerosas clasificaciones teniendo en cuenta variables como la edad, sexo, características morfológicas, porcentaje de blastos, presencia de citopenias, requerimiento transfusional y anormalidades citogenéticas. Las más utilizadas son el International Prognostic Scoring System (IPSS)[6] y el IPSS revisado (IPSS-R)[7], WHO Prognostic Scoring System[8] y MD Anderson Cancer Center MDS model[9]. Estos sistemas de clasificación son fundamentales para determinar la orientación terapéutica en los pacientes. A pesar de estas clasificaciones morfológicas e índices pronósticos, el diagnóstico de SMD sigue constituyendo un reto en una proporción no despreciable de pacientes, más si consideramos que las alteraciones citogenéticas solo están presentes en un 30-50% de los SMD de novo y la morfología (estudio con elevada variabilidad interobservador) se queda muchas veces como única herramienta para establecer un diagnóstico de tanta relevancia clínica y pronóstica, como son los SMD.

Con las nuevas técnicas de NGS se ha logrado detectar la presencia de mutaciones somáticas (en más de 50 genes) en alrededor de 80-90% de los pacientes [10,11]. Los genes más frecuentemente mutados en los SMD, pueden agruparse en distintas vías funcionales: metilación ADN, factores de transcripción, procesamiento del ARN, modificadores de cromatina, citoquinas de señalización, entre otras (tabla 3)[12]. Aun así, y a diferencia de otras neoplasias hematológicas (como por ejemplo, en las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas (NMP) con mutaciones conocidas en los genes JAK2, CALR y MPL) no hay ninguna mutación que sea dominante y específica de los SMD por lo que la detección de mutaciones en estos genes (hematopoyesis clonal) no puede ser interpretado como diagnóstico de SMD ya que hay otras situaciones que presentan dichas mutaciones en ausencia de SMD (se detalla más adelante). La presencia de hematopoyesis clonal tiene valor fundamentalmente en la estratificación pronóstica y para realizar una terapia adaptada al riesgo. Numerosos estudios han demostrado el pronóstico independiente de las mutaciones en genes recurrentes así como mutaciones que actúan como biomarcadores de respuesta a tratamientos específicos [13–15]. Todos estos nuevos datos genéticos están cambiando la comprensión patogénica de los SMD y su manejo terapéutico. Hoy el día el tratamiento de los SMD está ligado a una adecuada estratificación de riesgo. Los pacientes que tienen un bajo riesgo se tratan con factores de crecimiento y soporte transfusional, mientras que los con enfermedad de alto riesgo se tratan con fármacos hipometilantes (de alto costo) y/o alo-TPH. Una estratificación pronóstica errónea puede conducir a subtratar con las consecuencias en calidad de vida y supervivencia que esto puede tener o a sobretratar con tratamientos muchas veces excesivamente tóxicos. La importancia de la detección de estas mutaciones es que permite realizar una estratificación pronóstica más fina y por tanto un tratamiento mejor adaptado a cada paciente. A futuro permitirá elegir fármacos dirigidos a diferentes blancos terapéuticos (medicina personalizada)[16].

Es por lo anteriormente expuesto que en este proyecto se planteó como objetivo estudiar por NGS de un panel de genes mieloides que permita establecer la presencia de hematopoyesis clonal y evaluar su posible rol en el diagnóstico y estratificación pronóstica de pacientes con SMD.

HEMATOPOYESIS CLONAL Y CONDICIONES RELACIONADAS NO-SMD

Como fue mencionado, numerosos pacientes con citopenias inexplicadas que no cumplen criterios diagnósticos de SMD quedan sin diagnóstico y sin evidencia clara a cerca de su pronóstico. Varios estudios han demostrado la presencia de mutaciones somáticas en sangre periférica de individuos asintomáticos. El hallazgo de las mismas se incrementa con la edad, siendo la hematopoyesis clonal para personas mayores de 75 años alrededor del 15%. Los genes mutados son los mismos que los encontrados en los SMD, pero con una frecuencia alélica diferente. Las mutaciones DNMT3A, TET2 y ASXL1 son las más frecuentes. También se observan frecuentemente las mutaciones de TP53, SF3B1, SRSF2, JAK2 y CBL, pero con menor frecuencia[2,17]. El riesgo relativo de desarrollar una neoplasia hematológica se ve incrementado en estos individuos portadores de hematopoyesis clonal. Se ha estimado que el riesgo de progresión a SMD de los individuos con CHIP es de 0.5-1% por año y ocurre sobre todo en aquellos con una frecuencia alélica de las mutaciones superior a 20%. Un estudio que incluyó pacientes con citopenias que no configuraban un SMD, 40% tenían hematopoyesis clonal por lo que se definían como CCUS. Hoy en día se conoce poco a cerca de la historia natural de los ICUS y CCUS, la tasa de progresión a neoplasia mieloides u otra neoplasia. Malcovati et al, realizaron un estudio prospectivo que incluyó 683 pacientes con

citopenias idiopáticas y 190 pacientes en los que se sospechaba una neoplasia mieloides. 435/683 pacientes tenían al menos 1 mutación en genes mieloides. La presencia de 1 o más mutaciones somáticas se asoció con mayor riesgo de desarrollar una neoplasia mieloides en el seguimiento con un HR de 13.9 ($p=0,001$). Si bien estos hallazgos deben ser validados, los hallazgos sugieren que el análisis mutacional podría mejorar el diagnóstico de las citopenias inexplicadas y el diagnóstico de las neoplasias mieloides[18]. Nuestro proyecto apuntó a estudiar la presencia de hematopoyesis clonal en esta población de pacientes. Se pretendía conocer el tipo y frecuencia de mutaciones, así como el riesgo de progresión a SMD y LAM de los diferentes tipos de pacientes y mutaciones halladas.

La NGS es una técnica accesible, con un costo relativamente bajo, robusta, con alta sensibilidad, y que permite la detección en simultáneo de múltiples genes y hotspots lo que está determinando su introducción en el diagnóstico clínico sustituyendo el abordaje “gen por gen” tradicional. En las neoplasias mieloides y específicamente en los SMD, así como en el estudio de pacientes con citopenias permite de una manera relativamente sencilla poder determinar la presencia de hematopoyesis clonal y a su vez evaluar la presencia de mutaciones relacionadas con mal pronóstico. Uno de las dificultades de la NGS es tener un panel validado no solo técnicamente sino clínicamente para poder ser aplicado y obtener resultados confiables. Para ello se han publicado guías que facilitan el proceso de validación tanto de la secuenciación como del análisis bioinformático[19–21].

No estaba implementado en Uruguay un sistema de detección de mutaciones mieloides basado en tecnologías de NGS para el identificar hematopoyesis clonal. Tampoco se han realizado estudios de costo-efectividad de la aplicación de NGS en SMD, hecho que consideramos muy relevante de realizar en nuestro medio.

Nos propusimos que al finalizar este proyecto contaríamos con una nueva herramienta diagnóstica de biología molecular (NGS) validada técnica y clínicamente para ser aplicada en el algoritmo diagnóstico-pronóstico de pacientes con citopenias persistentes y SMD. Esta estrategia diagnóstica permitirá reemplazar los estudios realizados por las técnicas actuales de biología molecular en forma de “gen por gen”.

Adicionalmente, esta técnica no solo estará disponible para el estudio de estos pacientes sino que se podrá utilizar en otras neoplasias mieloides como son las LAM y NMP. Por otro lado, nuestro laboratorio adquirirá conocimiento en esta tecnología y estará en condiciones de poder aplicar la misma en otras áreas diagnósticas de la hemato-oncología como por ejemplos las neoplasias linfoides, el estudio de la enfermedad mínima residual, entre otras.

Metodología/diseño del estudio

El presente proyecto tuvo 4 fases claramente definidas:

1. Diseño de un panel de genes mieloides para identificar hematopoyesis clonal y estandarización del procedimiento de NGS;
2. Validación técnica y clínica del panel de genes seleccionados;
3. Evaluación la utilidad clínica del estudio de la hematopoyesis clonal en pacientes portadores de citopenias persistentes;
4. estudio de costo-efectividad de esta estrategia diagnóstico-pronóstica

1) Diseño de un panel de genes mieloides para identificar hematopoyesis clonal y estandarización del procedimiento de NGS

Diseñamos un panel de NGS para neoplasias mieloides que incluye 46 genes. Se seleccionaron los genes más relevantes y frecuentemente observados en las neoplasias mieloides (tabla 3). En algunos se incluyó el gen completo y en otros solo las regiones hotspot que han sido descritas en la literatura. Tiene un tamaño de 140kb. Se diseñaron sondas de capturas de 150pb. El panel fue diseñado de manera que permite detectar variantes de nucleótido único (single nucleotide variants; SNV), pequeñas inserciones y deleciones (indels) con alta profundidad de cobertura ya que lo que se pretenden buscar son mutaciones somáticas. Para el diseño del panel hemos contado con la colaboración del Dr. Rafel Bejar de Moores Cancer Research-San Diego que lo hemos realizado a través de reuniones virtuales debido a la pandemia. Al inicio del proyecto estaba planeado una pasantía por miembros de nuestro equipo que no se pudo realizar por la pandemia. Planeamos realizar esa pasantía en el próximo año con fondos de CSIC.

2) Validación del panel de genes seleccionados

Se estandarizó un método de preparación de librerías habiendo realizado diferentes modificaciones al protocolo para optimizarlo. Brevemente, para el estudio de hemopatías de origen mieloides se extrae DNA de muestras de aspirado de médula ósea y en algunos casos sangre periférica. Se utiliza para la extracción el kit QIAmp DNA Micro/Mini Kit (Qiagen) que nos permitió contar con una buena calidad de DNA de partida. Se evaluó la integridad del DNA en el equipo Qsep1 (electroforesis capilar), se cuantifica utilizando Qubit y la pureza se mide en Nanodrop exigiendo ratios 260/280 y pureza ~1.8, y ratio 260/230 ~2.0-2.2. Se realizó la librería utilizando sondas de agilent diseñadas por nosotros y el kit de

preparación de librerías SureSelectXT con algunas modificaciones. Al finalizar se cuantifica la librería y se corre en el equipo de Illumina Miseq disponible en el Depto. Básico de Medicina. Con nuestro protocolo logramos buenos parámetros de secuenciado:

-Profundidad de cobertura mínima: las regiones de interés $\geq 90\%$ de las bases detectadas estén cubiertas por un mínimo de 100 lecturas ($>100X$). Este es el punto de corte que utilizamos dar una muestra como válida para poder proceder con el análisis.

-Profundidad de cobertura media: es el valor mínimo de lecturas promedio de las regiones secuenciadas para cada muestra. Obtenemos una profundidad de cobertura media $\geq 1000X$. Para detección de variantes somáticas con una profundidad de 1000 lecturas por muestra (1000X) alcanzamos una sensibilidad media del 2,5%, lo cual es lo recomendado por las guías internacionales.

-Porcentaje de lecturas mapeadas correctamente: El porcentaje mapeado correctamente en nuestro panel (on-target) ha sido mejorado siendo de aprox 60%.

-Escala de calidad Phred: Q30 mayor a 99%.

Con estos parámetros de secuenciación nos permite correr 16 pacientes por corrida en un cartucho standard de Illumina. Se realizó un pipeline bioinformático y se realizó un script de forma de poder automatizar lo más posible el análisis de las variantes ya que es un proceso que consume mucho tiempo. En la figura 1 se esquematiza el pipeline bioinformático utilizado.

Para cada una de las variantes detectadas con el pipeline diseñado se estima la frecuencia de aparición, derivada de la frecuencia de los reads obtenidos para ese marcador. La categorización de una variante en el momento del diagnóstico estará basada en los registros de las bases de datos (ClinVar, COSMIC, IARC TP53, Varsome) y en la literatura disponible. También se definió utilizar algoritmos de predicción que estiman la probabilidad de que una variante, en un determinado gen, tenga consecuencias deletéreas para la proteína codificada. Utilizamos los siguientes softwares: PolyPhen2, SIFT, Mutation Taster y PROVEAN. Se interpretan y categorizan las variantes que superen los criterios de calidad (reflejados en el apartado de filtrado de variantes) y que cumplan las siguientes condiciones: $MAF < 1\%$ (MAF, frecuencia del alelo menor), $VAF > 10\%$ (VAF, frecuencia del alelo variante), profundidad mínima de 25 lecturas del alelo alternativo.

Se validó técnicamente la librería realizada. Para esta validación se seleccionaron en total 10 muestras. Algunas muestras de control (con cariotipo normal conocido) y otras con mutaciones conocidas en genes presentes en el panel. Se evaluó la profundidad de cobertura para las distintas regiones estudiadas, la uniformidad de cobertura, GC bias y calidad de secuenciación a través de la utilización de escalas (mostrado más arriba). Además, se evaluó la repetibilidad (variabilidad intra-run) y la reproducibilidad (variabilidad inter-run) con muy buenos resultados (superior a 95%). Se testeó el límite de detección que fue de 2,5%.

Para la validación se seleccionaron muestras de pacientes con SMD con variantes genéticas conocidas que ya fueron caracterizados molecularmente por técnicas convencionales de biología molecular. Se eligieron variantes con cambios puntuales, pequeñas deleciones, duplicaciones y variantes en CEBPA que es un gen rico en GC. Se ha observado una buena correlación. Con el panel de NGS se han visto todas las alteraciones observadas con técnicas convencionales. Se detectaron nuevas alteraciones que pasaron inadvertidas por los métodos convencionales probablemente debido a la menor sensibilidad de éstas últimas. Hemos confirmado algunas de dichas variantes por PCR-secuenciación Sanger.

3) Evaluación de la utilidad clínica del estudio de la hematopoyesis clonal en pacientes portadores de citopenias.

Nos planteamos evaluar la utilidad clínica del panel de NGS previamente validado en el algoritmo diagnóstico y pronóstico de pacientes con citopenias. Se planteó incluir 50 pacientes con citopenias persistentes a los cuales se les haya descartado causas carenciales y periféricas. Todos los pacientes incluidos en el estudio estaban estudiados con los exámenes de rutina que requieren estos pacientes, mielograma con tinción de perls, biopsia de médula ósea y estudio citogenético convencional y FISH. Dentro de estos pacientes se incluyó un grupo de pacientes portadores de SMD u otras neoplasias mieloides relacionadas y otro con citopenias de significado incierto. El diagnóstico de los pacientes con SMD se realizó siguiendo los criterios diagnóstico antes mencionado (tabla 2) y se clasificarán y estratificará su pronóstico según la clasificación de la WHO 2016 y los scores pronósticos IPSS y R-IPSS[6,7]. Los datos clínicos y de laboratorio fueron recolectados en una planilla de recolección de datos previamente confeccionada. En la misma se incluyeron todos los datos que permiten asegurar el diagnóstico, factores pronósticos (citopenias, profundidad, requerimiento transfusional, tratamientos recibidos, porcentaje de blastos, scores pronósticos, etc), supervivencia, transformación a LA, entre otros. En el momento de estudiar la médula ósea para realizar las técnicas diagnósticas requeridas para el diagnóstico se tomó una muestra para extracción de ADN y luego se criopreservó a $-80^{\circ}C$ para su posterior estudio molecular.

Los pacientes fueron captados y seguidos clínicamente de la Unidad de Síndromes Mielodisplásicos y Leucemias Agudas del Hospital de Clínicas y del el Servicio de Hematología del Hospital Maciel. A todos los pacientes incluidos se les realizó el

estudio del panel de genes de NGS previamente estandarizado y validado

4) Estudio de costo-efectividad de la nueva estrategia diagnóstico-pronóstica

Finalmente, se realizó un estudio de costo-beneficio de la NGS en los pacientes con citopenias y se analizó cómo esta información es capaz de mejorar el diagnóstico, la clasificación de la enfermedad y la estratificación pronóstica. Para ello se midió el ratio incremental de costo-efectividad (ICER).

Resultados, análisis y discusión

Los resultados a cerca del diseño y validación del panel de NGS fueron descritos en métodos.

Para la evaluación clínica inicialmente se incluyeron 57 pacientes con neoplasias mieloides o citopenias de origen desconocido (persistente) de los cuales se excluyeron 10 para el estudio de NGS por no haber logrado un ADN con calidad necesaria para realizar los estudios de NGS o no contar con datos clínicos completos. Se analizaron finalmente 47 pacientes. De estos 9 pacientes son pacientes con citopenias persistentes, 32 SMD o SMD/NMPC y 6 Leucemias Agudas Mieloides (de novo o secundarias). La mediana de edad fue de 69 años (24-90). La relación mujer/hombre fue 1,5:1.

Dentro de los 9 pacientes con citopenias persistentes, 4 (44.4%) presentaban hematopoyesis clonal por lo que se los definía como CCUS y al resto ICUS. De ellos en los plazos de seguimiento (mediana 12 meses) ninguno ha progresado profundizando las citopenia sin haber desarrollado SMD o LAM. 1 paciente presentaba 3 variantes (2 patogénicas en SF3B1 y TET2 y una variante de significado incierto (VUS) en TP53), los otros 3 pacientes presentaron una única variante en los siguientes genes: SMC1A, TET2 y ASXL1.

Respecto a la población de SMD-SMD/NMPC, la clínica más frecuente 56.3% fue la presencia de más de una citopenia, seguido por anemia aislada 25%, neutropenia 9.4%, y 9.3% trombocitopenia. Además 6.25% (n=2) pacientes se presentaron con monocitosis.

Un 93.7% corresponden a SMD de novo y un 6.25% a SMD secundarios. De acuerdo a la clasificación de la OMS del 2016: un 56.3% corresponden a SMD con displasia multilinea, 18.7% SMD con displasia unilinea, 21.9% SMD con exceso de blastos, 3.1% SMD 5q-. Sobre los grupos pronósticos según R-IPSS 12.5% muy bajo riesgo, 28.1% bajo riesgo, 46.8% riesgo intermedio, 9.4% alto riesgo y 3.12 muy alto riesgo.

En relación a los tratamientos realizados: 25% de los pacientes presentaron indicación de control y seguimiento (W&W), 53.1% se trataron con factores de crecimiento (eritropoyetina o G-CSF), 15.6% con Hipometilantes (el 100% de ellos azacitidina), 3.12% Poli quimioterapia y 3.12% Lenalidomida (correspondiendo este al caso de del5q-). En ninguno de los pacientes se realizó tratamiento quelante del hierro ya que no tenemos disponibilidad por no existir cobertura en nuestro país.

Con respecto a pacientes con SMD-SMD/NMPC 71.8% presentaba al menos una variante patogénica o probablemente patogénica y 28.2% ninguna.

En las figura 2, 3 y 4 se muestran las frecuencias de variantes patogénicas o potencialmente patogénicas en este grupo de pacientes y el tipo de variantes génicas halladas.

Si agrupamos los genes estudiados según la función celular en la que participan, se acumularon mas variantes genes implicados en el splicing de RNA y metilación de ADN de forma similar a como está descrito en la literatura (figura 4).

En la figura 5 se muestran las variantes distribuidas por grupo de riesgo según R-IPSS pero se clasifican en 2 grupos bajo y alto según tengan un R-IPSS ? a 3.5 o mayor 3.5.

No resultó infrecuente encontrar más de una variante en un mismo gen, sobre todo, en genes de gran tamaño como TET2.

Con respecto a la frecuencia alélica se tomó como patogénica una frecuencia alélica mayor a 10% según lo recomendado en la literatura. No se observó asociación entre carga alélica y grupo de riesgo. Se destaca que el n de pacientes estudiados es bajo.

Investigamos las relaciones entre variables clínicas (edad, sexo, diagnóstico OMS, porcentaje de blastos en medula ósea, niveles de hemoglobina, plaquetas y leucocitos al diagnóstico, riesgo citogenético e índice pronóstico internacional revisado) y la presencia de variantes génicas patogénicas en estos genes relacionados con la patología mielode. Dado el escasos número de pacientes evaluados fue difícil poder hallar una asociación pero se observaron las tendencias descritas en la literatura como es la presencia de variantes en SF3B1 en pacientes da bajo riesgo sin exceso de blastos y variantes en TP53 en pacientes de alto riesgo con exceso de blastos qué rápidamente progresaron a LAM. Asimismo, los pacientes con más de 1 mutación tenían un perfil de mayor riesgo. Con la inclusión de mas pacientes se podrá obtener resultados mas confiables.

De los pacientes con Leucemia Aguda, en nuestra pequeña muestra (n=6), todos presentaron al menos una variante. 4

pacientes presentaban más de 2 variantes y 2 solo una variante. De las variantes halladas encontramos en los siguientes genes: FLT3-ITD, RUNX1, NPM1, DNMT3A, WT1, EZH2, IDH2, NRAS, SRSF2. La VAF en estas variantes fue mayor a la observada en SMD.

Estudio de costo-efectividad de la herramienta diagnóstica en SMD

Para el estudio de costo-efectividad se utilizaron los pacientes con SMD-SMD/NMPC por tratarse un grupo de pacientes más homogéneos y en los que se puede definir mejor la efectividad de la herramienta diagnóstica.

Para la medición de los costos del estudio de NGS por paciente estudiado se realizó calculando los costos directos, dejando fuera los costos indirectos (entendiéndose costos derivados de mantenimiento laboratorio, los servicios y el soporte administrativo, etc) ya que ellos en un hospital universitario y servicio con múltiples funciones (docencia, investigación y diagnóstico) como el nuestro es difícil de estimar. El costo por test del estudio es de 673 USD.

Para determinar la efectividad de la herramienta se definió con hechos objetivos y que impacten directamente en el manejo terapéutico ya sea porque se decidiría una terapéutica diferentes por el riesgo de SMD que presenta o porque se identifica un blanco terapéutico. En 6 pacientes (18,75%) de los casos el estudio de NGS se mostró efectivo.

Para el calculo de la costo-efectividad se utilizó el cálculo de la relación costo-efectividad incremental (ICER) entre realizar estudio de SMD sin incorporar estudios moleculares y con estudio de nuestro panel de NGS. Se calcula dividiendo la diferencia entre el costo de abordaje previo y actual sobre la diferencia entre el efecto de la intervención previa y actual. $ICER=35.8$ Por lo que con 35.8 USD se genera un cambio terapéutico en el paciente.

Con la inclusión de mas pacientes en estudio se realizará una determinación mas ajustada donde la efectividad se determine por QUALY (quality-adjusted life-year) y LYG (life-year gained)

Conclusiones y recomendaciones

El principal aporte de este proyecto fue que permitió poner a punto y validar un panel de genes mieloides por NGS que esta ya siendo incluido en el workflow diagnóstico de pacientes con citopenias y otras neoplasias mieloides que no se presentan como citopenias. Además, permitió al grupo de investigación iniciar nuestra formación en la técnica de NGS y en el diagnóstico clínico. Todo esto hace que el diagnóstico molecular de estas patologías como lo realizábamos en forma tradicional (gen por gen) comience ser sustituido por la NGS que permite estudiar en forma simultánea múltiples genes y regiones génicas.

El conocimiento adquirido permitirá incorpora esta tecnología en el diagnóstico de otras patologías como son los síndromes linfoproliferativos.

Desde el punto de vista clínico iniciamos la caracterización molecular completa de nuestra población de pacientes con citopenias de origen incierto y en pacientes con SMD. Los hallazgos encontrados fueron similares a los publicados en la literatura internacional.

Realizamos una primera aproximación en el estudio de costo-efectividad de la herramienta. Pretendemos a futuro realizar un estudio que incluya datos de calidad de vida y sobrevida.

Contar con un panel y sistema de NGS para neoplasias mieloides validado nos ha permitido a integrar un grupo de estudios de mutaciones en Síndromes Mielodisplásicos en Latinoamérica. A inicio de 2021 se ha iniciado un trabajo multicéntrico donde participan distintos centros de Brasil, Argentina, Chile y nosotros en Uruguay en el marco del Grupo Latinoamericano de Mielodisplasia (GLAM), el cual actualmente presido. Dicho trabajo tiene como objetivo conocer el tipo y frecuencia de mutaciones en pacientes con SMD en Latinoamérica. La pandemia en nuestros países ha retrasado la ejecución de este proyecto, pero hemos actualmente lo estamos llevando a cabo tratando de incluir un mayor número de países de Latinoamérica.

Referencias bibliográficas

- 1 Valent P. Low blood counts: immune mediated, idiopathic, or myelodysplasia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2012;2012:485–91.
- 2 Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia.* 2017 DOI: 10.1038/leu.2017.181
- 3 Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res.* 2011 Dec;35(12):1591–6.
- 4 Killick SB, Carter C, Culligan D, Dalley C, Das-Gupta E, Drummond M, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2014 Feb;164(4):503–25.
- 5 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 Jun;31(6):727–36.
- 6 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 Mar [cited 2018 Apr 28]. ;89(6):2079–88.
- 7 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 Sep;120(12):2454–65.
- 8 Malcovati L, Porta MG Della, 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.* 2005 Oct;23(30):7594–603.
- 9 Komrokji RS, Corrales-Yepez M, Al Ali N, Kharfan-Dabaja M, Padron E, Fields T, et al. Validation of the MD Anderson Prognostic Risk Model for patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer.* 2012 May;118(10):2659–64.
- 10 Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2013 Sep;162(5):587–605.
- 11 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 Nov;122(22):3616–27.
- 12 Bejar R. Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing? 2015 DOI: 10.1007/s11899-015-0270-5
- 13 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 DOI: 10.1200/JCO.2013.52.3381
- 14 Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia.* 2011 Jul;25(7):1147–52.
- 15 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 DOI: 10.1182/blood-2015-03-631747
- 16 Bejar R. Implications of molecular genetic diversity in myelodysplastic syndromes. *Curr Opin Hematol.* 2017;24:73–38.
- 17 Jain M, Tripathi A. ICUS/CCUS/CHIP: basics & beyond. *Expert Rev Hematol.* 2017 Oct;10(10):915–20.
- 18 Malcovati L, Galli A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood.* 2017 Apr;129(25):3371–8.
- 19 Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. *J Mol Diagnostics.* 2017 Jan;19(1):4–23.
- 20 Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, et al. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2018 Jan;20(1):4–27.
- 21 Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels. *J Mol Diagnostics.* 2017 May;19(3):341–65.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)