

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

“DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES *SF3B1* Y *U2AF1*, MIEMBROS DE LA MAQUINARIA DE CORTE Y EMPALME, EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO”

Rocca, Gabriela Sofia – LU: 1043730

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Dra. Belli, Carolina; Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Consejo
Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) –
Academia Nacional de Medicina**

Co-Tutor:

Dra. Girotti, Romina; Universidad Argentina de la Empresa

09/03/2020



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Carolina Belli, por confiar en mí y haberme dado la oportunidad de trabajar con su equipo. Siempre me apoyó y estuvo dispuesta a ayudarme en cada paso de la experiencia. Me enseñó a confiar en mi misma y promovió mi crecimiento no sólo como profesional sino como persona. Aprendí a cuestionar, investigar, disfrutar del proceso y a que la perseverancia lleva a buenos puertos. Finalmente, me contagió su amor por la genética hematológica y estoy completamente agradecida por eso.

Al Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET)/ Academia Nacional de Medicina, particularmente al Laboratorio de Genética Hematológica por brindarme todo el equipamiento y los insumos necesarios para el cumplimiento del presente trabajo. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica y al CONICET por aportar los fondos necesarios.

A mis compañeras de laboratorio, Camila Serale, María Fernanda Camacho, Carla y Jazmín, por responder todas mis consultas y hacerme reír. Sin ellas, no habría disfrutado tanto ir al laboratorio.

A la Universidad Argentina de la Empresa, en especial al director de carrera Dr. Federico Prada y mi co-tutora, la Dra. Romina Girotti, por ser excelentes profesores y estar para responder todas mis dudas a lo largo de la creación de este manuscrito y la carrera de Biotecnología.

A mi padres Raúl y Mónica por haberme regalado el primer microscopio cuando tenía 6 años y así plantado en mí la semillita del amor por la ciencia. Ellos me acompañaron en cada paso del camino, confiando ciegamente en todas mis decisiones y mi carrera universitaria se la debo prácticamente a ellos.

A mis hermanas, Johanna y Agustina, por ser mis mejores amigas y por estar siempre cuando las necesité.

A Ari, quien empezó como mi novio y se convirtió en mi marido durante este proceso, por su paciencia y por ayudarme a alcanzar todas mis metas.

A mi fiel amigo Milo, por ser mi acompañante incondicional desde el comienzo de mis días viviendo en Argentina.

¡Mil gracias, me llevo hermosos recuerdos!

RESUMEN

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) comprenden un grupo heterogéneo de patologías hematológicas caracterizado por una hematopoyesis inefectiva que comprometen, al menos, a una de las líneas hematopoyéticas mieloides, resultando en la presencia de citopenia(s) en sangre periférica (SP) con o sin progresión a leucemia mieloide aguda. Estos pacientes suelen presentar variantes en genes pertenecientes a diversas vías biológicas, entre ellas, se destacan aquellas que afectan a los miembros de la maquinaria de corte y empalme. En particular, *SF3B1*, *U2AF1* y *SRSF2*, se encuentran alterados en alrededor del 50% de los pacientes y se caracterizan por ser mutuamente excluyentes entre sí. Por su parte, el *SF3B1* fue incluido en el algoritmo de clasificación propuesto por la Organización Mundial de la Salud en 2016 debido al impacto distintivo en el fenotipo caracterizado por la presencia de sideroblastos en anillo. Además, a fines de 2019, los resultados del ensayo clínico en fase 3 del Luspatercept, el cual demostró una mejor tasa de respuesta en este subgrupo de pacientes, fueron elevados a la Administración de Alimentos y Medicamentos americana para su consideración. Por consiguiente, la detección de variantes en estos componentes es de particular interés ya que presentan un propósito en el diagnóstico, el pronóstico y la selección de tratamientos.

Actualmente, en nuestro medio y a nivel regional, existe información limitada sobre los cambios genéticos presentes en los componentes de la maquinaria y, por ello, el objetivo principal del presente trabajo consistió en detectar variantes en los exones calientes de *SF3B1* y *U2AF1* en pacientes con SMD. Para lo cual, los objetivos específicos fueron: 1) poner a punto técnicas de tamizaje para la detección de variantes, 2) generar controles positivos de las mutaciones más frecuentes en *SF3B1* y *U2AF1* mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, 3) seleccionar la población de pacientes con SMD a estudiar, 4) detectar las variantes en la población seleccionada y 5) evaluar e interpretar los resultados obtenidos.

En total se estudiaron 55 pacientes *SRSF2*- con diagnóstico de SMD. Se empleó la técnica SSCP-PCR para realizar la pesquisa de variantes en *SF3B1* (exón 15) y *U2AF1* (exones 2 y 6), y posterior confirmación mediante secuenciación automática según Sanger. Esta última técnica se utilizó, además, para analizar el exón 14 del *SF3B1*. La caracterización de los hallazgos se llevó a cabo aplicando diversos algoritmos accesibles en línea y consultando múltiples bases de datos. La asociación con parámetros clínicos se evaluó aplicando test de T,

Mann Whitney, o realizando curvas de sobrevida según Kaplan-Meier (Log-rank). El nivel de significación de estadística se estableció en $p < 0,05$.

Un 27,5% (14/51 *SRSF2/U2AF1*-) de los pacientes evidenciaron ser portadores de variantes en *SF3B1*. Se distribuyeron de manera equitativa entre los exones estudiados y la gran mayoría ya habían sido reportadas previamente con un carácter patogénico. El cambio más frecuente, detectado en 5 pacientes, coincidió con el codón caliente p.K700E. Tres de los cambios nucleotídicos correspondientes a las sustituciones p.M620I, p.V635E y p.A713G fueron nóveles y 2 de ellas evidenciaron un carácter probablemente patogénico. La única variante sinónima encontrada (p. R702R), comprometería a su propio *splicing*.

Por otra parte, se detectaron 4 de 41 pacientes *SF3B1/SRSF2*- con variantes en *U2AF1*, conformando una frecuencia del 9,8%. Uno de ellos presentó la sustitución p.S34F, la cual pertenece al *hot-spot* de mutaciones y fue identificada como patogénica. La variante p.F150I, previamente descripta sólo en carcinoma de hígado, fue encontrada en 2 de los individuos e interpretada como posiblemente patogénica. Las variantes sinónimas p.C33C y p.P146P tendrían consecuencias perjudiciales en el propio *splicing*.

La comparación de los parámetros clínicos entre los pacientes *SF3B1*+ vs aquellos *U2AF1/SRSF2*+ sugieren que las variaciones en *SF3B1* se asocian de manera significativa a un menor nivel de hemoglobina en población de bajo riesgo, un menor porcentaje de blastos en médula ósea y una mayor sobrevida global con respecto a aquellos pacientes *U2AF1/SRSF2*+. Además, mostraron tendencia a una sobrevida libre de leucemia más prolongada.

Este es el primer estudio en evaluar la presencia de variantes en *SF3B1* y *U2AF1* en pacientes argentinos con SMD. Los resultados obtenidos, además de mostrar sustituciones nucleotídicas previamente reportadas en la patología, evidencian la existencia de variantes nóveles y diferencias clínicas distintivas entre los grupos afectados, contribuyendo a la heterogeneidad de la enfermedad. Estos hallazgos colaboran con el entendimiento de los SMD aportando a la identificación de eventos tempranos, al diagnóstico y al pronóstico de los pacientes de nuestra población.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) encompass a heterogeneous group of hematological pathologies characterized by an ineffective hematopoiesis leading to peripheral citopenias of one or more lineages, with or without transformation to acute myeloid leukemia. Patients with this disease commonly exhibit variants in multiple genes involved in diverse biological pathways, especially in those that encode members of the splicing complex. Particularly, *SF3B1*, *U2AF1*, and *SRSF2* are altered in 50% of patients and are mutually exclusive. In 2016, *SF3B1* was included in the classification algorithm proposed by the World Health Organization due to its distinctive phenotype characterized by the presence of ring sideroblasts. In addition, the results of a phase 3 Luspatercept clinical trial, showing a better response rate in this subgroup of patients, were submitted to the Food and Drug Administration for consideration at the end of 2019. Therefore, variant detection in these components hold great importance in diagnosis, prognosis and treatment selection.

Due to the limited information available regarding genetic alterations in splicing factors in our field and at a regional level, the main objective of this project is to detect variants in hot spot regions of *SF3B1* and *U2AF1* in MDS patients. In order to do so, we established the following specific objectives: 1) develop screening techniques for variant detection, 2) utilize oligonucleotide-directed mutagenesis to generate positive controls for the most frequent variants present in *SF3B1* and *U2AF1*, 3) select the MDS population to analyze, 4) detect variants in the selected individuals and 5) evaluate and interpret the results.

A total of 55 *SRSF2*- patients with MDS were randomly selected to be part of this study. We opted for PCR-SSCP as our screening method for variant detection in *SF3B1* (exon 15) and *U2AF1* (exon 2 and 6) and later confirmed the results by automated Sanger DNA sequencing. The latter method was also used in the evaluation of exon 14 of *SF3B1*. Different databases and multiple online algorithms were consulted in order to characterize our findings. The association to clinical parameters and overall survival was evaluated using the t-test, Mann-Whitney and Kaplan-Meier survival curves (Log-rank test) as required. The results considered statistically significant were those with a p-value less than 0.05.

This study showed that 27.5% (14/51 *SRSF2/U2AF1*-) of patients presented genetic alterations in *SF3B1*. They were equally distributed between the evaluated exons and almost all of them had been previously reported as pathogenic. The most frequent alteration, detected in

5 patients, coincided with the hot spot p.K700E. Three of the nucleotide changes corresponding with the aminoacid substitutions p.M620I, p.V635E, and p.A713G, were novel and 2 of them were characterized as likely pathogenic. The only silent variant found, identified as p.R702R, potentially alters its own splicing.

On the other hand, 4 out of 41 patients (*SF3B1/SRSF2*) showed changes in the *U2AF1* sequence, resulting in a variant frequency of 9.8%. The p.S34F hot spot substitution was detected in one patient and identified as pathogenic. The p.F150I variant, previously reported only in liver carcinoma, was found in 2 patients and interpreted as likely pathogenic. Silent alterations (p.C33C and p.P146P) were present in 2 individuals and have potential harmful effects on its own splicing.

The comparison between clinical parameters related to *SF3B1*+ patients vs. *U2AF1/SRSF2*+ suggest that the variations in *SF3B1* are significantly associated with lower levels of hemoglobin in low risk population, a lower percentage of bone marrow blasts, and an overall better survival in comparison to *U2AF1/SRSF2*+ patients. In addition, they also showed a tendency to a prolonged leukemia-free survival.

This is the first screening of *SF3B1* and *U2AF1* variants done in a cohort of Argentinian MDS patients. Our findings not only confirm the presence of nucleotide substitutions previously reported in the pathology, but also demonstrate the existence of novel variants and distinctive clinical differences between the affected groups, contributing to the heterogeneity of the disease. These finding collaborate in the overall understanding of MDS in our population contributing in the identification of early events, in diagnosis and in patient prognosis.

ABREVIATURAS

3'SS: sitio de empalme 3' (*3' splice site*)

AR: anemia refractaria

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

AREBt: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo

ARSAt: ARSA con trombocitosis

BPS: secuencia del punto de ramificación intrónica (*Branch point sequence*)

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

CES: secuenciación de electroforesis capilar (*Capillary electrophoresis sequencing*)

CPSS: Sistema de predicción de riesgo para LMMC (*Prognostic scoring system for chronic myelomonocytic leukemia*)

CRDM: citopenia refractaria displasia multilinaje

CRDM-SA: CRDM y sideroblastos en anillo

CRDU: citopenia refractaria displasia unilinjaje

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

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

ESE: potenciador de empalme exónico (*Exonic splicing enhancer*)

ESS: silenciador de empalme exónico (*Exonic splicing silencer*)

FAB: grupo cooperativo Franco-Americano-Británico

FC: fragmento de región cristalizabile

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and drug administration*)

Fw: *Forward*

Hb: hemoglobina

IC95%: intervalo de confianza 95%

ICUS: idiopática citopenia de significado indeterminado (*Idiopathic cytopenias of undetermined significance*)

ICGS: Consorcio Internacional del Genoma de Cancer (*International Cancer Genome Consortium*)

IPSS: sistema de predicción de riesgo internacional (*International Prognostic Scoring System*)

IPSS-R: IPSS revisado (*Revised International Prognostic Scoring System*)

LMA: leucemia mieloide aguda

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

MB: mucosa bucal

Mdn: mediana

MO: médula ósea

NGS: secuenciación mediante técnicas de nueva generación (*Next generation sequencing*)

NMD: maquinaria de degradación de ARN sin sentido (*non-sense mediated decay*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMO: punción y aspiración de MO

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

pre-ARNm: ARN mensajeros precursores

RCLB: *buffer* de lisis de glóbulos rojos (*Red blood cell lysis buffer*)

RIQ: rango intercuartílico

Rpm: revoluciones por minuto

RRM: motivo de reconocimiento para su unión con el ARN (*RNA recognition motif*)

Rv: *Reverse*

SAH: Sociedad Argentina de Hematología

SF3B1: *Splicing factor 3B subunit 1*

SMD: síndromes mielodisplásicos

SMD-I: SMD inclasificable

SMDp: SMD primarios

SMDs: SMD secundarios

SNP: polimorfismo de nucleótido simple (*Single nucleotide polymorphism*)

SNP-A: array de polimorfismo de nucleótido simple (*Single nucleotide polymorphism array*)

snRNP: ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (*Small nuclear ribonucleoproteins*)

SP: sangre periférica

SR: dominio rico en arginine y serina (*Arginine-serine rich domain*)

SRSF2: *Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2*

SSCP: Polimorfismo de conformación de cadena simple (*Single-strand conformation polymorphism*)

TCPH: trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

TIS: terapia inmunosupresora

U2AF1: *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*

UE: Unión Europea

UHM: dominio de homología para *U2AF1* (*U2AF homology domain*)

UV: ultravioleta

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

WES: secuenciación de exoma completo (*Whole exome sequencing*)

WPSS: sistema de puntuación pronóstica basado en la OMS (*WHO based PSS*)

WT: *wild type*

ZF: dedo de zinc (*Zinc finger*)

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Introducción..... | 1 |
| 1. Síndromes mielodisplásicos..... | 2 |
| 1.1 Definición..... | 2 |
| 1.2 Aspectos generales..... | 2 |
| 1.3 Epidemiología..... | 4 |
| 1.4 Diagnóstico..... | 6 |
| 1.5 Clasificación..... | 8 |
| 1.5.1 Clasificación según el grupo cooperativo Franco-Americano-Británica..... | 8 |
| 1.5.2 Clasificación según la Organización Mundial de la Salud..... | 9 |
| 1.6 Pronóstico..... | 10 |
| 1.7 Tratamiento..... | 12 |
| 2. Variantes biológicas afectadas..... | 14 |
| 2.1 Factores de la maquinaria de corte y empalme..... | 15 |
| 2.1.1 <i>SF3B1</i> | 18 |
| 2.1.2 <i>U2AF1</i> | 21 |
| 2.1.3 <i>SRSF2</i> | 23 |
| Objetivos e hipótesis..... | 25 |
| Materiales y métodos..... | 27 |
| 1. Poblaciones estudiadas..... | 28 |
| 2. Procesado de muestras..... | 28 |
| 2.1 Extracción/purificación de ADN mediante columnas..... | 29 |
| 2.2 Análisis cuantitativo por espectrofotometría..... | 30 |
| 3. Estudio de variantes..... | 30 |
| 3.1 Algoritmo de análisis..... | 30 |
| 3.2 Construcción de controles positivos..... | 31 |
| 3.3 Técnica de polimorfismos conformacionales de hebra única..... | 33 |
| 3.3.1 Protocolo de tinción con nitrato de plata..... | 34 |
| 3.4 Técnicas de secuenciación de ADN..... | 34 |
| 3.4.1 Estrategia de secuenciación de primera generación: Método de Sanger.... | 34 |
| 3.4.2 Tecnología de secuenciación de nueva generación: NGS..... | 35 |
| 4. Análisis bioinformática..... | 35 |
| 5. Análisis estadístico..... | 36 |
| Resultados..... | 38 |
| 1. Características clínicas de la población estudiada..... | 39 |
| 2. Detección de variantes en los exones 14 y 15 del gen <i>SF3B1</i> | 40 |
| 2.1 Análisis de variantes en el exón 14 del <i>SF3B1</i> | 40 |
| 2.1.1 Puesta a punto de la metodología..... | 40 |
| 2.1.2 Variantes encontradas y su interpretación..... | 41 |
| 2.2 Análisis de variantes en el exón 15 del <i>SF3B1</i> | 45 |
| 2.2.1 Puesta a punto de la metodología..... | 45 |
| 2.2.2 Variantes encontradas y su interpretación..... | 46 |
| 2.2.3 Validación mediante NGS..... | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Descripción de las variantes en pacientes <i>SF3B1</i> + | 52 |
| 3. Detección de variantes en los exones 2 y 6 del gen <i>U2AF1</i> | 53 |
| 3.1 análisis de variantes en el exón 2 del <i>U2AF1</i> | 53 |
| 3.1.1 Puesta a punto de la metodología | 53 |
| 3.1.2 Variantes encontradas y su interpretación | 55 |
| 3.2 Análisis de variantes en el exón 6 del <i>U2AF1</i> | 59 |
| 3.2.1 Puesta a punto de la metodología | 59 |
| 3.2.2 Variantes encontradas y su interpretación | 60 |
| 3.3 Descripción de las variantes en pacientes <i>U2AF1</i> + | 64 |
| 4. Asociación con parámetros clínicos | 65 |
| Discusión | 69 |
| 1. Detección de variantes en <i>U2AF1</i> y <i>SF3B1</i> en la población seleccionada | 71 |
| 1.1 Variantes en <i>SF3B1</i> | 71 |
| 1.2 Variantes en <i>U2AF1</i> | 74 |
| 2. Relación con características clínicas | 77 |
| Conclusiones | 79 |
| Perspectivas futuras | 81 |
| Bibliografía | 83 |
| Anexo | 94 |

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Síndromes Mielodisplásicos

1.1 Definición

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un grupo heterogéneo de patologías hematológicas caracterizado por la presencia de citopenia(s) en sangre periférica (SP) como producto de una hematopoyesis inefectiva, en el marco de una médula ósea (MO) normo o hiper celular y displásica. Alrededor de un 30% de los pacientes evolucionan a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) con una pobre respuesta a la quimioterapia convencional. (Greenberg et al., 1997; Arber et al., 2016; Montalban-Bravo y Garcia-Manero, 2018)

1.2 Aspectos Generales

Los SMD son considerados como una enfermedad de los adultos mayores a 65 años. Según ciertas estimaciones, se encuentran dentro de las diez patologías más frecuentes en esta población. (McQuilten et al., 2014; Steensma et al., 2014)

Los SMD pueden clasificarse como primarios o “*de novo*” (SMDp) o secundarios (SMDs). La etiopatología de la enfermedad se entiende de mejor manera basándose en la Teoría de Eventos Múltiples de la Cancerinogénesis (del inglés: *multiple hit theory of cancerinogenesis*), (Ashley, 1969) donde el desarrollo del clon neoplásico está dado por la presencia de varios de los factores predisponentes que contribuyen tales como los genéticos, inmunológicos, iatrogénicos y ambientales. (Bennett, 2013)

Particularmente, el desarrollo de los SMDs puede ocurrir por diversos mecanismos: exposición ambiental a productos químicos como el benceno, la radiación, la exposición previa a agentes quimioterapéuticos tales como alquilantes o inhibidores de la topoisomerasa II, o puede ser idiopático. (Dotson y Lebowicz, 2019) Se entiende que la mayoría de las características clínicas y patológicas de los SMD son el resultado directo de lesiones genéticas adquiridas. (Sperling et al., 2017) Actualmente se desconoce exactamente cuál es la variante o la vía molecular desencadenante de la enfermedad “*de novo*”. Sin embargo, se cree que las lesiones genéticas iniciadoras de los SMD comprenden un subconjunto de genes alterados.

(Tefferi y Vardiman, 2009; Bejar et al., 2011; Papaemmanuil et al., 2013; Montalban-Bravo y Garcia-Manero, 2018)

La adquisición de una o múltiples variantes provocan cambios en la proliferación, fallas de diferenciación celular, expresión de neoantígenos y, como consecuencia, una extensiva muerte celular por apoptosis de las células madre hematopoyéticas favoreciendo una hematopoyesis ineficaz. (Cazzola y Malcovati, 2005) Posteriormente, se manifiesta la presencia de citopenias, ya que la MO se vuelve incapaz de producir y liberar una cantidad adecuada de células maduras en SP, aunque paradójicamente, la gran mayoría de los pacientes con SMD tienen una MO normo o hipercelular. (Bejar et al., 2011; Das et al., 2013) Esto se podría atribuir a la susceptibilidad de los progenitores mieloides clonales a la apoptosis y la poca capacidad de respuesta de estas células a los factores de crecimiento. (Kouides y Bennett, 1997; Das et al., 2013) En estos últimos años se han sumado otros mecanismos que contribuyen a la hematopoyesis ineficaz como el inflamosoma y la muerte celular por piroptosis o la necroptosis. (Sallman et al., 2016; Montalban-Bravo et al., 2019) Alteraciones genéticas y epigenéticas posteriores podrían conferir una ventaja adaptativa frente a la presión selectiva del medio y promover la transformación a LMA modificando el comportamiento biológico, con incremento en la proliferación y disminución de la apoptosis. (Rosenfeld y List, 2000; Steensma, 2007) En la **figura 1** se detalla el mecanismo enunciado previamente, desde la iniciación, progresión a SMD y evolución o no a LMA.

El curso clínico de los SMD es muy variable, la enfermedad puede estar presente de manera estable por más de 10 años o puede causar la muerte en pocos meses debido a complicaciones de las citopenias o de la transformación leucémica. (Greenberg et al., 1997; Arber et al., 2016; Montalban-Bravo y Garcia-Manero, 2018)

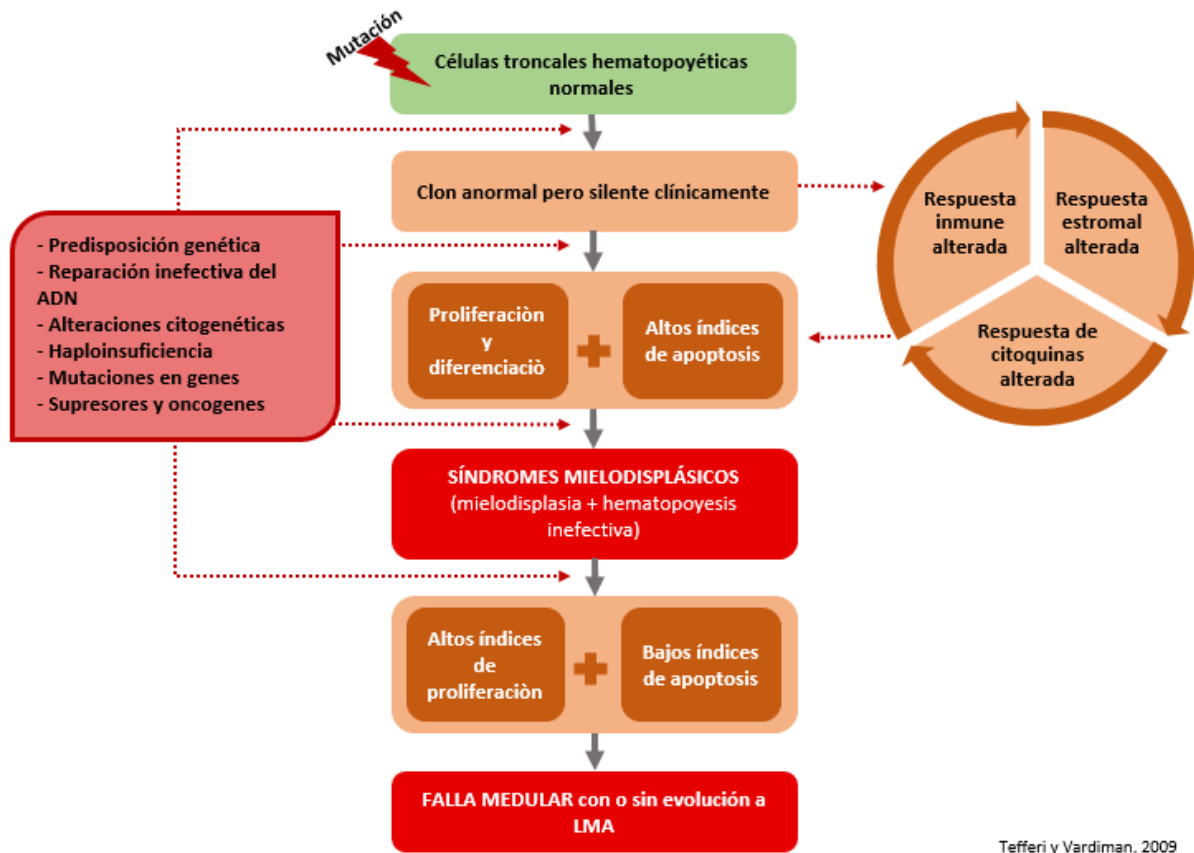


Figura 1: Modelo hipotético de inicio y progresión de los SMD

1.3 Epidemiología

Los SMD son altamente prevalentes en personas de edad avanzada. En el 75% de los casos los pacientes superan los 60 años. Cada década, por sobre los 40 años, duplica la cantidad de casos con SMD. Se estima que en la población general se diagnostican 4 de cada 100.000 individuos cada año, mientras que en pacientes mayores de 70 años la tasa de incidencia es superior a 20 de cada 100.000 personas por año. En niños y adolescentes es muy poco frecuente, constituyendo sólo el 5% de los casos. (Germing et al., 2013; Gangat et al., 2016; Arber et al., 2016)

Los SMD afectan tanto a mujeres como hombres. Si bien el sexo masculino predomina en casi todos los subtipos de la enfermedad, 4,5 vs 2,7 por 100.000 individuos por año, el subtipo 5q- se caracteriza por afectar mayoritariamente a pacientes de sexo femenino. Esta diferencia se la atribuye principalmente a factores de exposición y estilos de vida. (Rollison et al., 2008; Roman et al., 2016)

El área geográfica juega un rol importante en la incidencia y las características clínicas de los SMD. Por ejemplo, la edad promedio en el momento del diagnóstico parece variar entre diferentes países, siendo menor en los países orientales que en los países occidentales. Un estudio realizado en 2018 mostró que pacientes japoneses presentan citopenias más severas, diferencias en el cariotipo y una sobrevida significativamente mejor en comparación con los pacientes caucásicos. Además, la frecuencia de los subtipos de la enfermedad también se ve afectada por la ubicación geográfica. Por ejemplo, los subtipos ARSA (anemia refractaria con sideroblastos en anillo) y LMMC (leucemia mielomonocítica crónica) es mayor en pacientes caucásicos. (Miyazaki et al., 2018) El origen de la variabilidad según zona geográfica se la otorga a predisposiciones genéticas, estatus socioeconómico, factores étnicos, estilo de vida y/o ambientales que no han sido completamente aclarados.

Argentina es un país de extensa dimensión que concentra el 66,3% de la población y recursos económicos en la zona central. Según la ley argentina, la cobertura de salud es gratuita, universal y está garantizada para todos los niveles de complejidad. Adicionalmente, más del 64% de la población tiene cobertura médico-asistencial, lo que permite una mayor accesibilidad a las prestaciones privadas (INDEC, 2012). Los recursos médicos, como las instalaciones, infraestructura y el personal especializado, son más accesibles en el área metropolitana y en la zona pampeana que en otras regiones de Argentina. (Crisp et al., 2017) Esto hace que el diagnóstico temprano de SMD sea mucho más frecuente, resultado en un porcentaje mayor de pacientes caracterizadas en etapas de bajo riesgo en comparación con países de Latinoamérica sin acceso al mismo tipo de atención médica. (Belli et al., 2015)

En 2015, se realizó el estudio comparativo más actual entre los países de América del Sur, en el cual se evaluaron un total de 1.080 pacientes: 635 argentinos, 345 brasileños y 100 chilenos. Entre los hallazgos encontrados y detallados en la **tabla 1** se vio que los tres países estudiados tienen mayor prevalencia del subtipo CRDM (Citopenia refractaria con displasia multilineaje) seguido de los casos de AREB-2 (Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2).

Argentina y Brasil presentan un predominio de pacientes masculinos con una relación M/F: 1,3 y una edad promedio similar (65 ± 17 y 66 ± 15 años, respectivamente). Los pacientes chilenos, a diferencia de los argentinos y brasileros con SMD, tuvieron un predominio de pacientes femeninos con una relación M/F de 0,8 y una mediana de edad al diagnóstico más baja de 59 ± 19 años. Los datos de los pacientes chilenos podrían estar sesgados debido a la

restricción de acceso a estudios citogenéticos para personas mayores en ese país (**Tabla 1**). (Belli et al., 2015)

Tabla 1: Comparación de resultados entre la población de Argentina, Brasil y Chile

| Variable | | Argentina N=635 | Brasil N=345 | Chile N= 100 |
|--------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Sexo | Masculino/Femenino | 356/279 | 193/152 | 44/56 |
| | Ratio | 1,3 | 1,3 | 0,8 |
| Edad (años) | Media ± D.E. | 66 ±15 | 65 ±17 | 59 ±19 |
| | Rango | 17-93 | 15-99 | 15-89 |
| | Mediana | 69 | 68 | 64 |
| FAB (%) | AR | 328 (51,7) | 159 (46,1) | 67 (67,0) |
| | ARSA | 58 (9,1) | 59 (17,1) | 1 (1,0) |
| | AREB | 135 (21,3) | 78 (22,6) | 24 (24,0) |
| | AREBt | 54 (8,5) | 24 (7,0) | 8 (8,0) |
| | LMMC-SMD | 60 (9,4) ¶ | 25 (7,2) ¶ | - |
| OMS 2008 (%) | | N= 520 | N= 299 | N= 85 |
| | 5q- | 24 (4,6) | 9 (3,0) | 4 (4,7) |
| | CRDU | 57 (11,0) | 40 (13,4) | 11 (12,9) |
| | ARSA | 13 (2,5) | 31 (10,4) | 1 (1,2) |
| | CRDM | 230 (44,1) | 105 (35,1) | 45 (52,9) |
| | CRDM-SA | 42 (8,1) | 21 (7,2) | 0 (0,0) |
| | AREB-1 | 65 (12,5) | 44 (14,7) | 10 (11,8) |
| | AREB-2 | 89 (7,1) | 45 (15,1) | 14 (16,5) |
| | SMD-I | 0 (0,0) | 4 (1,3) | 0 (0,0) |

Fuente: Belli et al., 2015; AR: Anemia Refractaria, ARSA: AR con sideroblastos en anillo, AREB: AR con exceso de blastos, AREBt: AREB en transformación, LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crónica, CRDU: Citopenia Refractaria Displasia unilínea, CRDM: Citopenia Refractaria Displasia multilineal, CRDM-SA: CRDM y sideroblastos en anillo, SMD-I: Síndrome mielodisplásico inclasificable. D.E.: desvío estándar; OMS: Organización Mundial de la Salud; FAB: clasificación Franco-Americano-Británica; ¶: el subtipo LMMC-SMD se excluyó en la comparación estadística global debido a que no estaban contemplados en la serie chilena.

1.4 Diagnóstico

La evaluación inicial de pacientes con sospecha de SMD requiere un cuidadoso estudio que involucra el análisis del frotis de SP, morfología de la MO y la persistencia de los recuentos sanguíneos anormales.

El frotis de SP se hace para determinar el grado de displasia y, por lo tanto, las células potencialmente disfuncionales. Se debe realizar la aspiración de MO, con tinción azul de Prusia para hierro, la evaluación de la presencia o ausencia de sideroblastos en anillo, determinar el porcentaje de blastos en médula, y la biopsia, para establecer el grado de anomalías en la maduración de las células hematopoyéticas y sus proporciones relativas, determinar el porcentaje de CD34+ mediante inmunohistoquímica, la celularidad, la presencia de hierro en sí

y el grado de fibrosis. (Greenberg et al., 1997) Además, se debe complementar con estudios citogenéticos de la MO ya que también son esenciales para el pronóstico. En el caso de que los resultados citogenéticos sean anormales, pueden confirmar el diagnóstico cuando el perfil morfológico es ambiguo. (Steensma, 2015)

Los pacientes con SMD al momento de ser diagnosticados pueden ser asintomáticos e identificados sólo por la presencia de citopenias. Sin embargo, el 85% presenta síntomas clínicos como fatiga, a menudo relacionado con anemia, la cual suele ser frecuentemente macrocítica o normocítica, pero refractaria al tratamiento con ácido fólico y vitamina B12, o normocítica. El promedio de niveles de hemoglobina al momento del diagnóstico es de 9,5 g/dL. El 40% presenta sangrados debido a trombocitopenia, y fiebre o infecciones recurrentes como resultado de neutropenia. (Steensma, 2015; Sperling et al., 2017)

La MO en la mayoría de casos es normo o hiper celular con alteraciones displásicas. La displasia puede involucrar una o todas las líneas hematopoyéticas mieloides, afectando el tamaño, la forma, la función y/o la organización celular. Existe un porcentaje del 15% de los casos que presentan una MO hipocelular. (Steensma, 2015)

La información clínica del paciente es de gran importancia para poder descartar otras posibles causas de las citopenias y/o determinar enfermedades relacionadas. En la **figura 2** se detallan los criterios mínimos para realizar el diagnóstico de SMD. Para el mismo, se deben cumplir los pre-requisitos esenciales (A), y al menos uno de los criterios decisivos (B). En el caso de que se cumpla (A) pero no (B) y si presentan los co-criterios (C) se lo denomina “altamente sospechoso de SMD”. Si se cumple únicamente (A), se clasifica como una citopenia idiopática de significado indeterminado (ICUS) y, en el caso de que los pre-requisitos esenciales estén presentes y, además, haya una alteración clonal inespecífica sería una citopenia clonal de significado indeterminado (CCUS).

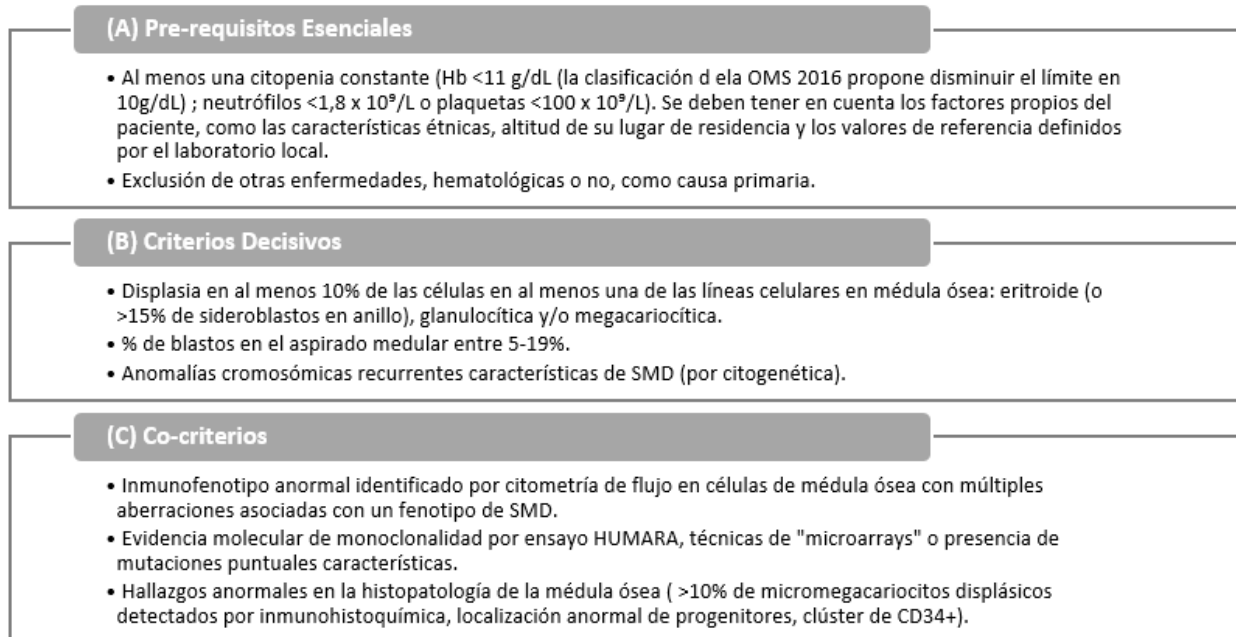


Figura 2: Criterios mínimos de diagnóstico de SMD

Fuente: Valent et al., 2007, Steensma et al., 2018 y Guía de Diagnóstico y Tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH) - Edición 2019 - Capítulo: Síndromes mielodisplásicos y síndromes de superposición mielodisplasia/neoplasia mieloproliferativa

1.5 Clasificación

1.5.1 Clasificación según el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico

La clasificación morfológica más utilizada de los SMD en las últimas cuatro décadas fue publicada en 1976, y luego ampliada por el Grupo Cooperativo Franco - Americano - Británico (FAB) en 1982. (Bennett et al., 1982) La clasificación está dada de acuerdo a las características citoquímicas, morfológicas, el recuento de monocitos circulantes en SP, la presencia de sideroblastos en anillo en la MO y el porcentaje de blastos presentes en SP y MO. Los cinco subtipos para SMD establecidos son: Anemia refractaria (AR), AR con sideroblastos en anillo (ARSA), AR con exceso de blastos (AREB), AREB en transformación (AREBt) y LMMC (**Tabla 2**). En esta clasificación el recuento de blastos en MO mayor a 30% establece el diagnóstico diferencial con respecto a la LMA. (Bennett et al., 1985; Nimer, 2009)

Tabla 2: Clasificación FAB (1982)

| Clasificación | Características |
|--|--|
| Anemia refractaria (AR) | Anemia inexplicada persistente con dishemopoyesis, u otra citopenia, con < 5% de blastos en MO y < 1% de blastos en SP |
| Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA) o Anemia refractaria sideroblástica | Anemia refractaria con \geq del 15% de sideroblastos en anillo, con < 5% de blastos en MO y < 1% de blastos en SP |
| Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) | Anemia refractaria o sideroblástica con 5-20% de blastos en MO y menos de 5% de blastos en SP |
| Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREBt) | 20-30% de blastos en MO o más del 5% de blastos en SP. Presencia de bastones de Auer |
| Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) | < 20% de blastos en MO y < 5% de blastos en SP, monocitosis periférica superior a $1 \times 10^9/L$ |

Fuente: Bennett et al., 1982 y Guías de Diagnóstico y Tratamiento Edición 2017 de la Sociedad Argentina de Hematología; MO: médula ósea; SP: sangre periférica

1.5.2 Clasificación según la Organización Mundial de la Salud

La continua necesidad de clasificar a los pacientes con SMD en subgrupos más homogéneos condujo a la nueva Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1997. En 2001, la OMS propuso incorporar la información genética a la información morfológica, citoquímica, inmunofenotípica y clínica en algoritmos de diagnóstico. La misma fue actualizada en 2008 (Vardiman et al., 2009) y en 2016 (Arber et al., 2016). Entre los cambios aplicados a la clasificación FAB, se destacan los siguientes: categorizar la LMMC en un grupo con características compartidas entre los SMD y las enfermedades mieloproliferativas, eliminar AREBt, establecer LMA cuando el porcentaje de blastos en MO es mayor a 19%, dividir AREB en dos subtipos: AREB-1 y AREB-2, y reconocer al síndrome 5q- como una entidad separada. (Jaffe et al., 2001; Bennett, 2013)

La actualización más reciente se realizó en el 2016 a fin de incorporar nuevos datos clínicos, pronósticos, morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos que han surgido desde la edición del 2008. Gracias a técnicas como el análisis de expresión génica y la secuenciación por técnicas de nueva generación (NGS del inglés: *Next Generation Sequencing*) se pudieron identificar biomarcadores asociados con SMD y LMA, que pueden tener una implicancia significativa en los criterios de diagnóstico, así como en el pronóstico, actualmente asociados a la clasificación de la OMS. (Arber et al., 2016)

En la nueva clasificación, la presencia de citopenias es considerada una condición necesaria para realizar el diagnóstico de SMD. La terminología para adultos con SMD ha

cambiado para eliminar términos como "anemia refractaria" y "citopenia refractaria" y se los ha reemplazado por "síndrome mielodisplásico" seguido de los modificadores apropiados: displasia en único linaje *versus* múltiple, sideroblastos en anillo, exceso de blastos o la anomalía citogenética del(5q). (Arber et al., 2016). Los subtipos de SMD y sus características se ven detalladas en la **tabla 3**. (Arber et al., 2016)

Tabla 3: Clasificación de la OMS (2016)

| Subtipo | Líneas Displásicas | Citopenias | SA | Blastos en SP o MO |
|---|--------------------|------------|----------------|--|
| SMD con displasia unilínaje (SMD-DU) | 1 | 1-2 | <15% <5% # | MO < 5% ; SP < 1% Sin bastones de Auer |
| SMD con displasia multilínaje (SMD-DM) | 2-3 | 1-3 | <15% <5% # | MO < 5% ; SP < 1% Sin bastones de Auer |
| SMD con SA y displasia unilínaje (SMD-SA-DU) | 1 | 1-2 | ≥15% ≥5% # | MO < 5% ; SP < 1% Sin bastones de Auer |
| SMD con SA y displasia multilínaje (SMD-SA-DM) | 2-3 | 1-3 | ≥15% ≥5% # | MO < 5% ; SP < 1% Sin bastones de Auer |
| SMD asociada con del (5q) aislada | 1-3 | 1-2 | Sin o Aislados | MO < 5% ; SP < 1% Sin bastones de Auer |
| SMD con exceso de blastos tipo 1 (SMD-EB-1) | 0-3 | 1-3 | Sin o Aislados | MO 5-9% ; SP 2-4% Sin bastones de Auer |
| SMD con exceso de blastos tipo 2 (SMD-EB-2) | 0-3 | 1-3 | Sin o Aislados | MO 10-19% ; SP 5-19% o bastones de Auer |
| SMD no clasificable (SMD-I) | | | | MO < 5% ; SP < 1% Sin bastones de Auer |
| - Con 1% blastos en SP | 1-3 | 1-3 | Sin o Aislados | |
| - Displasia unilínea y pancitopenia | 1 | 3 | Sin o Aislados | |
| - Basada en hallazgos citogenéticos | 0 | 1-3 | <15% | |

Fuente: Guías de Diagnóstico y Tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH)- Edición 2019. SA: sideroblastos en anillo; #: en presencia de variantes en *SF3B1*; SP: Sangre Periférica; MO: Médula ósea.

1.6 Pronóstico

Debido a la heterogeneidad en el comportamiento clínico de los pacientes, a lo largo de los últimos 30 años se han creado una vasta cantidad de sistemas para poder ofrecer una mejor opción terapéutica adaptada al riesgo individual.

El patrón *gold-standard* más utilizado para calcular el riesgo de los pacientes con SMD primarios es el Sistema de Predicción de Riesgo Internacional (IPSS) del inglés: *International Prognostic Scoring System*. El IPSS toma en consideración tres categorías de riesgo citogenético, el número de citopenias y el porcentaje de blastos en la MO para definir cuatro grupos de riesgo: bajo, intermedio 1, intermedio 2 y alto. Este sistema fue revisado en 2012

(IPSS-R) y, para evaluar los resultados clínicos, el IPSS-R estratifica a los pacientes tomando en cuenta las siguientes cinco variables: el porcentaje de blastos en MO, el tipo y el número de anomalías cromosómicas, el nivel de glóbulos rojos (representado por la hemoglobina), el recuento de plaquetas y de neutrófilos en SP. A cada factor se le asigna un puntaje los cuales se suman para catalogar a los pacientes con SMD en cinco grupos de riesgo: muy bajo, bajo, intermedio, alto o muy alto (**Tabla 4**). (Greenberg et al., 2012)

Tabla 4: Sistema de Predicción de Riesgo Internacional-Revisado (IPSS-R)

| Puntaje | Categoría de Riesgo | Sobrevida (años) | Evolución a LMA (años) |
|-----------|---------------------|------------------|------------------------|
| ≤ 1,5 | Muy bajo | 9,9 | - |
| > 1,5 - 3 | Bajo | 5,3 | 10,8 |
| > 3 - 4,5 | Intermedio | 3 | 3,2 |
| > 4,5 - 6 | Alto | 1,6 | 1,4 |
| > 6 | Muy alto | 0,8 | 0,73 |

| Característica | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 |
|---|-----------|---------|---------|-----|------------|-------|-----------|
| Riesgo citogenético | Muy bueno | | Bueno | | Intermedio | Pobre | Muy pobre |
| % blastos en MO | ≤ 2 | | 3 - 4,9 | | 5 - 10 | > 10 | |
| Hemoglobina (g/dL) | ≥ 10 | | 8 - 9,9 | < 8 | | | |
| Plaquetas (x10 ⁹ /L) | ≥ 100 | 50 - 99 | < 50 | | | | |
| Recuento de Neutrófilos (x10 ⁹ /L) | ≥ 0,8 | < 0,8 | | | | | |

Riesgo Citogenético*: Muy bueno: del(11q), -Y
 Bueno: Normal, del(12p), del(20q), del(5q) aislado o acompañado
 Intermedio: del(7q), +8, i(17q), +19, cualquier otro hallazgo clonal
 Alto: -7, rearrreglos (3q), 2 alteraciones que incluyan -7/del(7q) Cariotipos complejos (= 3 alteraciones citogenéticas)
 Muy alto: Cariotipos complejos (> 3 alteraciones citogenéticas)

Greenberg et al., 2012

De acuerdo con un trabajo realizado en 2014 con este sistema de evaluación en 511 pacientes argentinos con SMD, las causas de muerte se asociaron con la severidad de las citopenias: infecciones y sangrados en el 58%, mientras que el 42% remanente desarrollaron LMA con anterioridad. Además, los pacientes jóvenes presentan una tasa de muerte asociada a progresión leucémica incrementada en relación a los de mayor edad, la cual se eleva a 73% vs. 56% en los de alto/muy alto riesgo. (Belli et al., 2014)

El IPSS-R excluye a los SMD secundarios en su diseño original, sin embargo, Zeidan et al., 2017 validaron su aplicación en este grupo de pacientes. Por su parte, las LMMC con características mieloproliferativas tampoco fueron consideradas. El sistema de predicción de riesgo generado por el grupo español específico para las LMMC (CPSS, por sus siglas en inglés:

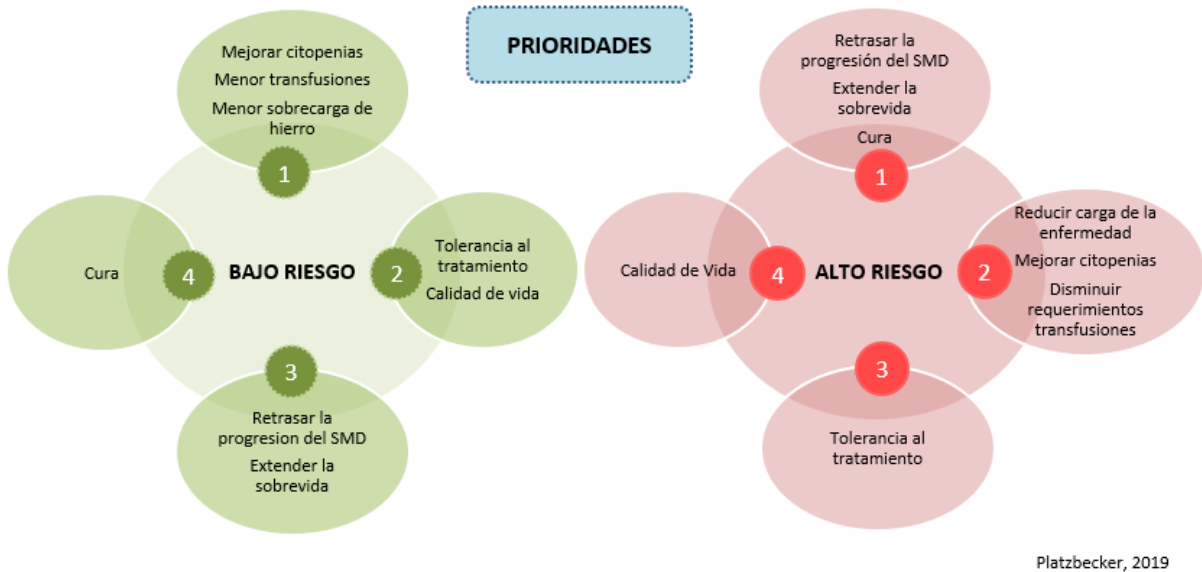
Chronic Myelomonocytic Leukemia Prognostic Scoring System) evalúa las características displásicas o mieloproliferativas, la clasificación de acuerdo a la OMS 2008, el riesgo citogenético específico para estos pacientes y el requerimiento transfusional, el nivel de hemoglobina según el límite de 10 g/dL o el ajustado según el sexo del paciente (femenino < 8 y masculino < 9g/dL). En base a la combinación de estos parámetros definen 4 grupos de riesgo. (Such et al., 2013)

Otro de los esquemas utilizados es el sistema de puntuación de pronóstico basado en la clasificación de la OMS (WPSS, por sus siglas en inglés: *World Health Classification-based Prognostic Scoring System*), el requerimiento transfusional y el cariotipo. Esta herramienta clasifica a los pacientes en cinco grupos de riesgo (muy bajo, bajo, intermedio, alto o muy alto) que muestran diferente supervivencia y probabilidad de evolución leucémica, y se puede aplicar en cualquier momento durante seguimiento. (Malcovati et al., 2007; Stone, 2009)

1.7 Tratamiento

Determinar posibles tratamientos para un paciente con SMD es un trabajo que involucra la consideración de múltiples factores. Se debe tener en cuenta la edad, el diagnóstico patológico, grado de citopenias, riesgo de transformación a LMA, riesgo basado en el IPSS, IPSS-R o WPSS, la viabilidad de incorporación a un ensayo clínico o la posibilidad de un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) y, de hecho, la filosofía del paciente y su familia con respecto a su cuidado. Además, si el paciente tiene un SMD secundario, la tolerabilidad de la terapia probablemente sea peor debido a la exposición previa a agentes que dañan el ADN. Las opciones de tratamiento varían desde la observación en el paciente asintomático, administración de agentes estimulantes de la eritropoyetina, lenalidomida e hipometilantes hasta el TCPH en pacientes de alto riesgo o jóvenes. (Stone, 2009; Bennett, 2013)

El objetivo principal en pacientes de bajo riesgo es mejorar la calidad de vida. Para ello se busca mejorar las citopenias para prevenir complicaciones, como sangrado e infecciones graves. Mientras que, en los pacientes de mayor riesgo, la prioridad es extender la supervivencia, tratando de modificar la historia natural de la enfermedad aplicando terapias de mediana y alta intensidad como lo son la quimioterapia intensiva y el TCPH (**Figura 3**). (Enrico et al., 2014; Platzbecker, 2019)



Platzbecker, 2019

Figura 3: Prioridades de las intervenciones terapéuticas según el riesgo del paciente

Por más de una década, las agencias regulatorias de medicamentos, tanto americana (FDA, por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) como europea (EMA, por sus siglas en inglés, *European Medicines Agency*), han aprobado sólo una cantidad reducida de medicamentos para afrontar esta enfermedad. Dentro de los ensayos clínicos en etapas más avanzadas, el Luspatercept (**Figura 4**) se muestra como el nuevo fármaco candidato a ser autorizado en SMD de bajo riesgo con requerimiento transfusional. Particularmente, estaría dirigido a pacientes con presencia de sideroblastos en anillo o alteraciones en el gen *SF3B1* (*Splicing Factor 3b Subunit 1*) ya que estos pacientes mostraron tasas de respuestas del 63% en un ensayo fase 2. (Platzbecker et al., 2017; Fenaux et al., 2019)

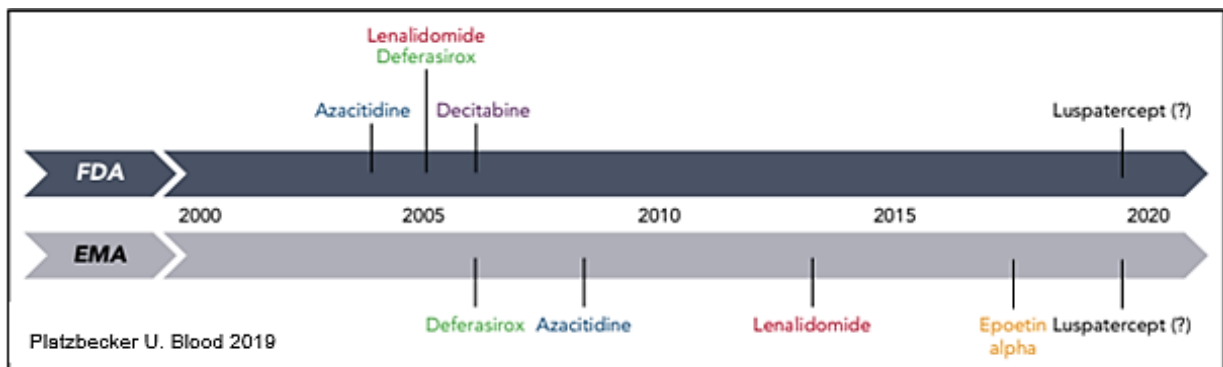


Figura 4: Medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) y *European Medicines Agency* (EMA) a lo largo de los años

2. Vías biológicas afectadas

En los últimos años, las técnicas de secuenciación de alta resolución analítica como el NGS han permitido la detección de alteraciones genéticas que aportan a la comprensión de la patogénesis molecular de los SMD.

Los pacientes con SMD suelen tener diversas vías biológicas afectadas. Con mayor frecuencia se encuentran alterados los genes que participan en la maquinaria de corte y empalme (por ejemplo, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*), la modificación de histonas (por ejemplo, *EZH2*, *ASXL1*), la metilación del ADN (por ejemplo, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*) y control del ciclo celular (*TP53*) (Tabla 5 y figura 5). El número total y la detección temprana de variantes subclonales juegan un papel importante en la patogénesis y el pronóstico de los SMD. (Hosono, 2019)

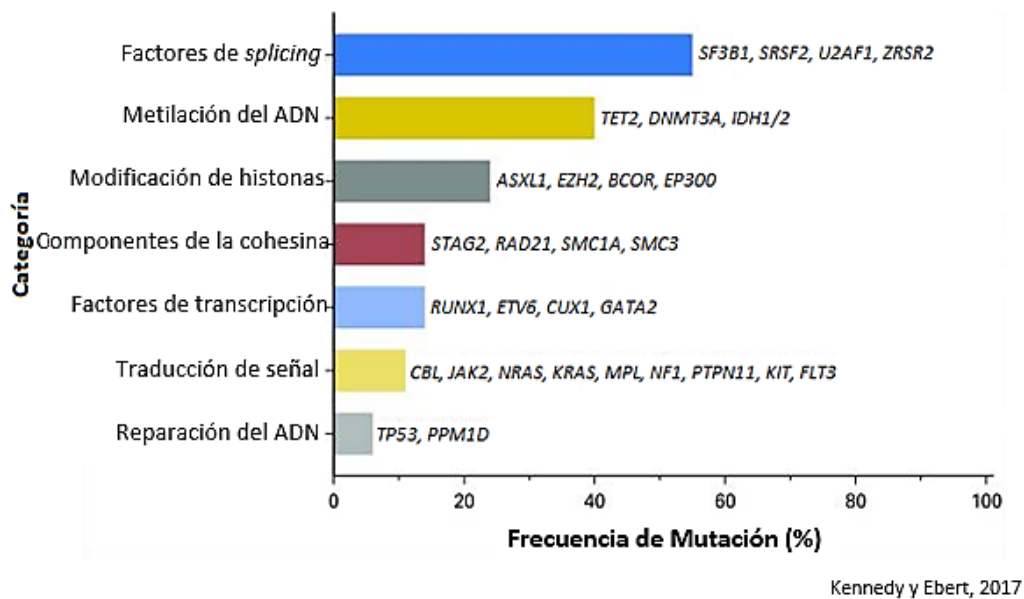


Figura 5: Vías biológicas afectadas y su frecuencia relativa en pacientes con SMD

En un estudio realizado en 2013, donde se analizaron alrededor de 111 genes vinculados con cáncer en 738 pacientes, se determinó que el SMD se caracteriza por variantes en más de 40 genes que contemplan una estructura compleja de interacciones gen-gen y una extensa diversificación subclonal. Además, un total del 78% de los pacientes analizados eran portadores de 1 o más de estas alteraciones patogénicas. La variante más frecuente fue la del factor de *splicing* *SF3B1* con un 24%, seguido por *TET2* (*Tet Methylcytosine Dioxygenase 2*) (22%) y *SRSF2* (*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2*) con un 14%. (Papaemmanuil et al., 2013)

Tabla 5: Alteraciones moleculares más frecuentes en pacientes con SMD

| Gen | Frecuencia (%) | Ubicación | Función | Pronóstico | Asociación clínica |
|---------------|----------------|-----------|--------------------------|-----------------|---|
| <i>SF3B1</i> | 25-33 | 2q33 | <i>Splicing</i> | Favorable | Sideroblastos en anillo |
| <i>TET2</i> | 25-30 | 4q24 | Metilación del ADN | Neutral | Cariotipo normal |
| <i>ASXL1</i> | 15-25 | 20q11 | Modificación de histonas | Adverso | ↑ de blastos Plaquetopenia >% en LMMC |
| <i>DNMT3A</i> | 12-18 | 2p23 | Metilación del ADN | Neutral/adverso | Cariotipo normal |
| <i>SRSF2</i> | 10-18 | 17q25 | <i>Splicing</i> | Neutral/adverso | ↑ de blastos Plaquetopenia >% en LMMC |
| <i>RUNX1</i> | 10-15 | 21q22 | Factor de transcripción | Adverso | ↑ de blastos Plaquetopenia |
| <i>U2AF1</i> | 8-12 | 21q22 | <i>Splicing</i> | Adverso | Plaquetopenia, del |
| <i>TP53</i> | 8-12 | 17p13 | Supresor de tumor | Muy adverso | ↑ de blastos Plaquetopenia Cariotipo complejo |
| <i>NRAS</i> | 5-10 | 1p13 | Factor de transcripción | Adverso | ↑ de blastos Plaquetopenia >% en LMMC |

Fuente: Greenberg, 2015 y Hosono, 2019; LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crónica

2.1 Factores de la maquinaria de corte y empalme

La mayoría de los genes eucariotas se expresan como ARNm precusores (pre-ARNm) que se convierten en ARNm mediante un complejo dinámico de ribonucleoproteínas conocido como la maquinaria de corte y empalme o espliceosoma (**Figura 6**). La maquinaria es un gran complejo que está involucrado en la remoción de las regiones no codificantes (intrones) del pre-ARNm ligando los exones, o regiones codificantes, flanqueantes para convertirlo en ARNm maduro. (Will y Lührmann, 2011; Zhang et al., 2018) El espliceosoma lo componen cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP del inglés: *small nuclear ribonucleoproteins*): U1, U2, U4, U5 y U6, junto con una gran cantidad de cofactores de proteínas asociadas. (Matera y Wang, 2014) Su buen funcionamiento juega un papel crucial en el reconocimiento de los sitios de empalme y, por ende, es esencial para la traducción de la proteína apropiada.

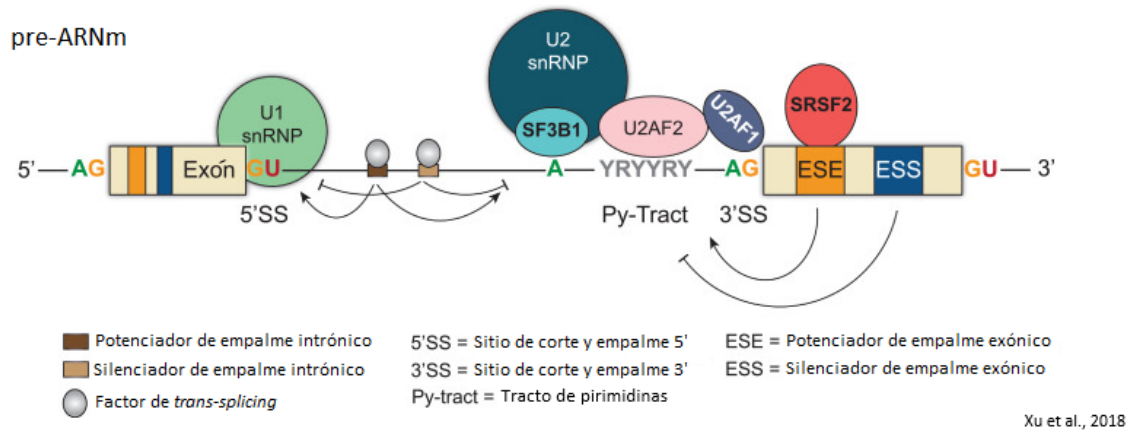


Figura 6: Componentes de la maquinaria de corte y empalme

La presencia de variantes en genes involucrados en la maquinaria de corte y empalme: *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1* juegan un papel importante en la patogénesis de los SMD. Estos genes, involucrados en el complejo U2 snRNP, han tomado gran relevancia al afectar el 70% de los pacientes con SMD de bajo riesgo y ser mutuamente excluyentes entre sí. (Bejar et al., 2012; Papaemmanuil et al., 2013; Shahrabi et al., 2016)

Existe fuerte evidencia de que las variantes en los factores que conforman el espliceosoma ocurren en las etapas tempranas de la evolución de la enfermedad. Estas alteraciones ayudan a determinar características clínicas de la enfermedad, incluyendo la asociación con características morfológicas en el frotis de MO y en la sobrevida sin evolución a LMA. Adicionalmente, también pueden influir en la evolución genómica de la enfermedad, ya que los patrones de variantes cooperadoras son notablemente diferentes: *U2AF1* y *SRSF2* suelen coexistir con otras alteraciones, mientras que, *SF3B1* normalmente no se ve acompañada de variantes adicionales a excepción de *DNMT3A* (**Figura 7**). (Papaemmanuil et al., 2013) Los cambios en *SF3B1* se observan principalmente en el subtipo ARSA asociado o no con un aumento en el recuento de plaquetas, mientras que las alteraciones en *U2AF1* y *SRSF2* se observan principalmente en los subtipos LMMC y AREB-1/ 2, y se ha informado que hasta el 47% de los pacientes con LMMC presentan a *SRSF2* comprometido. (Shahrabi et al., 2016)

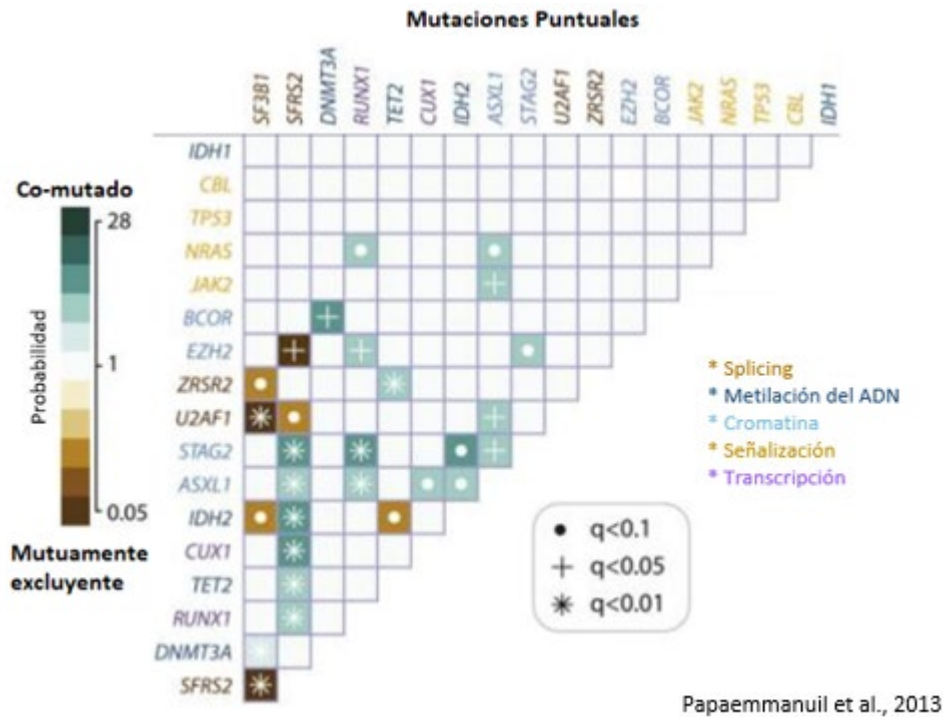
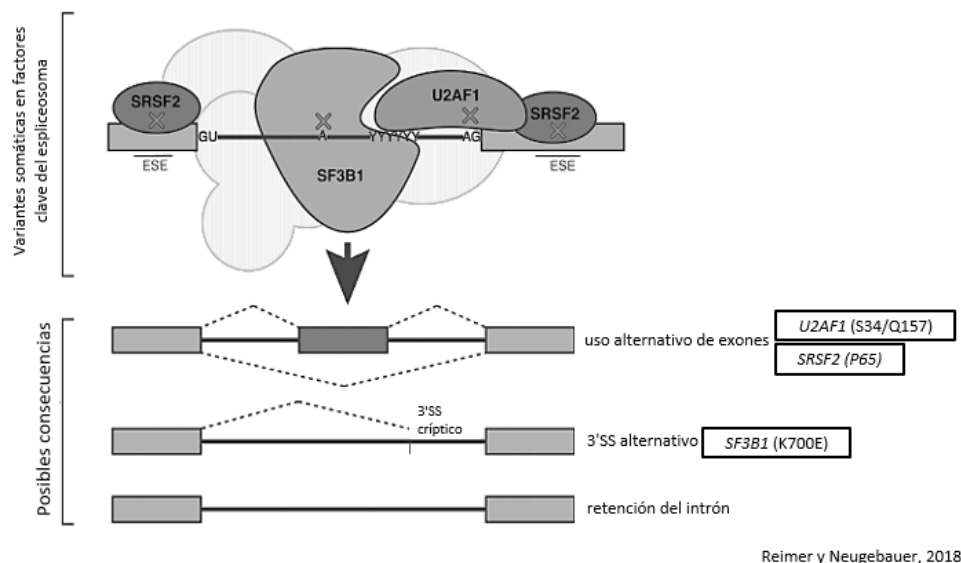


Figura 7: Coexistencia y exclusividad de variantes

Como se introdujo anteriormente, estas variantes interfieren con el reconocimiento de las regiones dadoras/aceptoras y su correcto empalme, generando la maduración aberrante de múltiples genes que activan la maquinaria de degradación del ARN sin sentido (NMD del inglés: *non-sense mediated decay*). (Papaemmanuil et al., 2013) Dentro de los mecanismos propuestos, con datos contradictorios obtenidos mayoritariamente de modelos *in vitro*, la presencia de variantes en *SF3B1* afectaría genes relacionados a las mitocondrias y al transporte de hierro (*SLC25A37*). Mientras que, las alteraciones en *SRSF2* y *U2AF1* generarían la exclusión de exones (del inglés: *exon skipping*) (**Figura 8**) en reguladores epigenéticos como *EZH2*, *BCOR* y *KDM6A*, entre otros, además de desregular la expresión de ciertos microARNs. (Visconte et al., 2015; Kim et al., 2015; Shirai et al., 2015; Aslan et al., 2016)

Además, también se observan perfiles de metilación característicos para cada uno que incluyen regiones promotoras o regulatorias. (Reilly et al., 2019) La afectación diferencial de genes diana y la coocurrencia/exclusión de otras variantes podría explicar que la presencia de alteraciones en *SF3B1* se asocie a buen pronóstico, mientras que, su ausencia o la presencia de variantes en los otros miembros, a uno adverso. (Steensma, 2018)



Reimer y Neugebauer, 2018

Figura 8: Variantes puntuales en factores que componen la maquinaria de corte y empalme y sus posibles consecuencias

Las proteínas SRSF2, SF3B1 y U2AF1 están involucradas en el reconocimiento de sitios de *splicing* en el pre-mARN. Las variantes somáticas en los componentes de la maquinaria de corte y empalme conducen a un *splicing* aberrantes en los progenitores hematopoyéticos en una gran cantidad de transcritos. ESE: *exon splicing enhancer*; SS: *splice site*.

Si bien se desconoce hasta el momento el mecanismo específico de acción, los pacientes que presentan variaciones en *SF3B1* se ven favorecidos con nuevas terapias como el Luspatercept (ACE-536). En los SMD, las altas concentraciones de ligandos de la superfamilia TGF- β (factor de crecimiento transformante β), en la MO, se han relacionado con una eritropoyesis ineficaz. El Luspatercept es una proteína de fusión recombinante que contiene receptores de tipo IIB modificados de activina, unidos al fragmento de región cristalizable (Fc) de la inmunoglobulina humana G1. Esta droga se une a ciertos ligandos de la superfamilia TGF- β , restaurando la eritropoyesis en etapa tardía. Los pacientes analizados en un reciente estudio de fase 3 denominado Medalist, mostraron respuesta eritroide e independencia transfusional. (Fenaux et al., 2019)

2.1.1 *SF3B1*

Ubicación Genómica: chr2:197,388,515-197,435,091(GRCh38/hg38)
Tamaño: 46577 pares de bases
Orientación: cadena molde
Localización cromosómica: 2q33.1
Cantidad de exones: 25

El gen *SF3B1* codifica una proteína de 1304 aminoácidos y 145830 Da, con un dominio N-terminal involucrado en las interacciones proteína-ARN y proteína-proteína, junto con una

región C-terminal que consta de 22 dominios llamados HEAT (Huntingtina, factor de elongación 3, proteína fosfatasa 2A y la levadura PI3-quinasa TOR1) (**Figura 9**). (Papaemmanuil et al., 2011) Este gen está involucrado en el reconocimiento de la secuencia del punto de ramificación intrónica (BPS del inglés: *branch point sequence*) durante la selección del sitio de empalme 3' (3'SS). *SF3B1* es un componente del complejo SF3B que se asocia con el complejo SF3A y U2 snRNP para formar el complejo 17S U2. Por su parte, U2 snRNP se une al BPS a través de SF3B14, y a U2AF2 a través de SF3B1 para estabilizar la interacción de emparejamiento de bases entre U2 snRNA y BPS, lo que lleva a la formación del complejo A spliceosomal. (Anczukow y Krainer, 2016)

Las variantes en el gen *SF3B1* se encuentran principalmente en 4 de los 22 dominios HEAT en la región C-terminal. Se estipula que los cambios fuera de la región HEAT no provocarían un *splicing* aberrante, pero tendrían diferentes efectos sobre las células cancerosas acompañando variaciones *drivers*. (Anczukow y Krainer, 2016) Los cambios en la secuencia de este gen se observan particularmente en pacientes con SMD, afectando alrededor del 25-30% de los pacientes, y en el síndrome de superposición ARSA con trombocitosis (ARSAt). (Visconte et al., 2015) Sin embargo, también se encuentra el *SF3B1* alterado en otras patologías mieloides, incluyendo: leucemia mieloide aguda (5%), mielofibrosis primaria (4%), trombocitemia esencial (3%) y LMMC (5%). (Papaemmanuil et al., 2011) Estas variantes se agrupan entre los exones 12 a 15 del gen, y una variante en particular, la p.Lys700Glu (p.K700E) perteneciente al exón 15, representa un 55%. Otros puntos calientes, en orden decreciente de frecuencia, comprenden a los residuos: K666, R625, H662, E622, del exón 14 e I704 del exón 15 (**Figura 9**). (Papaemmanuil et al., 2011; Visconte et al., 2019)

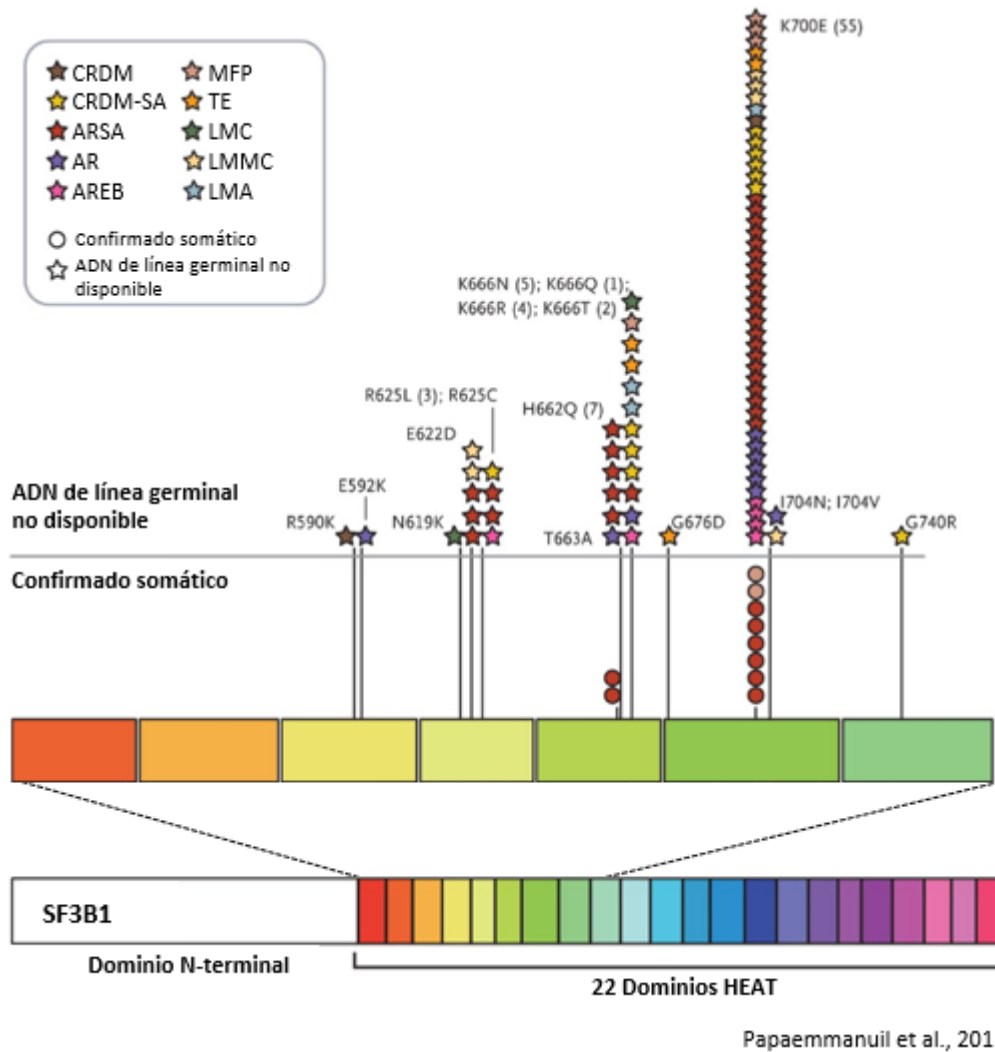


Figura 9: Subconjunto definido de variantes identificadas en *SF3B1* en pacientes con SMD

CRDM: citopenia refractaria con displasia multilineaje; AR: anemia refractaria; SA: sideroblastos en anillo; AREB: AR con exceso de blastos; MFP: mielofibrosis primaria; TE: trombocitemia esencial; LMC: leucemia mieloide crónica; LMA: leucemia mieloide aguda; LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

Las variantes en *SF3B1* se encuentran altamente asociadas con la presencia de sideroblastos en anillo, se encuentran en el 25-30% de pacientes son SMD, con una frecuencia del 65% en pacientes de las categorías: ARSA según la clasificación FAB, y SMD-SA-DU, SMD-SA-DM y ARSA según la clasificación OMS. Los sideroblastos en anillo son acumulaciones de hierro en las mitocondrias de precursores eritroides. Las variaciones conducen a una selección alterada de los 3'SS y al empalme aberrante de genes importantes involucrados en la biosíntesis de hemo y la acumulación de hierro en las mitocondrias que probablemente median el fenotipo del anillo de sideroblastos. (Visconte et al., 2015; Sperling et al., 2017). Particularmente, la transcripción del gen *ABCB7* (del inglés: *ATP Binding Cassette*

Subfamily B Member 7) se ve reducida lo cual altera la homeostasis de hierro mitocondrial ya que codifica para una proteína transportadora de hemo desde la mitocondria hasta el citosol (Figura 10).

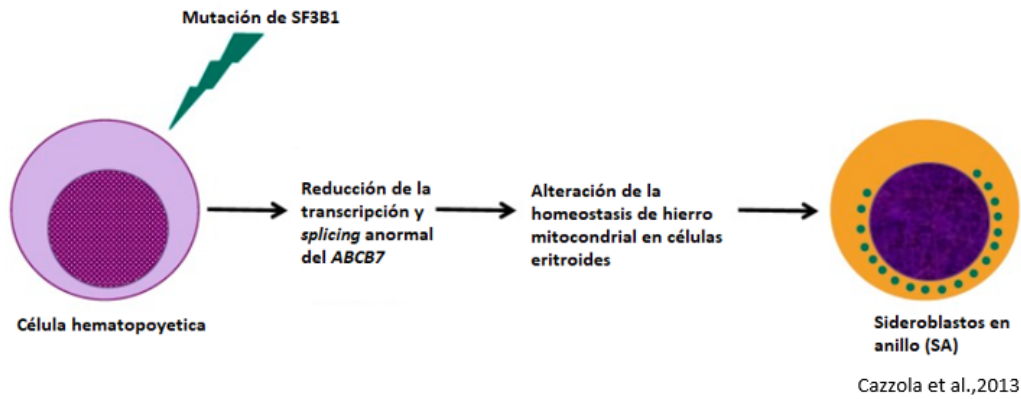


Figura 10: Representación esquemática de la relación entre las variantes somáticas en *SF3B1* y la formación de sideroblastos en anillo en pacientes con SMD

Las alteraciones en *SF3B1* se asocian a buen pronóstico tanto en términos de supervivencia global como en supervivencia libre de leucemia (Figura 11). (Wang et al., 2019) Además se asocian a bajos niveles de hemoglobina, un alto recuento de plaquetas y a menor % de blastos en MO. (Mizuta et al., 2019; Yimpak et al., 2019)

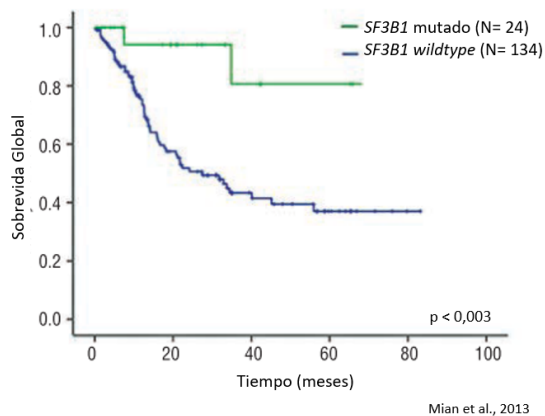


Figura 11: Curvas según Kaplan Meier de supervivencia de pacientes *SF3B1*+ vs. pacientes *SF3B1* wild type

2.1.2 *U2AF1*

Ubicación Genómica: chr21:43,092,956-43,107,587 (GRCh38/hg38)
Tamaño: 14632 pares de bases
Orientación: cadena molde
Localización cromosómica: 21q22.3
Cantidad de exones: 9

El gen *U2AF1*, también llamado *U2AF35*, codifica una proteína de 240 aminoácidos y con un peso molecular de 27872Da y pertenece a la familia de factores de *splicing* SR (proteínas ricas en serina/arginina). El dominio C-terminal rico en serina/arginina de la proteína es necesaria para la interacción con las SR y con los reguladores del corte y empalme TRA (*T cell receptor alpha locus*) y TRA2. La región N-terminal es necesaria para la formación del heterodímero U2AF1/U2AF2. Este gen forma parte de la maquinaria de corte y empalme que codifica para la pequeña subunidad del complejo de factor auxiliar U2 necesario para la unión de U2- snRNP al BPS del pre-ARNm. (Wu et al., 2013) El gen se encuentra alterado con una frecuencia del 8-12% en pacientes con SMD sin sideroblastos en anillo, particularmente, en pacientes de sexo masculino. (Wang et al., 2019) Ocurre raramente en otros tumores (adenocarcinomas ductales pancreáticos 2% o pulmonares 3%). (Jenkins y Kielkopf, 2017)

Las variantes en el gen *U2AF1* ocurren con mayor frecuencia en pacientes más jóvenes (<40 años) seguidos por pacientes entre 40-59 años y los mayores a 60 años con aún menor frecuencia. Sin embargo, la relación entre edad y la alteración del gen es un tema controversial. (Wu et al., 2013; Li et al., 2017). Las alteraciones de *U2AF1* promueven un aumento del *exón skipping*. (Przychodzen et al., 2013; Sperling et al., 2017) Según un estudio realizado en el 2015 en ratones por Shirai et al., los animales *U2AF1+* mostraron una hematopoyesis alterada y cambios en el empalme del pre-ARNm en células progenitoras hematopoyéticas. (Shirai et al., 2015)

Como detalla la **figura 12** las alteraciones en *U2AF1* se encuentran en dos dedos de zinc altamente conservados en esta proteína. (Graubert et al., 2012) Las mismas poseen puntos calientes definidos, Ser34 y Gln157, en los exones 2 y 6, respectivamente. (Wu et al., 2013) La variación en *U2AF1* se encuentra acompañada normalmente en orden decreciente por *ASXL1*, seguido por *RUNX1* y *DNMT3A*. (Wu et al., 2013; Tefferi et al., 2018)

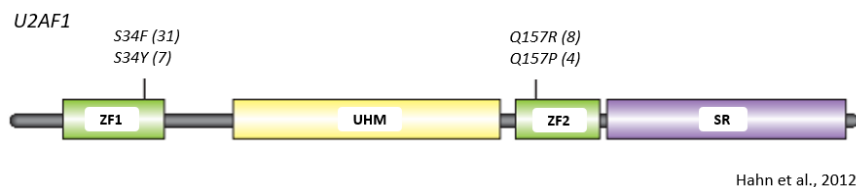


Figura 12: Sitios calientes y sus variantes específicas en *U2AF1*

Se observan los dos aminoácidos calientes Ser34 o Gln157 alterados que residen en los dominios de dedo de zinc 1 (ZF1) y ZF2; SR: dominio rico en arginina y serina; UHM: Dominio de homología para U2AF

Se asocia con una peor supervivencia, tanto en pacientes de alto riesgo como de bajo riesgo, lo cual implica un pronóstico adverso (**Figura 13**). (Li et al., 2017; Saygin et al., 2018) Se sugiere que la alteración de *U2AF1* puede ser un factor pronóstico independiente para la supervivencia global en pacientes con SMD (<50 años). (Wu et al., 2013) Además los pacientes *U2AF1+* se caracterizan por tener mayor % de blastos en MO, lo cual aumenta la probabilidad de progresión a leucemia mieloide aguda. (Yimpak et al., 2019)

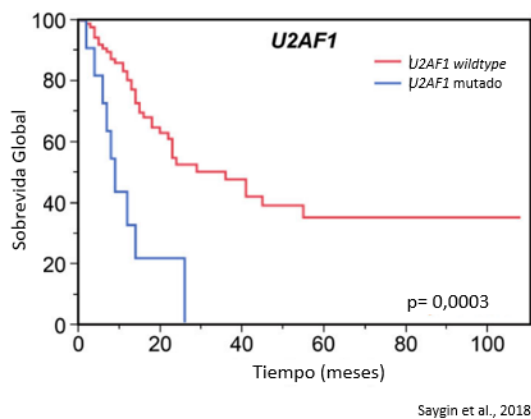


Figura 13: Supervivencia de pacientes con *U2AF1* + vs. pacientes con *U2AF1 wild type*

2.1.3 *SRSF2*

Ubicación Genómica: chr17:76,734,115-76,737,629 (GRCh38/hg38)
Tamaño: 3515 pares de bases
Orientación: cadena molde
Localización cromosómica: 17q25.2
Cantidad de exones: 4

El *SRSF2*, también llamado *SC35* y *SRp30b*, codifica para una proteína SR, con un tamaño de 221 aminoácidos y con un peso molecular de 25476Da. Este gen forma parte de la maquinaria de corte y empalme, juega un papel en la precisión del proceso y en la prevención de omisión de exones. Contiene un motivo de reconocimiento para su unión al ARN (RRM del inglés: *RNA recognition motif*) y un dominio rico en Arginina-Serina para la interacción con otras proteínas SR. (Lasho et al., 2012; Patnaik et al., 2013) Este factor de *splicing* es un regulador crucial en la conformación y organización del espliceosoma, y en la identificación de sitios de empalme tanto constitutivos como alternativos.

Este factor se ha encontrado alterado en el 15% de los pacientes con SMD afectando en mayor proporción a pacientes de mayor edad y de sexo masculino. (Wang et al., 2019) Se presenta con una mayor frecuencia en LMMC (28-45%), disminuyendo en anemia refractaria

(12%), en anemia refractaria con sideroblastos en anillo (6%), en LMA/SMD (7%) y, rara vez, en LMA *de novo* (1%). (Lasho et al., 2012; Wu et al., 2012)

La presencia de variantes puntuales heterocigotas en *SRSF2* en pacientes con SMD se asocian con eventos de *splicing* alternativo, principalmente, relacionados con la omisión de exones (Meggendorfer et al., 2012; Patnaik et al., 2013) El codón Prolina (P)95 o sus secuencias adyacentes, ubicados en la unión entre los dominios RRM y SR funcionales, han sido identificados como *hot-spot* de variantes. (Hanssens et al., 2014; Lin et al., 2014) En la mayoría de los casos, la sustitución nucleotídica generando el cambio del residuo P95 o P96 original por: P95H (c.284C>A), P95L (c.284C>T), P95R (c.284C>G) y P96L (c.287C>T), se asociaría con un cambio de afinidad y una alteración de la conformación del espliceosoma. (Visconte et al., 2012)

La alteración en *SRSF2* se asocia con un pronóstico adverso evidenciado en la disminución significativa en la sobrevida global y en el tiempo de progresión a LMA. Además, se asocia con niveles de hemoglobina más altos y suele coexistir con variantes en otros genes, por ej, en *RUNX1*, *ASXL1*, *IDH1*, e *IDH2*, lo cual confiere un pronóstico peor. (Wu et al., 2013; Aujla et al., 2018; Wang et al., 2019)

Objetivos e Hipótesis

OBJETIVOS

De acuerdo a lo expuesto y teniendo en cuenta que la presencia de variantes en genes del espliceosoma resultan en fenotipos distintivos que condicionan el diagnóstico, el pronóstico y la selección de terapias en los pacientes con Síndromes Mielodisplásicos, el **objetivo general** del presente trabajo consiste en la detección de variantes en los exones calientes de los genes *SF3B1* y *U2AF1*, miembros de la maquinaria de corte y empalme, en pacientes con esta patología.

Por lo tanto, los **objetivos específicos** abarcan:

- La puesta a punto de técnicas de tamizaje (PCR-SSCP) para la detección de variantes.
- La generación de controles positivos de las variantes más frecuentes que afectan a los exones 15 del *SF3B1* y a los exones 2 y 6 del *U2AF1*, mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.
- La selección de la población de pacientes con Síndromes Mielodisplásicos a estudiar.
- La detección de las variantes en la población seleccionada y su confirmación mediante secuenciación automática.
- La evaluación e interpretación de los resultados obtenidos.

HIPÓTESIS

La presencia de variantes en los genes SF3B1 y U2AF1, miembros de la maquinaria de corte y empalme, se asocia con parámetros de impacto clínico en pacientes con Síndromes Mielodisplásicos.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Poblaciones estudiadas

El Laboratorio de Genética Hematológica, perteneciente al IMEX-CONICET/ANM, cuenta con un banco de muestras de ADN de más de 200 pacientes con SMD, diagnosticados entre octubre de 1995 a junio de 2019, provenientes de diversos centros de atención médica de nuestro país. Del mismo, se seleccionaron al azar 55 muestras de pacientes con SMD, no portadores de mutaciones en el gen *SRSF2*. La población de 24 pacientes *SRSF2+* se incorporó a fines comparativos. (Camacho et al., Congreso SAH 2015; Serale et al., Congreso SAH 2017)

Con el objetivo de determinar la asociación de la presencia de las variantes evaluadas con diversos factores clínicos se relevaron datos clínicos como: clasificación según la FAB (Bennett et al., 1982) y la OMS 2008 (Vardiman et al., 2009), edad, sexo, niveles de hemoglobina, recuentos de plaquetas, de neutrófilos y el porcentaje de blastos en médula ósea, además del cariotipo, los grupos de riesgo y la evolución clínica.

El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina (T.I. N° 13063/19/X). Por ende, se mantuvo la confidencialidad de toda la información de este trabajo según pautas de la legislación nacional e internacional vigente. El nombre de los pacientes, cuyas muestras fueron solidariamente autorizadas a utilizar, no ha sido almacenado en ningún registro ni revelado en ninguna publicación o presentación de los resultados del estudio.

2. Procesado de Muestras

Se extrajo el ADN genómico de células nucleadas de MO, obtenidas mediante punción y aspiración de MO (PAMO) de cresta iliaca o esternal, y/o SP obtenida por punción venosa anticoaguladas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 5% v/v). En casos donde fue necesario se realizó, además, una extracción de ADN genómico de mucosa bucal (MB).

Previo a la extracción de ADN, las muestras fueron tratadas como detalla la **figura 13**.

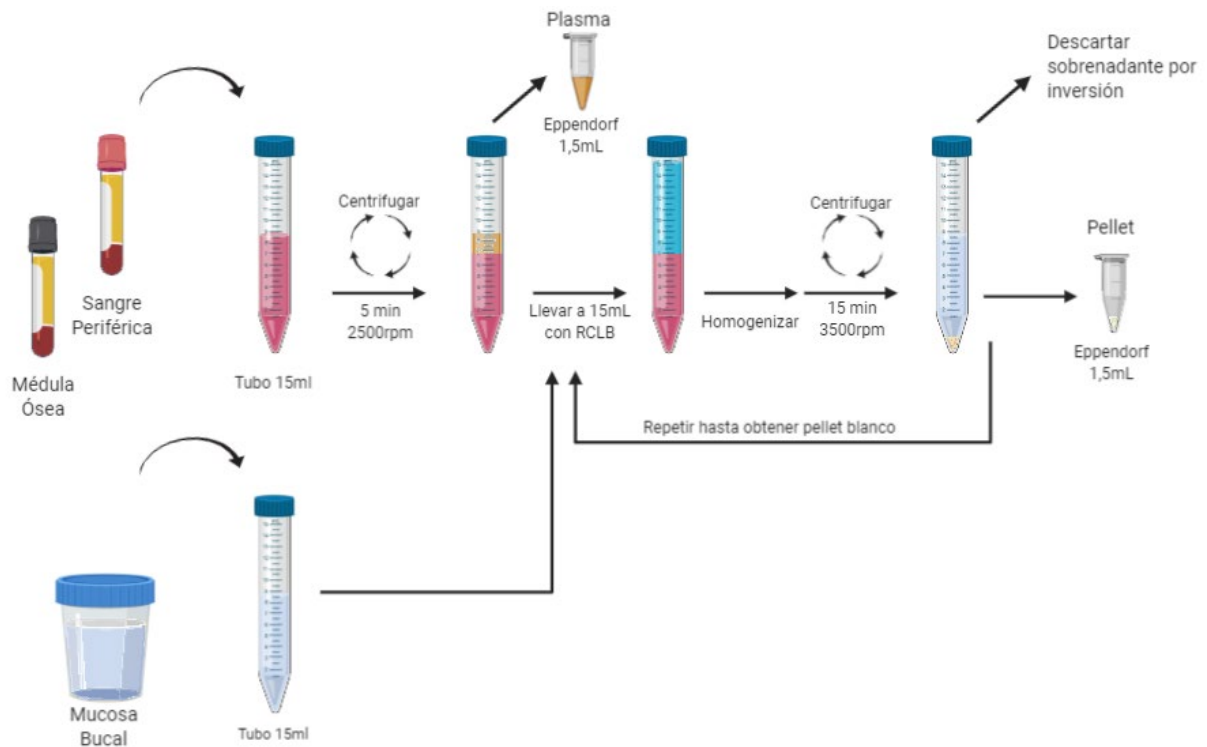


Figura 13: Protocolo de lisis de glóbulos rojos - Tratado de muestras

La extracción comenzó con una centrifugación inicial de las muestras de MO y SP, para separar el plasma de las mismas. Luego se efectuaron lavados sucesivos con RCLB (del inglés: *red cell lysis buffer*), una solución de lisis de glóbulos rojos compuesta por Tris pH 7,5 10mM, MgCl₂ 5mM y NaCl 10mM, hasta obtener las células mononucleares. Los lavados consistieron en agregar RCLB frío al tubo y homogeneizar por 15 minutos en un homogeneizador marca Bioelec a temperatura ambiente. Luego se procedió a centrifugar las muestras por 15 minutos a 3500 rpm y se descartó el sobrenadante. Se repitió 2-3 veces el procedimiento hasta visualizar un *pellet* celular blanco sin glóbulos rojos.

2.1 Extracción/ Purificación de ADN mediante columnas

Para obtener el material genético de los pellets se utilizaron columnas de extracción/purificación de ADN de la marca Macherey-Nagel modelo *NucleoSpin Blood*. Se siguió el protocolo establecido por la empresa fabricante y, una vez obtenido el ADN, el mismo fue conservado en la heladera.

2.2 Análisis cuantitativo por espectrofotometría

La concentración, en ng/ μ L, de las muestras extraídas se estableció utilizando un espectrofotómetro de micro volúmenes, marca DeNovix modelo DS-11, en la región del ultravioleta (UV) a 260 y 280 nm. El equipo también calcula la relación A 260/ A 280 como parámetro de pureza de la muestra, relativa a proteínas, siendo óptima entre 1,5- 2,0.

3. Estudio de Variantes

3.1 Algoritmo de análisis

Se decidió iniciar con el exón 15 del *SF3B1*, debido a la presencia del sitio caliente p.Lys700Glu (p.K700E), y luego continuar con el exón 2 del *U2AF1*. Se prosiguió con el exón 14 del *SF3B1* y, finalmente acorde a la disponibilidad de los *primers*, se finalizó con el exón 6 del *U2AF1*.

El estudio de las variantes de secuencia en el exón 15 del gen *SF3B1* y en los exones 2 y 6 del gen *U2AF1* se realizó a partir de ADN genómico mediante la amplificación por PCR punto final del fragmento de interés, haciendo uso de los *primers* detallados en la **tabla 6**, y posterior tamizaje mediante la técnica de SSCP (del inglés: *Single Strand Conformation Polymorphism*). Mientras que, la región incluyendo al exón 14 del gen *SF3B1* fue amplificada por PCR (**Tabla 6**) y analizada directamente por secuenciación automática.

Tabla 6: Secuencia de *primers* utilizados para la amplificación por PCR

| Gen | Exón | Secuencia de <i>primers</i> (5'→3') | Secuencia de referencia | Posición del fragmento amplificado ¶ | Tamaño del (pb) | Referencia |
|--------------|------|--|-------------------------|--------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| <i>SF3B1</i> | 14 | Fw: CCAACTCATGACTGCCTTCTT Rv: GGGCAACATAGTAAGACCCTGT RvS: CAACTTACCATGTTCAATGATTTC | NG_032903.2 | chr2:197402489-197402863 | 375 | (Malcovati et al., 2011) |
| | 15 | Fw: TTGGGGCATAGTAAAACCTG Rv: AAATCAAAGGTAATTGGTGGA | NG_032903.2 | chr2:197401958-197402166 | 209 | (Malcovati et al., 2011) |
| <i>U2AF1</i> | 2 | Fw: TGCTGCTGACATATCCATGTG | NG_029455.1 | chr21:43104311-43104471 | 161 | <i>Ad hoc</i> |
| | 6 | Fw: TATTAAAGCGTGGATGGCAAGC Rv: ACGTCACTGGCCACTCCTCACTCAC | NG_029455.1 | chr21:43094630-43094832 | 203 | (Wu et al., 2012) <i>Ad hoc</i> |

Fw: Forward; Rv: Reverse; RvS: Reverse utilizado para la secuenciación. ¶ Genoma de referencia: GRCh38/hg38

Las condiciones estándar de reacción utilizadas fueron: *buffer* 1X, 150 ng de ADN, 125 μ M de dNTPs, concentración de *primers* específica para cada protocolo (**Tabla 7**),

GoTaq®DNA polimerasa (5U/μL) 0,02U/μL, en un volumen final de 25μL. Las condiciones generales de ciclado se encuentran detalladas en la **tabla 8**.

Tabla 7: Concentración y temperatura de *annealing* de los *primers* utilizados para la amplificación por PCR

| Gen | Exón | Concentración de primers | T de annealing |
|--------------|------|--------------------------|----------------|
| <i>SF3B1</i> | 14 | 0,20μM | 59,5°C |
| | 15 | 0,40μM | 57,0°C |
| <i>U2AF1</i> | 2 | 0,50μM | 55,5°C |
| | 6 | 0,25μM | 64,0°C |

Tabla 8: Ciclado estándar utilizado en la amplificación de los fragmentos de interés

| | Temperatura (°C) | Tiempo | n° de Ciclos |
|---------------------------|-------------------------------|--------|--------------|
| Desnaturalización Inicial | 95 | 3 min | 1 |
| Amplificación | 94 | 30 s | 35 |
| | ¶ T <i>annealing</i> adecuada | 45 s | |
| | 72 | 45 s | |
| Elongación Final | 72 | 5 min | 1 |
| Pausa | 15 | - | - |

¶ T *annealing* detallada en **tabla 7**

Los productos amplificados fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa. Para ello se realizó un gel de agarosa al 2,5% (p/v): 1g de agarosa, 40μL *buffer* TBE 0,5X y 1,5 μL de BrEt. Se sembraron 6μL del producto de PCR en el gel y se lo sometió a una electroforesis en *buffer* TBE 0,5X (TBE 1X: Tris/HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) por, aproximadamente, 20 minutos a 100V.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se posó sobre un transiluminador UV donde se evidenció la banda única correspondiente a cada fragmento amplificado.

3.2 Construcción de controles positivos

Para ajustar las condiciones óptimas que permitieran aplicar la técnica de SSCP, se construyeron controles positivos de los sitios calientes de los exones de interés mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. Esta metodología es una herramienta de edición génica para producir cambios intencionados en la secuencia de ADN de un gen. La misma utiliza un *primer* 100% complementario a una región predeterminada, con la excepción del cambio de base correspondiente a la variación que se quiere generar.

Por lo tanto, los *primers* mutagénicos, detallados en la **tabla 9**, fueron diseñados para cada reacción de PCR con el fin de obtener los cambios de base en heterocigosis

correspondientes a las sustituciones más frecuentes. Además, se tuvo en consideración el efecto indeseado de la Taq polimerasa, la cual adiciona una adenina en el extremo 3' terminal.

Tabla 9: Oligonucleótidos mutagénicos utilizados en la mutagénesis sitio dirigida por PCR

| Gen | Exón | Secuencia de primers (5'->3') | Secuencia de referencia (¶) | Hotspot de mutaciones | Cambio nucleotídico | Posición | Tamaño del producto (pb) |
|--------------|------|--|-----------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>SF3B1</i> | 15 | Fw*: GAGCAGCAGG <u>AA</u> GTTCCGGAC | NG_032903.2 | p.K700E | AAA> <u>G</u> AA | chr2:197401958-197402119 | 162 |
| <i>U2AF1</i> | 2 | Rv*: GCAACCGAAAGCACCTGTCTC Rv*: GCAACCGATAGCACCTGTCTC | NG_029455.1 | p.S34F p.S34Y | TCT>TIT TCT>TAT | chr21:44524448-44524581 | 134 |
| | 6 | Rv*: CTCATACGGACGGCAGCAGGC Rv*: CTCATACCGACGGCAGCAGGC | NG_029455.1 | p.Q157P p.Q157R | CAG>CCG CAG>CGG | chr21:44514770-44514948 | 179 |

En los primers mutagénicos se subraya el codón de interés, mientras que el cambio nucleotídico particular se resalta en negrita y subrayado. Rv: reverse, Fw: forward. (¶): Genoma de referencia: GRCh38/hg38

La mutagénesis comenzó con una amplificación por PCR de un control normal utilizando los primers Fw y Rv correspondientes, mencionados previamente (**Tabla 6**). Este primer producto se utilizó como sustrato para la segunda reacción incluyendo el mutagénico Fw* o Rv* (**Tabla 9**) y su respectivo Rv o Fw (**Tabla 6**).

Luego, cantidades equilibradas del amplicón mutagénico y del producto Fw-Rv se mezclaron y reamplificaron utilizando los primers Fw y Rv adecuados. Además, la reacción de amplificación se enriqueció con cantidades crecientes (0; 0,1 y 0,2 µM) del oligonucleótido mutagénico para favorecer la amplificación del control deseado (**Figura 14**).

Finalmente, el producto de amplificación fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa en las condiciones anteriormente mencionadas y se seleccionó el amplímero correspondiente a la banda de interés. El mismo fue eluído en 100µL de agua libre de nucleasas y almacenado para su uso posterior a -20°C. El resultado final de la mutagénesis fue corroborado mediante secuenciación automática.

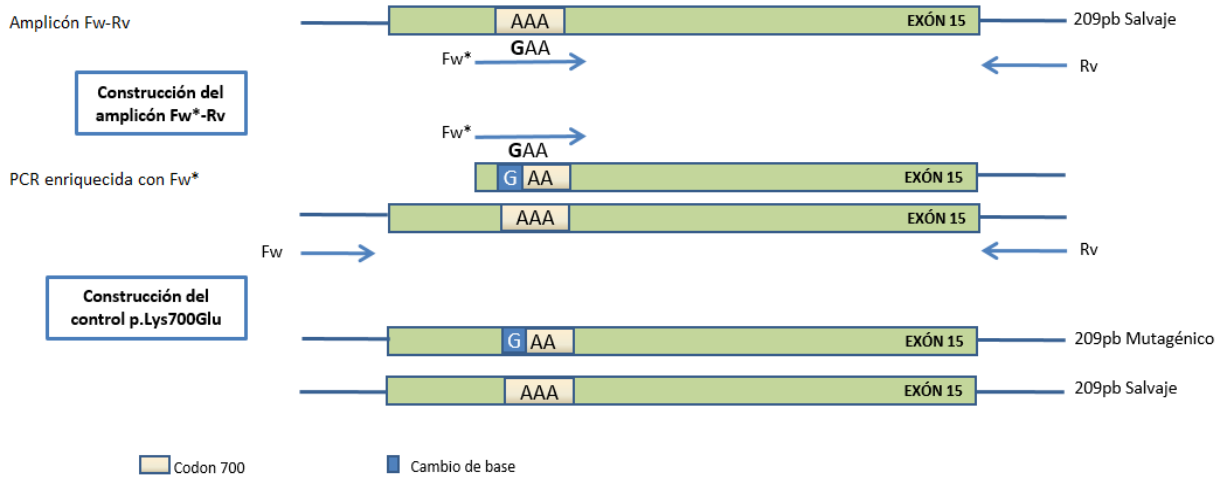


Figura 14: Representación esquemática de la construcción del control p.Lys700Glu (p.K700E) del exón 15 del *SF3B1* mediante mutagénesis sitio-dirigida haciendo uso de PCRs

3.3 Técnica de Polimorfismos Conformacionales de Hebra Única

El SSCP es una técnica de *screening* de variantes capaz de identificar la sustitución de un sólo nucleótido en un segmento de ADN. El método se basa en la migración electroforética del ADN de simple cadena en un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Es útil para la detección de variantes de secuencia ya que la hebra de ADN simple adopta una conformación espacial particular según su secuencia nucleotídica. Al variar una de las bases, se obtiene una conformación diferente y esto genera un cambio en la migración del ADN simple cadena en el gel. (Orita et al., 1989; Humphries et al., 1997)

El producto de amplificación obtenido a partir de PCR punto final fue analizado utilizando la técnica mencionada. Las condiciones del gel de poliacrilamida y las condiciones de corrida fueron optimizadas, para cada región a analizar, a fin de discriminar la presencia de variantes según su conformación.

El producto de PCR a analizar se preparó de la siguiente manera: 3µl de producto PCR + 2µl de solución desnaturizante (*buffer* SSCP) (0,05% de xilen-cianol, 0,05% de colorante azul de bromofenol y 20mM de EDTA en formamida al 95% v/v). Se realizó una desnaturalización por calor de los productos (95°C durante 8 min) e, inmediatamente, se enfriaron en hielo. Luego fueron sometidos a una electroforesis en un gel de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) a una concentración adecuada (**Tabla 10**) en una solución *buffer* TBE 1X, a 200V – 4 °C. Las condiciones de corrida en el sistema Mini-Protean III (7,3

x 10,2 x 0,1cm) (BioRad, California, EEUU), dependientes de las características del fragmento, se detallan en la **tabla 10**.

Tabla 10: Condiciones del SSCP para cada producto de PCR

| Gen | Exón | Tamaño del producto (pb) | Concentración del gel (%) | Tiempo |
|--------------|------|--------------------------|---------------------------|----------|
| <i>SF3B1</i> | 15 | 209 | 14 | 3h 30min |
| <i>U2AF1</i> | 2 | 161 | 14 | 2h 30min |
| | 6 | 203 | 13 | 2h 45min |

3.3.1 Protocolo de tinción con nitrato de plata

El revelado del SSCP se realizó mediante una tinción argéntica. Para ello, los vidrios se desmontaron y el gel fue sometido por 10 min en 200mL de la solución fijadora (etanol 10% v/v; ácido acético 0,5% v/v). Al finalizar los 10 min se descartó la solución y se incubó en 200mL de solución de nitrato de plata (AgNO_3 0,2% p/v) por 20 min, agitando suavemente para evitar deposiciones concentradas de plata sobre el gel. Luego se realizaron 2 lavados con agua bidestilada, se agregaron 200mL de solución reveladora compuesta de NaOH 1,5% p/v; formaldehído 0,1% v/v, y se agitó de manera constante hasta visualizar bandas distintivas en el gel. El revelado es detenido con el agregado de agua bidestilada. (Benbouza et al., 2006) Para el visualizado final, se posó el gel sobre un transiluminador de luz blanca y se documentaron los resultados.

Los patrones que difieren del *wild type* y/o que siguen el patrón de bandas de los controles positivos son sugerentes de un cambio nucleotídico que se confirman mediante secuenciación automática del producto de PCR.

3.4 Técnicas de secuenciación de ADN

3.4.1 Estrategia de secuenciación de primera generación: Método de Sanger

Los patrones atípicos observados mediante la técnica de SSCP y el fragmento de amplificación del exón 14 del gen *SF3B1* fueron evaluados mediante secuenciación automática utilizando el servicio de Macrogen (<https://dna.macrogen.com/>).

El protocolo consiste en la síntesis de ADN *in vitro* por una ADN polimerasa usando un templado simple cadena y un oligonucleótido cebador. La síntesis finaliza por la incorporación

de un análogo nucleotídico (dideoxinucleótido, ddNTP) que no permite continuar la polimerización. (Sanger et al., 1977)

Los archivos recibidos luego de la secuenciación *standard* por *Capillary Electrophoresis Sequencing* (CES) bajo la plataforma *ABI 3730xl* fueron analizados utilizando el software *MutationSurveyor* y el *Chromas* (versión 2.6.6).

3.4.2 Tecnología de secuenciación de nueva generación: NGS

El NGS es una técnica que realiza la secuenciación de millones de pequeños fragmentos de ADN en paralelo. El análisis bioinformático se utiliza para alinear estos fragmentos, mapeando las lecturas individuales al genoma humano de referencia. Cada región se secuencia reiteradas veces, proporcionando una gran profundidad para entregar datos precisos y una idea de la variación inesperada del ADN. El NGS puede usarse para secuenciar genomas completos o restringirse a áreas específicas de interés. (Behjati y Tarpey, 2013)

Se utilizó el equipo *MiSeq* de *Illumina* que posee la empresa *Biosystems S.A.* para efectuar la secuenciación dirigida (del inglés: *targeted gene sequencing*) con paneles mieloides, a fin de confirmar los hallazgos obtenidos en uno de los pacientes. El kit comercial seleccionado fue el *AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel* diseñado para evaluar 40 genes asociados (526 amplicones), 23 en regiones calientes y 17 completos. Los resultados pertinentes se obtuvieron gracias a la colaboración establecida con la *Bioquímica Marilina Rahhal* del Hospital de Alta Complejidad en Red “El Cruce” ubicado en Florencio Varela, Buenos Aires.

4. Análisis Bioinformático

La selección e identificación de los exones, promotores, sitios blancos de *primers* y los alineamientos de secuencia se realizaron usando los programas *SeqBuilder*, *EditSeq*, *MapDraw* y *MegAlign* (*LaserGene V 11.1.0*, *DNASTAR*, Inc.).

El diseño de oligonucleótidos se efectuó mediante el uso del algoritmo *BLAST* (*basic local alignment search tool*), al cual se accede por medio del link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, o mediante la aplicación *Primer3Plus* disponible a través del link <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>. Las propiedades específicas de los *primers* seleccionados se evaluaron mediante el *software* *IDT OligoAnalyzer 3.1* accesible a través del link <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>, verificando la posibilidad de formación de estructuras *hairpin*, homodímeros y heterodímeros.

Las reacciones de PCR se analizaron en el programa UCSC Genome *Bioinformatics Site* para observar la correspondiente PCR *in silico* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

La identificación de las variantes se realizó mediante la aplicación del programa *Mutation Surveyor (SoftGenetics)* y su clasificación, consultando bases de datos como COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), cBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org/>) y aplicando algoritmos funcionales como SIFT, Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>) y PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). El sistema Human Splicing Finder (HSF), accesible por la página web <http://www.umd.be/HSF/>, fue utilizado para identificar y predecir el efecto de las mutaciones en los *motifs* de empalme; incluidos los sitios dadores y aceptores, el punto de ramificación y las secuencias auxiliares exónicas ESE (del inglés: *Exonic Splicing Enhancers*) y ESS (del inglés: *Exonic Splicing Silencers*) para mejorar o reprimir el empalme, respectivamente. El análisis particular de posibles ESE se realizó utilizando el programa ESEfinder (<http://krainer01.cshl.edu/tools/ESE2/>).

Para la determinación de las frecuencias alélicas de las variantes encontradas se utilizó el programa GnomAD, el cual se puede acceder a través del enlace <https://gnomad.broadinstitute.org/>.

Finalmente, para establecer la importancia relativa de los aminoácidos involucrados en las proteínas estudiadas se utilizó el software *online Universal Evolutionary Trace*. Un programa diseñado por *Baylor College of Medicine* accesible por la página, <http://mammoth.bcm.tmc.edu/uet/>.

5. Análisis Estadístico

La información que se obtuvo se analizó utilizando el programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 24.00 (SPSS, IBM, Chicago, EE.UU.) y el GraphPad Prism versión 5. La estadística descriptiva se presenta como: 1) frecuencias absolutas y frecuencias relativas como porcentajes, para los datos cualitativos y 2) media \pm desvío estándar (DE) y/o mediana y rango intercuartílico (RIQ), para los datos cuantitativos.

Los diferentes análisis estadísticos de los datos incluyeron: 1) test de *t* o de *Mann-Whitney*: para el estudio de variables continuas (parámetros clínicos), dependiendo de las características de la variable a analizar (cumplimiento o no de normalidad y homocedasticidad);

2) método según *Kaplan-Meier* y test de *Log-Rank* (Mantel Cox): para la realización y comparación de curvas de supervivencia. (Kaplan y Meier, 1958) Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$ y una tendencia entre 0,05 y 1,00.

Resultados

RESULTADOS

1. Características clínicas de la población estudiada

Se analizaron un total de 55 pacientes con SMD provenientes de diferentes instituciones argentinas de salud, al momento del diagnóstico y/o durante el seguimiento. Las características clínicas de la población de pacientes con SMD se detallan en la **tabla 11**.

Tabla 11: Características clínicas de la población de pacientes con SMD (*SRSF2*-)

| Características | | |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Edad (años) | Media \pm DE | 63,8 \pm 13,9 |
| | Mediana (rango) | 68,0 (21,0-85,4) |
| Relación de Sexos | Masculino/Femenino | 31/24: 1,3 |
| Nivel de Hb (g/dL) | Media \pm DE | 9,3 \pm 2,2 |
| | Mediana (rango) | 9,0 (4,0 - 15,1) |
| Recuento de Pq (μ L) | Media \pm DE | 182281 \pm 167133 |
| | Mediana (rango) | 127300 (17000 - 999999) |
| Recuento de N (μ L) | Media \pm DE | 3827 \pm 7436 |
| | Mediana (rango) | 1845 (250 - 49504) |
| Blastos en MO (%) | Media \pm DE | 4,2 \pm 6,2 |
| | Mediana (rango) | 1,8 (0,0 - 19,0) |
| Cariotipo, n (%) | Normal | 35 (63,6) |
| | Alterado | 20 (36,4) |
| | NE | - |
| Seguimiento (meses) | Mediana (rango) | 15,4 (0,5 - 161,5) |
| Sobrevida Global | Mediana, meses | 55,6 (IC95% 39,0-72,1) |
| | Eventos, n (%) | 24 (43,6) |
| Evolución a LMA | Sobrevida libre (25%), meses | 26,1 |
| | Eventos, n (%) | 11 (20,0) |
| Riesgo IPPS-R | Bajo (\leq 3,5), n (%) | 34 (61,8)¶ |
| | Alto ($>$ 3,5), n (%) | 21 (38,2) |
| | Muy bajo | 7 |
| | Bajo | 21 |
| | Intermedio | 10 |
| | Alto | 8 |
| Riesgo CPSS (LMMC-MP) | Muy alto | 6 |
| | NE | 1 |
| | Int-1 | 1 |
| Tratamientos Recibidos | Int-2 | 1 |
| | Agentes hipometilantes, n (%) | 22/43 (51,2) |
| | EPO, n (%) | 14/52 (26,9) |
| | TCPH, n (%) | 2 (3,6) |

DE: desvío estándar; Hb: hemoglobina; Pq: plaquetas; N: neutrófilos; LMA: leucemia mieloide aguda; LMMC-MP: leucemia mielomonocítica crónica-mieloproliferativa; EPO: eritropoyetina; IC: intervalo de confianza; TCPH: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas; NE: no evaluable. ¶: el paciente NE presentaba $<$ 5% blastos y los restantes parámetros evaluables sumaban 1 punto.

Del total de los pacientes, 24 fueron mujeres y 31 hombres con una relación de sexo masculino/femenino de 1,3 (31/24). La edad mediana fue de 68 años (rango 21,0-85,4 años) con una media de 63,8 \pm 13,9 años. Los pacientes fueron clasificados según la Organización Mundial de la Salud del 2008 acorde con la **tabla 12** concentrando la gran mayoría en CRDU-M/5q-/NE.

Tabla 12: Clasificación de la población con SMD según la OMS 2008

| Población | | 55 <i>SRSF2</i> - | 24 <i>SRSF2</i> + (Serale et al. 2017) |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------|---|
| Clasificación (OMS 2008) n (%) | 5q-/CRDM/CRDU/CR_NE | 29 (52,7) | 3 (12,5) |
| | AREB-1 | 2 (3,6) | 3 (12,5) |
| | AREB-2 | 9 (16,4) | 5 (20,9) |
| | CRDM-SA/CRDU-SA | 6 (10,9) | 2 (8,3) |
| | LMMC-1 | 6 (10,9) | 9 (37,5) |
| | LMMC-2 | 3 (5,5) | 2 (8,3) |
| SMD secundarias n (%) | | 6 (10,9) | - |

En negrita se muestra la clasificación de los 55 pacientes con SMD *SRSF2*- analizados en este trabajo. A su derecha se muestra la clasificación de los pacientes con SMD *SRSF2*+ analizados por Serale et al. SAH 2017.

A fines comparativos, se incluyeron 24 pacientes con SMD portadores de variantes en el exón 2 del gen *SRSF2* abarcando el codón caliente P95, previamente analizados en el laboratorio por Camacho et al., SAH 2015; Serale et al., SAH 2017. El grupo mostró una edad media de 67,2 años con una relación de sexo M/F de 1,6 (15/9). Se clasificaron según la OMS 2008, reflejados en la **tabla 12** y el 62,5% de los individuos se definieron como de alto riesgo debido a su puntaje $\geq 3,5$ en el IPSS-R. Además, presentaron una mediana de seguimiento de 24,6 meses (rango 0,5-80,0) y una mediana de supervivencia de 28 meses (IC95% 21,2-34,9) con un total de 15 eventos de muerte. Finalmente, un 37,5% (9/24) de los pacientes evolucionaron a leucemia mieloide aguda.

2. Detección de variantes en los exones 14 y 15 del gen *SF3B1*

2.1 Análisis de variantes en el exón 14 del *SF3B1*

2.1.1 Puesta a punto de la metodología

La puesta a punto de la técnica de PCR comenzó con una titulación de *primers* (Fw y Rv) correspondientes al exón 14. La secuencia nucleotídica de estos cebadores se encuentra en la sección 3,1 de materiales y métodos. En la **figura 15** se puede observar que, inicialmente, la titulación consistió en incrementos de 0,2-0,8 μM a 57°C. De esta amplificación se obtuvo una banda de 375pb correspondiente al exón 14 pero con productos inespecíficos y exceso de *primers*. A fin de mejorar la especificidad, se repitió la titulación a 58°C y 59°C modificando los rangos de la titulación. Finalmente, se decidió aumentar a 59,5°C y utilizar una concentración de *primers* de 0,2 μM . Esta última condición se aplicó en un total de 46 muestras *SRSF2*- y *U2AF1* exón 2 (-).

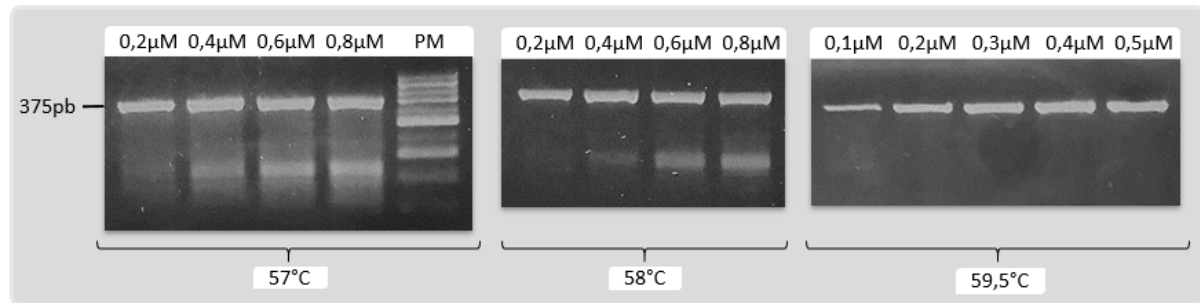


Figura 15: Puesta a punto de la PCR para el exón 14 del *SF3B1*

Titulación de primers (Fw y Rv) a 57, 58 y 59,5°C. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (p/v) en TBE 0,5X y tinción con BrEt. PM: estándares de peso molecular CincuentaMarker.

Luego de amplificar las muestras, se evaluó el producto de PCR mediante secuenciación automática para detectar la presencia o ausencia de variantes en la región de interés. La secuenciación de este exón se llevó a cabo con el primer *forward* utilizado en la PCR inicial. Además, en ciertos casos, se utilizó también un primer *reverse* adicional (RvS) ya que la presencia de una secuencia de 16 timinas afectaba el resultado obtenido con el *primer* original de amplificación.

2.1.2 Variantes encontradas y su interpretación

Se analizaron las muestras *SRSF2*- y *U2AF1*- conformando un total de 41 pacientes. Se detectaron 7 individuos que poseían variaciones en su secuencia diferentes entre sí cuyo resultado mediante secuenciación automática se detalla en la **figura 16**. Estas variantes fueron identificadas como: p.Pro615His (p.P615H), p.Met620Ile (p.M620I), p.Arg625Cys (p.R625C), p.Val635Glu (p.V635E), p.His662Gln (p.H662Q), p.Thr663Ile (p.T663I) y p.Lys666Asn (p.K666N).

A fin de caracterizar los hallazgos, se consultaron diversas bases de datos (COSMIC, ClinVar, cBioportal). Cinco variantes ya habían sido previamente reportadas como patogénicas, mientras que las restantes p.M620I y p.V635E, al 9 de Enero del 2020, no se encontraron detalladas en ninguna de las bases de datos examinadas. La totalidad de la información obtenida se encuentra en el **anexo 1**.

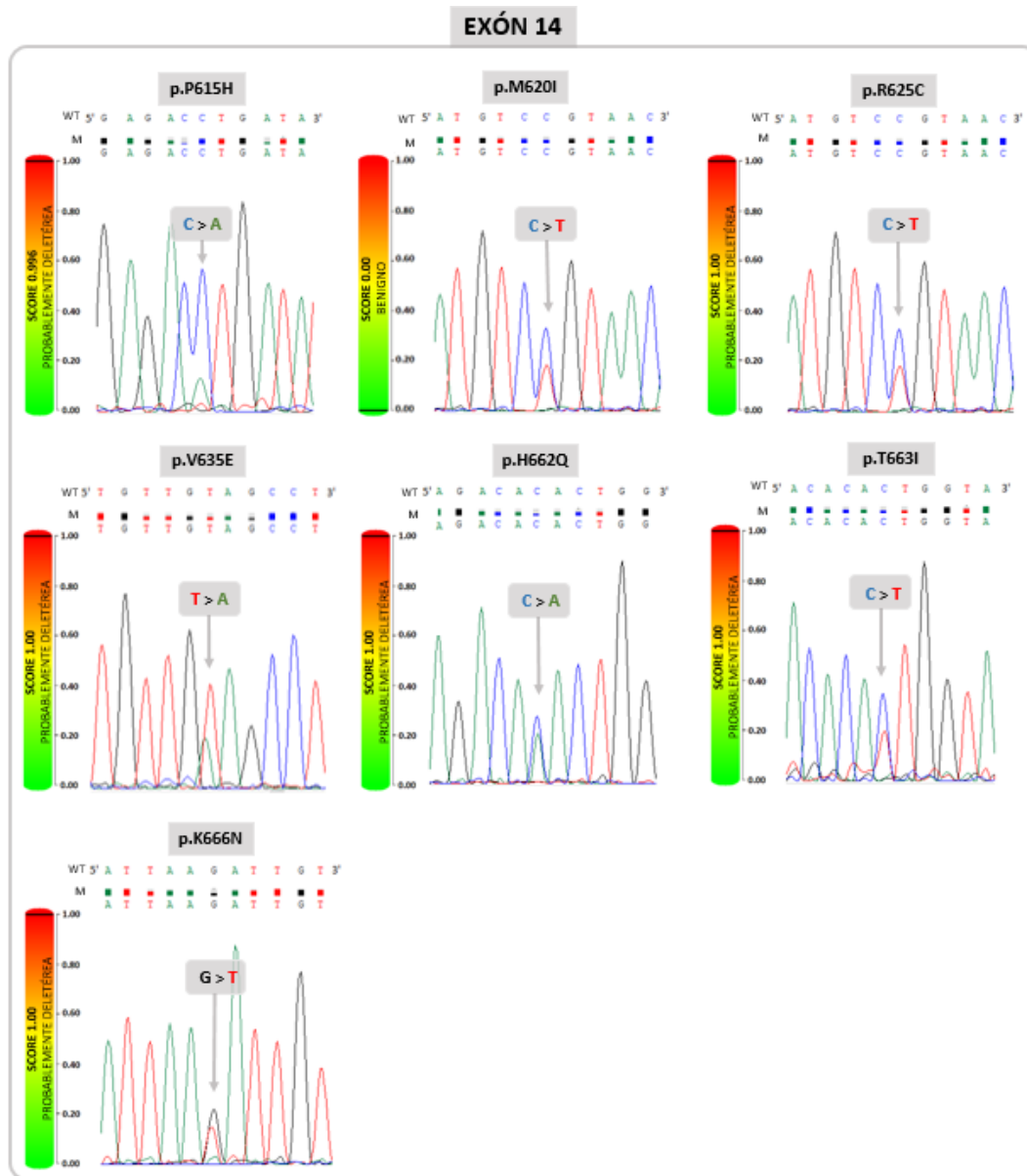


Figura 16: Variantes en el exón 14 del *SF3B1* encontradas en individuos con SMD

Para cada una de las 7 variantes encontradas se observa el cambio a nivel proteico en el título, la sustitución nucleotídica señalada en el electroferograma correspondiente al resultado de secuenciación automática según Sanger y, a su izquierda, el gráfico brindado por el Polyphen-2, el cual detalla la *score* obtenido y su interpretación.; M: muestra; WT: *wild type*

Las variantes p.R625C, p.H662Q, p.T663I y p.K666N estaban identificadas en el ENSEMBL. Cada una tenía asignado un código particular; rs775623976, rs778467242, rs1239341681 y rs377023736 respectivamente. En el programa *Genome Aggregation Database* (GnomAD) se encuentran detalladas las frecuencias de las variantes alélicas de 3 de las sustituciones mencionadas. En orden decreciente con respecto a la frecuencia alélica en población general se encuentra, la variante p.K666N con 0,0039% (10/251338) luego p.H662Q con 0,0012% (3/251370) y finalmente p.R625C (1/251128) con 0,0004% correspondiente a un

individuo de población europea. Si bien la variante p.T663I tiene asignado un código del ENSEMBL, su frecuencia alélica es 0% (0/251376) en población general.

Todas las variaciones se analizaron con el programa Polyphen, el SIFT y el Provean. Particularmente, el Polyphen-2 permite conocer el grado de implicancia de un cambio nucleotídico en el funcionamiento de la proteína calculando un score de 0-1, siendo el 1 el más deletéreo. **(Figura 16)** Se determinó que 6 variantes arrojaron un score entre 0.966 - 1, sugiriendo que estos cambios generarían consecuencias graves para el funcionamiento de la proteína. Sin embargo, la variante p.M620I obtuvo un score de 0, identificándola como benigna.

Al utilizar el algoritmo PROVEAN, con un punto de corte de -2,5, se vio que la mayoría superaba este valor, considerándose como deletéreas **(Tabla 13)**. La variación p.P615H arrojó el *score* más bajo de -8,42, mientras que la p.M620I obtuvo el puntaje más alto de 1,25. Esta última sustitución parecería no afectar el correcto funcionamiento proteico y fue reconocida como variante neutra. Asimismo, el SIFT, cuyo punto de corte es 0,05, confirmó que todas las variantes, exceptuando la p.M620I, eran perjudiciales para la proteína **(Tabla 13)**.

Tabla #13 : Algoritmos de predicción del impacto de las variantes en la función del SF3B1

| Variante | PROVEAN | Puntaje | SIFT | Puntaje |
|----------|-----------|---------|-------------|---------|
| p.P615H | Deletérea | -8,4 | Perjudicial | 0,004 |
| p.M620I | Neutra | 1,2 | Tolerada | 0,543 |
| p.R625C | Deletérea | -7,7 | Perjudicial | 0,000 |
| p.V635E | Deletérea | -5,8 | Perjudicial | 0,000 |
| p.H662Q | Deletérea | -7,8 | Perjudicial | 0,008 |
| p.T663I | Deletérea | -5,8 | Perjudicial | 0,000 |
| p.K666N | Deletérea | -4,9 | Perjudicial | 0,000 |

Protein_ID: ENSP00000335321; punto de corte PROVEAN -2,5; punto de corte para SIFT: 0,05

Empleando el software *Universal Evolutionary Trace*, diseñado por *Baylor College of Medicine*, se pudo determinar la importancia relativa de los aminoácidos pertenecientes a la región implicada por las alteraciones moleculares. En la **figura 17**, se puede observar que los aminoácidos arginina, histidina, treonina y lisina ubicados en las posiciones, 625, 662, 663 y 666, respectivamente, poseen una importancia relativamente alta dentro de la estructura de la proteína. Consecuentemente, las sustituciones encontradas en los residuos correspondientes fueron determinadas como de carácter deletéreo por los algoritmos aplicados. En las posiciones 615 y 635 se encuentran una prolina y una valina, respectivamente, con una importancia intermedia a baja en la estructura.

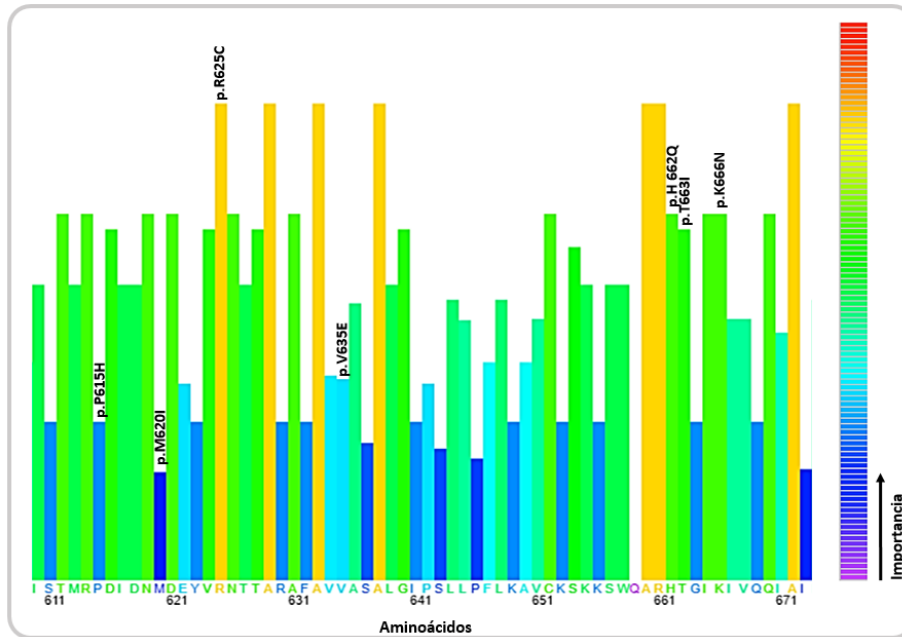


Figura 17: Importancia relativa de los aminoácidos involucrados en el exón 14 del SF3B1

El histograma detalla la importancia de cada aminoácido involucrado en la región estudiada donde se produjeron las sustituciones. En negrita y al final de la columna se menciona la variante encontrada.

Por su parte, el aminoácido metionina en la posición 620 muestra una importancia baja en la estructura del SF3B1. Además, la modificación de metionina a isoleucina parecería ser un cambio neutro ya que ambos aminoácidos son hidrofóbicos y se comportarían dentro de la proteína, esencialmente, de la misma manera concordando con la predicción de que es un cambio tolerado para su funcionamiento. Sin embargo, esta sustitución ha sido previamente encontrada en un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas involucrando otro cambio nucleotídico (chr2:198267497:C>A). (Yu et al., 2015) Particularmente, en la presente serie, este paciente presentaba 5% de sideroblastos en anillo. Por lo tanto, esta variante podría tener una relación causal al cumplir los criterios mencionados en la Guía de aplicación Clínica de la secuenciación masiva en Síndromes Mielodisplásicos y Leucemia Mielomonocítica Crónica: en un gen accionable considerado como diana terapéutica, con valor predictivo/pronóstico y asociado al diagnóstico/clasificación. (Such y Solé, 2017) Cabe destacar, que esta ubicación muestra particular flexibilidad impidiendo su correcta determinación cristalográfica, lo cual podría justificar las limitaciones de los algoritmos aplicados en asociar su patogenicidad. (Cretu et al., 2018)

2.2 Análisis de variantes en el exón 15 del *SF3B1*

2.2.1 Puesta a punto de la metodología

De acuerdo a las condiciones detalladas en materiales y métodos (Sección 3,1), se obtuvo un fragmento de 209pb correspondiente al producto de amplificación por PCR del exón 15 del gen *SF3B1* (**Figura 18**).

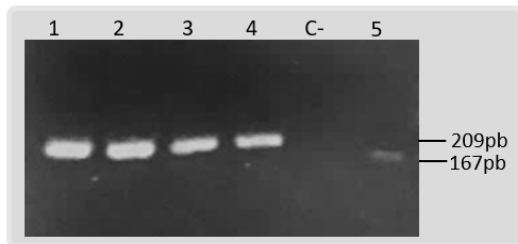


Figura 18: Visualización del producto de PCR del exón 15 de *SF3B1*

Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (p/v) en TBE 0,5X y tinción con BrEt.; 1-4 pacientes a evaluar; C-: Control negativo; 5: fragmento de 167pb del *SRSF2*; pb: pares de bases

Se construyó el control correspondiente a la sustitución p. Lys700Glu (p.K700E), ya que es la variación más frecuente en la literatura, aplicando la técnica de mutagénesis dirigida según el procedimiento detallado en materiales y métodos (Sección 3,2: **figura 14**). El resultado de la mutagénesis se verificó por secuenciación automática. Se vio que las PCR enriquecidas con 0,1µM y 0,2µM del *primer Fw** tuvieron mayor eficiencia en la incorporación del cambio nucleotídico (**Figura 19**). Se eligió el producto enriquecido con 0,2µM como control positivo para ajustar las condiciones óptimas del proceso de SSCP y para determinar si una muestra era *wild type* (WT) o variante en base a la comparación de los patrones obtenidos.

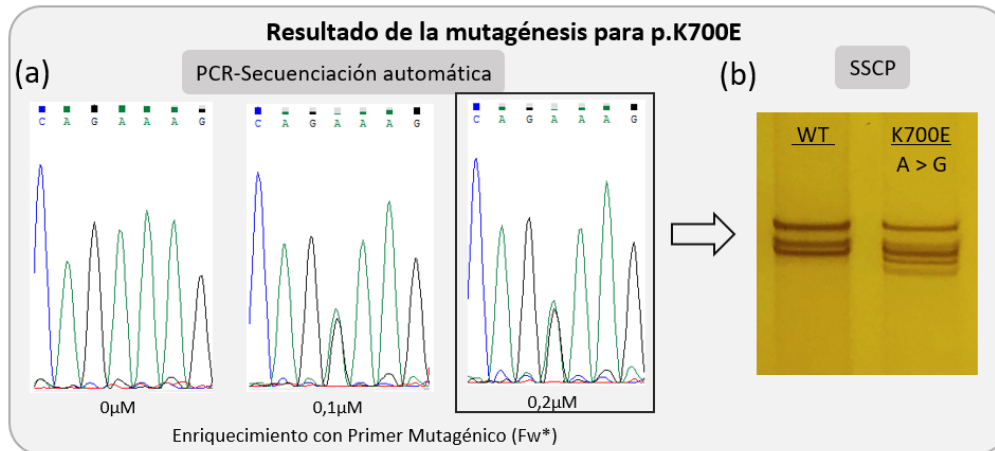


Figura 19: Resultado de la mutagénesis sitio-dirigida para la creación del control variante para el codón p.K700E

(a) Electroferograma resultante del enriquecimiento con cebador mutagénico correspondiente a p.K700E. (b) patrón de bandas obtenido como resultado del SSCP del fragmento de amplificación del exón 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (37,5:1) al 14% en TBE 1X y tinción nitrato de plata. WT: *wild type* ; Fw*: *Forward* mutagénico

La puesta a punto de la técnica de SSCP consistió en ajustar la concentración del gel de poliacrilamida para poder diferenciar efectivamente los productos variantes del *wild type*. Se determinó que la concentración ideal para el fragmento analizado fue del 14%. Una concentración inferior del 12% no permitió su diferenciación; mientras que una más alta (15%), no aportó a una mejor resolución de bandas con un incremento del tiempo de la electroforesis (**Figura 20**).

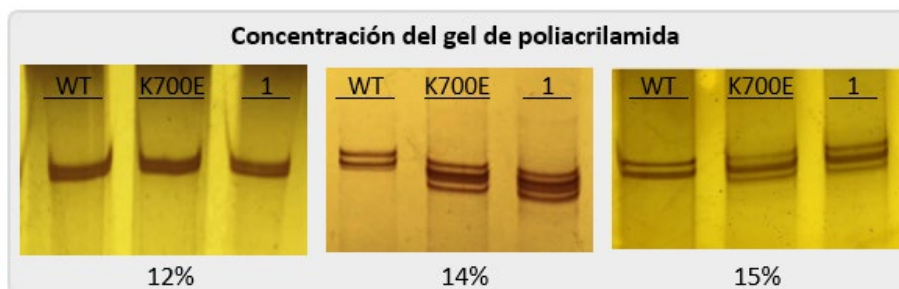


Figura 20: Patrones obtenidos aplicando la técnica de SSCP a diferentes concentraciones de poliacrilamida.

WT: *wild type*, K700E: control mutante, 1: muestra analizada *SF3B1+*

2.2.2 Variantes encontradas y su interpretación

Se estudiaron todos los pacientes *SRSF2-*, 7 de los cuales arrojaron un patrón diferente al WT y/o iguales al control positivo construido. Las variaciones presentes se confirmaron e identificaron mediante secuenciación automática. De las 7 muestras, 5 presentaron el cambio p.Lys700Glu (p.K700E), 1 la variación p.Ala713Gly (p.A713G) y 1 la variación sinónima p.Arg700Arg (p.R702R) (**Figura 21**). Se analizó las muestras con mayor profundidad

caracterizándolas con diversas bases de datos, como COSMIC, *International Cancer Genome Consortium* (ICGC) y cBioportal.

La sustitución p.K700E consta con la mayor cantidad de publicaciones, con respecto al resto de las variantes encontradas. Al 9 de enero de 2020, fue reportada en la base de datos ICGC un total de 116 veces (código MU9178) y en COSMIC, 830 veces con el código de identificación COSM84677/ COSM133591. La frecuencia de la variante alélica en población general, disponible en el GnomAD, es del 0,0083% (23/276636). Evidenciando una mayor frecuencia en el sexo masculino con respecto al femenino: 0,0093% (14/150298) vs. 0,0071% (9/126338) respectivamente. De la población global, se destacan la población judía Ashkenazi con, ya que presenta el porcentaje más alto de 0,0297% (3/10096), y las provenientes del este asiático, donde no está reportada.

Además se la analizó con los algoritmos Polyphen-2, PROVEAN (score: -3,9) y SIFT (score: 0,004) y en los tres coincidieron en que la sustitución es deletérea. Para acceder al total de la información estudiada que caracterizan a estas variaciones ver el **anexo 1**.

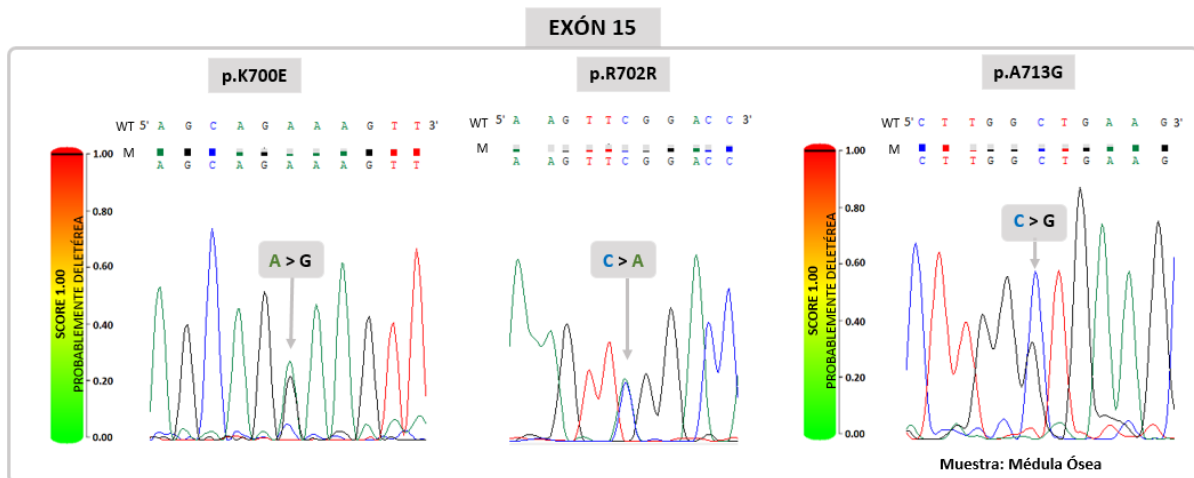


Figura 21: Variantes encontradas en el exón 15 del *SF3B1* en individuos con SMD

Para cada variante diferente encontrada se observa en el título el cambio a nivel proteico, la sustitución nucleotídica señalada en el electroferograma correspondiente al resultado de secuenciación automática según Sanger y, a su izquierda, el gráfico otorgado por el Polyphen-2, el cual detalla el score obtenido y su interpretación. M: muestra; WT: *wild type*.

La variación sinónima p.R702R fue analizada en las bases de datos mencionadas previamente y se la encontró en el ENSEMBL identificada como un SNP con el código rs16865307. En el GnomAD se determinó que la variante alélica muestra una frecuencia del 0,5596% (1557/278216) en población general. Este porcentaje disminuye al 0,1309% (44/33612) en población latina y al 0,0243% (31/127816) en población europea.

Dada la baja frecuencia en la población se decidió estudiar si este cambio nucleotídico comprometía el propio *splicing* mediante el programa ESEfinder. Este sistema evidenció que la variante afecta las secuencias de reconocimiento (del inglés: *motif*) del factor de *splicing* SRSF1/SF2. Esta proteína es crucial para el correcto funcionamiento del complejo ya que se encarga de prevenir la omisión de exones, asegurando la precisión del corte y empalme, y regulando el *splicing* alternativo. Además, interactúa con otros componentes de la maquinaria, a través de los dominios SR, para formar un puente entre los componentes de unión al sitio de corte y empalme 5' y 3', U1 snRNP y U2AF. El motivo de reconocimiento afectado arroja un score de 3,6705 (con un punto de corte de 1,956) y es confirmado por una secuencia corta de 7 nucleótidos: 5'-CGGACCA-3'. La sustitución NM_012433.3:c.2104C>A cambia el sitio de reconocimiento a 5'-AGGACCA-3' y por ende, ya no podría ser reconocido. Esta sustitución comprometería la maduración del ARNm y favorecería un *exon skipping* (Figura 22).

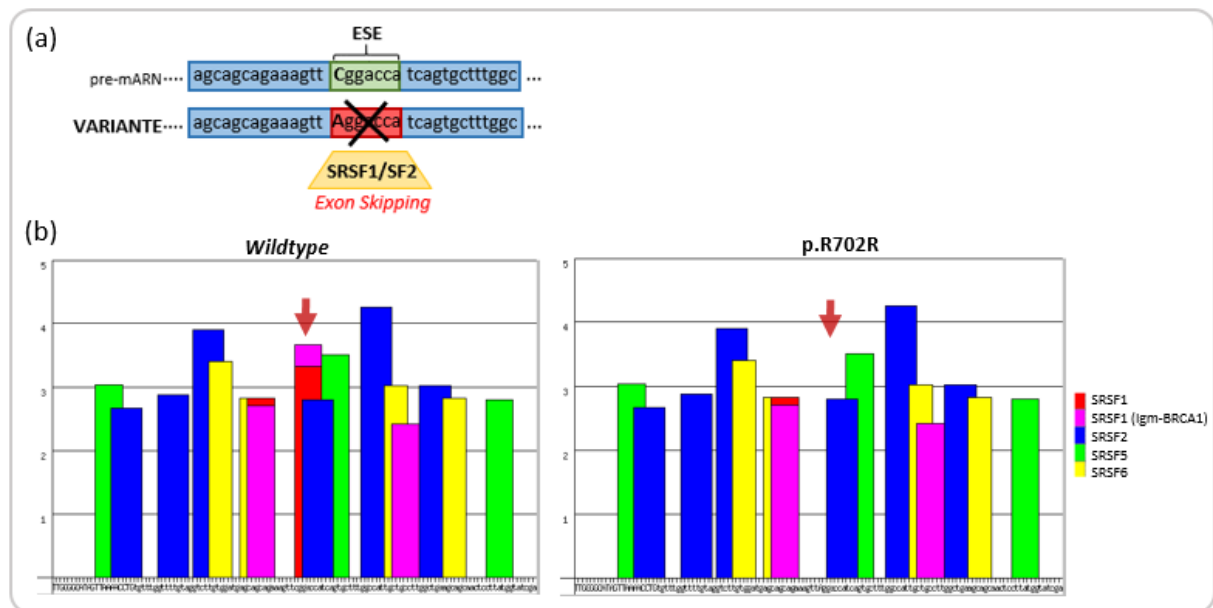


Figura 22: Análisis por ESEfinder de la variación p.R702R del gen *SF3B1*

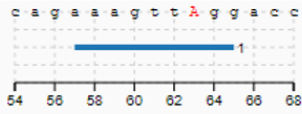
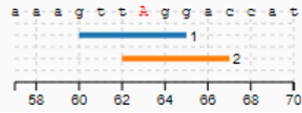
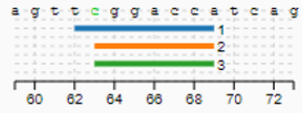
(a) Verde: sitio de reconocimiento funcional de *SRSF1/SF2*; rojo: cambio nucleotídico C > A y su consecuencia potencial; celeste: regiones exónicas flanqueantes. (b) Análisis por ESEfinder donde se observa el *motif* que desaparece debido al cambio señalado. En el eje X se encuentra la secuencia del exón 15 analizada. En el eje Y se representa el puntaje de cada motivo que supera al punto de corte de 1.956. El grosor de la barra es proporcional a la cantidad de nucleótidos que componen el *motif* (6-8 nucleótidos).

Continuando con el análisis del impacto de la variante en el propio *splicing*, se aplicó el programa *Human Splicing Finder* (HSF). Este programa, a diferencia del ESEfinder, no sólo reconoce las consecuencias de un cambio nucleotídico en los sitios promotores exónicos, sino que también analiza sitios dadores y ESS. En este caso, además de reconocer que se alteraría

un sitio ESE, se generaría un nuevo sitio dador con la secuencia 5'-AAAGTTAGG-3' y un nuevo sitio ESS con dos posibles secuencias 5'-GTTAGG-3' o 5'-TAGGAC-3' (**Tabla 14**). Este sistema, complementario al anterior, ilustra otras potenciales consecuencias de la sustitución en la correcta maduración del ARNm de *SF3B1*.

El efecto predicho de esta variante sinónima, diferente de los usuales cambios de sentido del *SF3B1*, justificaría la ausencia de sideroblastos en anillo en este paciente. Sin embargo, el mismo podría influir en sus características clínicas con pancitopenia periférica, cariotipo alterado y un riesgo intermedio según el IPSS-R.

Tabla #14: Resultado del análisis de p.R702R en el programa *Human Splicing Finder*

| Señal Predicha | Algoritmo | Posición (cADN) | Interpretación |
|-------------------|-------------------------------------|--|--|
| Nuevo sitio dador | 1- Matrices HSF |  | Activación de un sitio dador criptico. Potencial alteración del <i>splicing</i> . |
| Nuevo ESS | 1- Hexámeros Fas-ESS |  | Creación de un sitio ESS. Potencial alteración del <i>splicing</i> . |
| | 2- Matrices HSF - hnRNP A1 | | |
| ESE alterado | 1- Octámeros PESE de Zhang & Chasin |  | Alteración de un sitio ESE. Potencial alteración del <i>splicing</i> . |
| | 2- ESE-finder - SF2 | | |
| | 3- ESE-finder - SF2 (lg) | | |

La columna “Algoritmo” muestra los algoritmos que analizaron la alteración. Al menos 2 algoritmos diferentes deben arrojar resultados que se superponen para que se considere un ESE o ESS relevante. El número pequeño que procede al nombre del algoritmo se corresponde con la representación gráfica de la señal predicha en la columna siguiente. En la columna de posición (cADN) se observa la representación gráfica de la región donde ocurrió el cambio nucleotídico. En cada señal, cada algoritmo está representado por una línea con un color diferente. Se observa que la posición y el *motif* varían entre algoritmos. En la parte superior de cada gráfico se ve la secuencia con el nucleótido WT en verde (si el sitio está alterado) o con el nucleótido variante en rojo (si un sitio nuevo fue creado). En la parte inferior, las posiciones exónicas. La última columna resume la interpretación de cada algoritmo aplicado. HSF: *Human Splicing Finder*; ESS: *Exonic splicing silencer*; ESE: *Exonic splicing enhancer*

Por su parte, la variante p.A713G no había sido reportada previamente en ninguna de las bases de datos consultadas. Por ende, en este caso en particular, se analizó una muestra de mucosa bucal (MB) del paciente para determinar si la misma era adquirida o germinal. Las variantes adquiridas/somáticas ocurren en un momento dado durante la vida de una persona y solamente están presentes en determinadas células, mientras que las germinales se heredan de un progenitor y están presentes en cada célula del organismo. Luego de su procesamiento, detallado en materiales y métodos (Sección 2), se procedió con la secuenciación automática del fragmento de interés. En la **figura 23** se observa el electroferograma obtenido con un único pico de color azul correspondiente al nucleótido citosina, sin evidenciar la sustitución

NM_012433.3:c.2138C>G (p.A713G, **figura 21**). Este hallazgo evidencia que la variante fue adquirida en el linaje hematopoyético en algún momento de la vida del paciente.

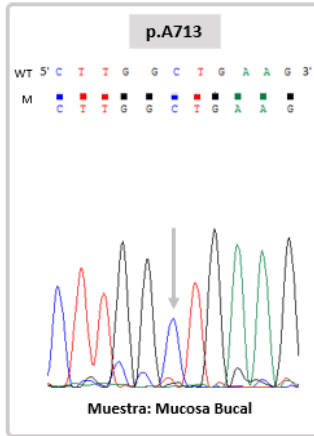


Figura 23: Electroferograma de la muestra de mucosa bucal del paciente

Se indica la posición de interés que muestra un único pico correspondiente al nucleótido salvaje. M: muestra; WT: *wild type*

De acuerdo al programa Polyphen-2 el cambio de alanina por glicina en el codón de interés, obtuvo un puntaje de 1 y, por ende, fue clasificada por el sistema como una variante probablemente deletérea. También, se la sometió a los algoritmos de predicción PROVEAN y SIFT con scores de -3,91 y 0,00, caracterizándola como variante deletérea y perjudicial, respectivamente. Por lo tanto, los tres sistemas aplicados coinciden en el efecto posiblemente patogénico de la variante encontrada.

Para el análisis de importancia relativa de los aminoácidos se utilizó el programa *Universal Evolutionary Trace*. Este mismo permitió determinar que el aminoácido alanina en la posición 713 es de suma importancia en la estructura secundaria de la proteína (**Figura 24**). El cambio de alanina por glicina parecería no afectar la proteína ya que ambos aminoácidos son de carga neutra. Sin embargo, cabe destacar que la glicina es el aminoácido más pequeño de todos al no poseer cadena lateral y permite mayor flexibilidad conformacional. La importancia de la posición y el cambio que ocurre complementa los resultados de los algoritmos aplicados y su posible efecto patogénico. Además, este paciente presenta 7% de sideroblastos en anillos, lo cual avalaría la relación causal y el carácter perjudicial del cambio aminoacídico. De acuerdo a la nueva clasificación propuesta por la OMS en 2016 (Arber et al., 2016), este paciente sería re-clasificado de una CRDM a una SMD-CRDM-SA ya que presenta variante en *SF3B1* y sideroblastos en anillos $\geq 5\%$.

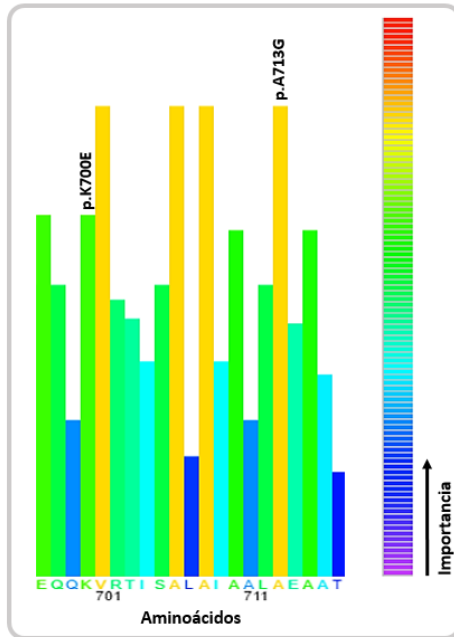


Figura 24: Importancia relativa de los aminoácidos involucrados en el exón 15 del *SF3B1*

El histograma detalla la importancia de cada aminoácido particular involucrado en la región estudiada donde se produjeron las sustituciones. En negrita y al final de la columna se menciona la variante encontrada.

2.2.3 Validación mediante NGS

Se realizó el análisis de secuenciación mediante NGS, de un paciente masculino de 76 años portador de la variante p.K700E. Como se puede apreciar en la **figura 25** este individuo perteneciente al subtipo LMMC-1 presentaba sideroblastos en anillo.

El panel mieloide comercial utilizado evaluó un total de 526 amplicones pertenecientes a 40 genes asociados; 23 en regiones calientes y 17 completos. De acuerdo al reporte provisto por Illumina *DNA Amplicon Sequencing*, la secuenciación se llevó a cabo con una profundidad Q30 de un 85,7% y una cobertura media de amplicones de 9270,8 con una uniformidad del 95,1%. Al comparar con la secuencia de referencia UCSC hg19, se detectaron un total de 92 variantes. Según las recomendaciones de la Guía de Aplicación Clínica de secuenciación Masiva en SMD y LMMC (Such y Solé, 2017), se filtraron las regiones codificantes y de *splicing* con posterior análisis de las 27 remanentes. La mayoría eran SNP, 3 deleciones y 1 variante de 2 nucleótidos. A excepción de esta última, casi todas poseían identificador de la base de datos del ENSEMBL (25/27), en el COSMIC (25/27) y 15 de ellas estaban categorizadas como benignas o posiblemente benignas en el ClinVar. Según esta última base de datos, la única variante clasificada como posiblemente patogénica era la correspondiente a

la sustitución p.K700E en *SF3B1* con una frecuencia de la variante alélica (VAF) de 43,9%. Por lo tanto, a las remanentes, se les aplicaron los algoritmos anteriormente mencionados y se determinó que 4 de ellas poseían carácter posiblemente patogénico: 3 pertenecientes al *TET2* y 1 al *STAG2*.

En relación a *TET2*, la delección p.Y1245fs*22, que resulta en un cambio en el marco de lectura y las sustituciones p.P363L y p.L1721W obtuvieron una calidad de 100, un VAF de 45,7%, 48,4% y 50,7%, respectivamente, con una profundidad de lectura entre 1305-8430. Mientras que, la variante localizada en la posición ChrX: 123184970-1, cuya secuencia de referencia GC cambia por AA, involucra la última base del intrón 11 y la primera del exón 12 afectando la región aceptora del *splicing* del *STAG2*. Esta secuencia obtuvo una calidad reducida a 53, un VAF de 7,6% y una profundidad total de 119 lecturas. Estos parámetros ameritan su confirmación mediante secuenciación según Sanger.

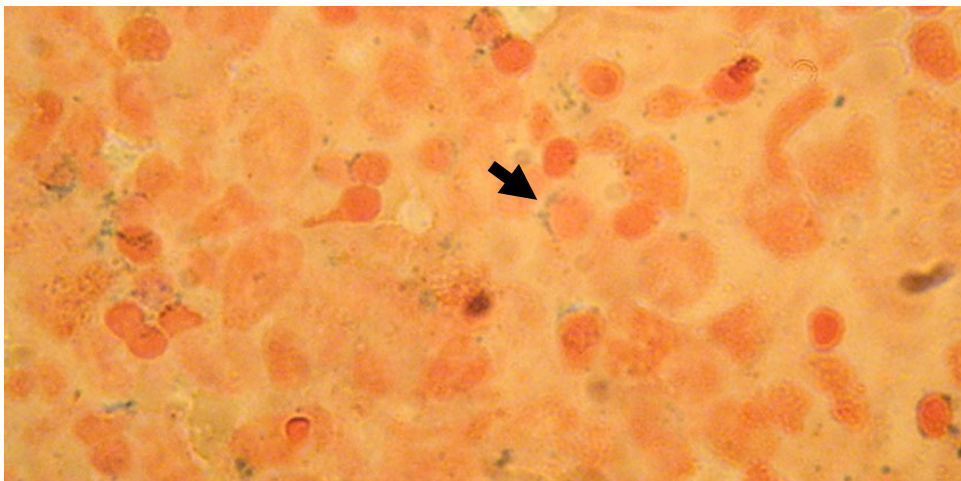


Figura 25: Sideroblastos en anillo observados mediante la técnica de Perls

La flecha indica un precursor eritroide con deposiciones de hierro distribuidas en forma de anillo alrededor del núcleo. Imagen cortesía del Servicio de Hematología, Hospital General de Agudos “C Durand”

2.3 Descripción de las variantes en pacientes SF3B1+

El análisis de los 55 pacientes seleccionados al azar permitió determinar que un 27,5% (14/51) de los individuos presentaban variaciones de secuencia en el gen *SF3B1*. De las cuales, 13 generaron un cambio de sentido en el aminoácido involucrado. Los hallazgos se vieron distribuidos a lo largo de los exones 14 y 15 conforme al panel (a) de la **figura 26**. En la misma imagen se puede observar que la variante más frecuente fue la p.K700E, afectando a 5 de los 14 individuos.

En el panel (b) se esquematiza la distribución relativa de los pacientes afectados en relación a la clasificación OMS 2008, en el cual se destaca que el mayor porcentaje de individuos *SF3B1*+ pertenecían a los subtipos ARSA/CRDM-SA. De acuerdo a los resultados obtenidos, se debería reevaluar la clasificación de los pacientes según los criterios de la OMS 2016. Al menos 2 de los individuos analizados, originalmente clasificados como CRDM, presentaban entre 5-7% de sideroblastos anillados, y, por ende, serían re-categorizados a SMD-DM-SA.

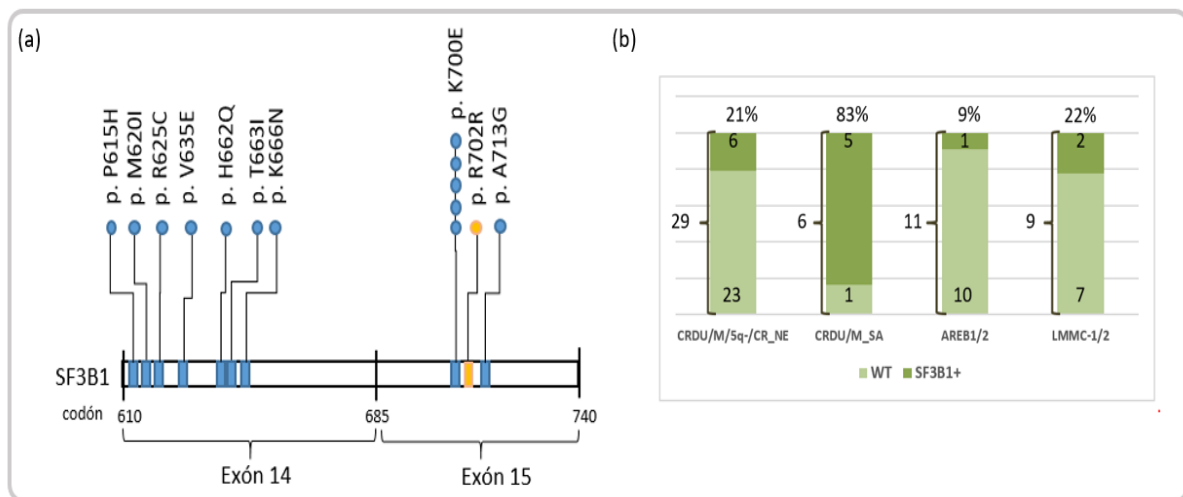


Figura 26: Variantes encontradas en el gen *SF3B1* y su distribución relativa de acuerdo a la OMS 2008

(a) Representación esquemática de la distribución de variantes encontradas a lo largo de los exones 14 y 15 del *SF3B1*. Círculo azul: variante con cambio de sentido; círculo amarillo: variante sinónima. La cantidad de círculos se corresponde con la cantidad de individuos portadores de la variante. (b) Distribución de individuos *SF3B1*+ y WT según la clasificación de la OMS del 2008. Sec: secundaria; NE: citopenia refractaria sin datos registrado de número de líneas displásicas; WT: *wild type* o salvaje

3. Detección de variantes en los exones 2 y 6 del gen *U2AF1*

3.1 Análisis de variantes en el exón 2 del *U2AF1*

3.1.1 Puesta a punto de la metodología

Se abordó el análisis mediante la amplificación por PCR del fragmento de interés. La puesta a punto, al igual que las restantes reacciones y a modo ilustrativo, comenzó realizando una titulación de *primers* (Fw y Rv) correspondientes al exón 2, detallados en materiales y métodos, incrementando las concentraciones desde 0,2 a 1,0 μ M a 56,5°C. Como resultado, se obtuvo una banda de 161pb correspondiente al exón 2 del *U2AF1* pero con baja intensidad (**Figura 27a**). Posteriormente, se repitió a 56°C incrementando su eficiencia. En la **figura 27b**

se observa que a una concentración de 0,6µM se obtiene una buena amplificación, sin embargo, se decidió bajarle medio grado a fin de disminuir la cantidad de cebadores utilizados. Consecuentemente, para la amplificación de las muestras, se eligió como condiciones óptimas una temperatura de 55,5°C y una concentración de *primers* de 0,5µM.

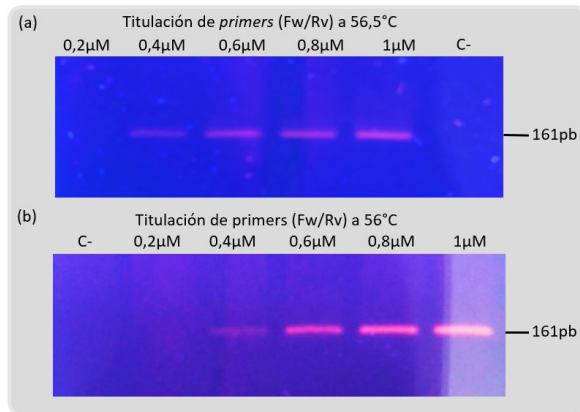


Figura 27: Puesta a punto de la PCR del exón 2 del gen *U2AF1*

(a) Titulación de primers a 56,5°C. (b) Titulación de primers a 56°C. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (p/v) en TBE 0,5X y tinción con BrEt. C-: control negativo

Para poder determinar de manera efectiva la presencia de patrones atípicos, se generaron controles positivos de las variantes más frecuentes. El procedimiento para su creación se detalla en materiales y métodos (Sección 3,2). Se construyeron controles correspondientes a dos sustituciones: p.Ser34Tyr (p.S34Y) y p.Ser34Phe (p.S34F). El resultado del enriquecimiento con el cebador mutagénico (Rv*) se controló mediante secuenciación automática analizado con el *primer* Fw correspondiente, evidenciando el grado de incorporación del cambio nucleotídico. El resultado definió que el producto enriquecido con 0,2µM, en ambas mutagénesis, fue el indicado para usar como control ya que había incorporado en mayor proporción el cambio nucleotídico (**Figura 28**).

Para el análisis de las muestras mediante SSCP, se inició probando las mismas condiciones del exón 15 del *SF3B1* y se optó por una concentración de 14% para el gel de poliacrilamida. Como se puede apreciar en la **figura 28c**, las condiciones finales permitieron la correcta diferenciación entre el WT y los controles mutagénicos, sin embargo, estos últimos poseían patrones de bandas muy similares.

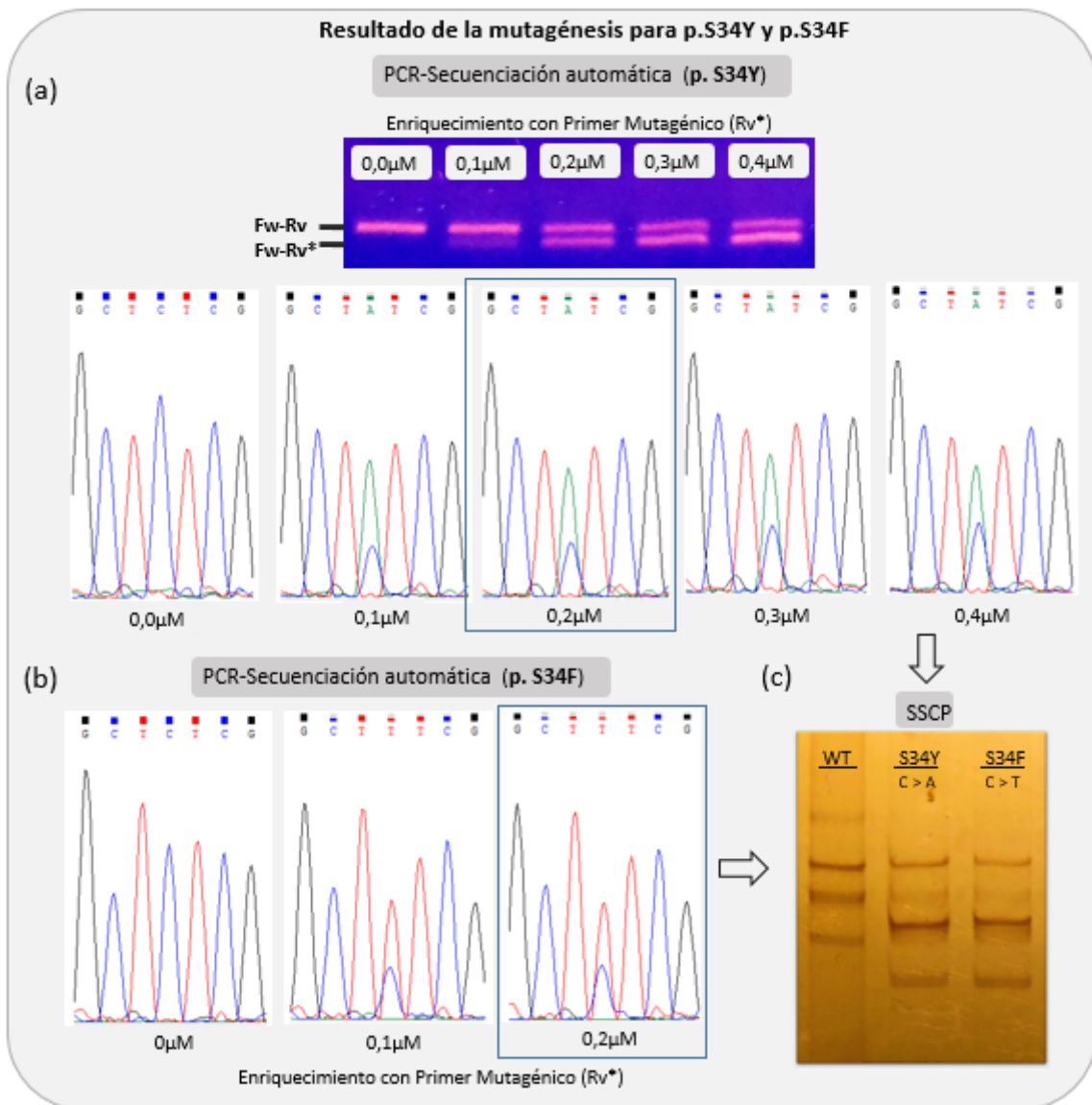


Figura 28: Resultado de la mutagénesis sitio-dirigida para la creación de los controles positivos del exón 2 del *U2AF1*

(a) Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (p/v) en TBE 0,5X y tinción con BrEt del enriquecimiento con primer mutagénico para la construcción del control correspondiente al cambio p.S34Y. Por debajo, se observan los electroferogramas respectivos a cada concentración de cebador mutagénico agregado. (b) Electroferograma resultante del enriquecimiento con *primer* mutagénico correspondiente a la variante p.S34F. (c) Patrón de bandas obtenido como resultado del SSCP del fragmento de amplificación del exón 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (37,5:1) al 14% en TBE 1X y tinción con nitrato de plata. WT: *wild type*; Fw: *forward*; Rv: *reverse* Rv*: *reverse* mutagénico

3.1.2 Variantes encontradas y su interpretación

Las muestras estudiadas fueron aquellas *SRSF2*- y *SF3B1*-, resultando en un total de 48 pacientes. En total, se encontraron 2 pacientes con variantes en el exón analizado. Uno de ellos

se identificó como el cambio sinónimo p.Cys33Cys (p.C33C) y la otra coincidió con el patrón del control positivo y fue confirmado como la sustitución p.S34F (**Figura 29**).

A fin de caracterizarlas, se realizó la búsqueda en bases de datos incluyendo COSMIC, ClinVar e ICGC, entre otras. Para el detalle completo **ver anexo 1**.

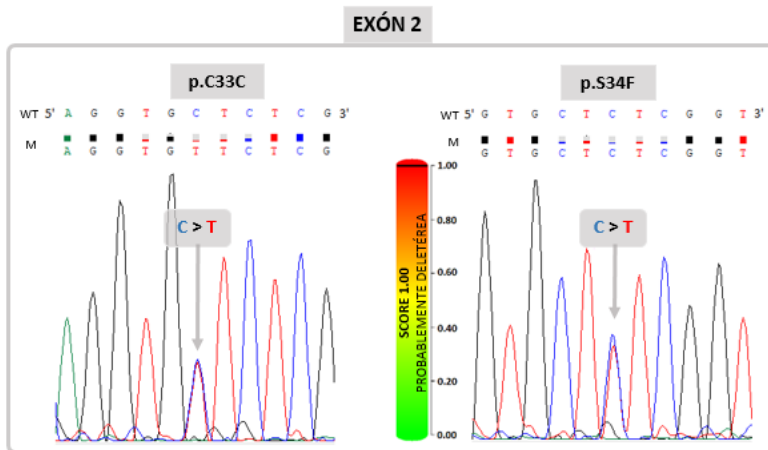


Figura 29: Variantes en el exón 2 del *U2AF1* encontradas

Para cada variante encontrada se observa en el título el cambio a nivel proteico, la sustitución nucleotídica señalada en el electroferograma correspondiente al resultado de secuenciación automática según Sanger y, a su izquierda, el gráfico otorgado por el Polyphen-2, el cual detalla el score obtenido y su interpretación. WT: *wild type*; M: muestra.

El SNP correspondiente a la variante sinónima p.C33C se encuentra asociada en el buscador ENSEMBL con el código rs139959814. Se presenta con una frecuencia alélica del 0,07% en población general de acuerdo al GnomAD, la cual se incrementa en población judía Ashkenazi (168/10332 = 1,62%), disminuyendo al 0,0148% (19/128716) en la población Europea y al 0,0229% (8/34970) en población Latina.

Dada la baja frecuencia en población general y para evaluar el impacto del cambio nucleotídico en la maquinaria de corte y empalme se decidió consultar el programa ESEfinder. El mismo mostró que cuando se produce el cambio NM_006758.2:c.99C>T provoca que el *motif* de la proteína SR, SRSF1/SF2 ya no sea reconocido como tal, al igual que lo observado para el cambio sinónimo SF3B1 p.R702R (**Figura 30a**). El sitio afectado está conformado por 7 nucleótidos; 5'-CTTCTCGG-3' y tiene un puntaje de 2,2889, superando el punto de corte para el SRSF1 de 1,956. En la **figura 30b** se puede observar que el cambio provoca que el sitio se convierta en 5'-TTTCTCGG-3', perdiendo el sitio de reconocimiento de SRSF1/SF2 y, por lo tanto, favoreciendo la omisión de exones.

Sin embargo, al analizar el cambio nucleotídico de interés en el programa HSF, que contiene múltiples algoritmos, entre ellos el ESEfinder, el resultado no se confirmaría. Como

donde figura una frecuencia del 0,000356% (1/281256). Este porcentaje corresponde a un único individuo de población africana.

Esta variante fue estudiada con tres programas de predicción a fin de evaluar su patogenicidad: PROVEAN, SIFT y Polyphen-2. En PROVEAN arrojó un score de -5,64, en SIFT de 0,00 y en Polyphen-2 de 1. Por lo tanto, los tres algoritmos la consideraron como perjudicial para el correcto funcionamiento de la proteína.

El análisis mediante el *software* de acceso online *Universal Evolutionary Trace*, evidencia la importancia relativa de los aminoácidos pertenecientes a la región implicada en esta alteración y la caracteriza como de suma importancia para la proteína. La serina en la posición 34 forma parte del primer dedo de zinc de la proteína. Tanto el primer dedo de zinc como el segundo, son regiones altamente conservadas y son cruciales para la estructura secundaria del U2AF1 (**Figura 31**).

Este paciente en particular presentaba el subtipo LMMC con aumento de blastos, cariotipo con la presencia de doble minutos como resultado de la amplificación de *MYC*, bicitopenia con requerimiento transfusional y un desarrollo fatal en 2 meses por sepsis.

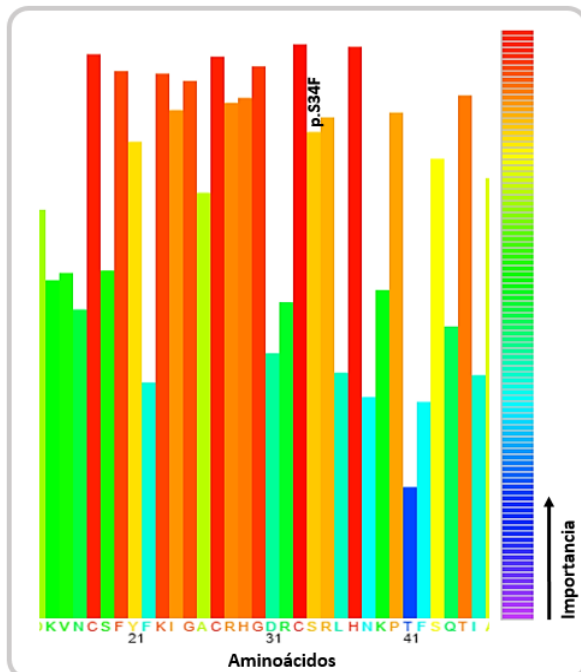


Figura 31: Importancia relativa de los aminoácidos involucrados en el exón 2 del *U2AF1*

El histograma detalla la importancia de cada aminoácido particular involucrado en la región estudiada donde se produjeron las sustituciones. En negrita y al final de la columna se menciona la variante encontrada.

3.2 Análisis de variantes en el exón 6 del U2AF1

3.2.1 Puesta a punto de la metodología

Como punto de partida, para poder estudiar el exón en su totalidad mediante PCR-SSCP, se eligieron los cebadores diseñados por Wu et al. 2012. El producto obtenido de 209pb se acompañaba de inespecíficos de difícil erradicación, en parte, porque presentaban temperaturas de hibridización muy diferentes entre sí. Las regiones flanqueantes al exón poseen secuencias repetitivas restringiendo la ubicación de nuevos *primers*. Por lo tanto, se optó por mantener el cebador Fw original y diseñar uno ad-hoc que permitió la correcta amplificación de una banda específica de 203pb, incluyendo al exón 6.

Se construyeron controles positivos, mediante mutagénesis dirigida, correspondientes a dos sustituciones frecuentes acorde a la literatura, p.Gln157Pro (p.Q157P) y p.Gln157Arg (p.Q157R), según lo detallado en materiales y métodos (Sección 3,2). La eficiencia de la incorporación del cambio nucleotídico, en ambos casos, se confirmó mediante secuenciación automática. En la **figura 32** se pueden observar los electroferogramas obtenidos de los enriquecimientos con los cebadores *reverse* mutagénicos (Rv*) correspondientes a cada variante. Para ambos controles se seleccionó el producto enriquecido con 0,2µM, ya que evidenciaban una buena incorporación de la variante.

La puesta a punto del SSCP se llevó a cabo utilizando los controles positivos construidos y un WT. A fin de observar las bandas con la mejor definición se probaron diversas concentraciones de geles y tiempos de corrida. Las condiciones óptimas, detalladas en materiales y métodos (Sección 3,3), permitieron diferenciar ambas variantes del control normal (**Figura 32c**). Además, la disponibilidad de controles positivos en cada electroforesis disminuye la posibilidad de resultados falsos negativos.

La confirmación de los patrones aberrantes se realizó mediante secuenciación automática, utilizando el cebador *forward* (Fw) correspondiente, descrito en materiales y métodos (Sección 3,1). Los electroferogramas obtenidos utilizando el cebador *reverse* (Rv) mostraban ruido que dificultaba la interpretación.

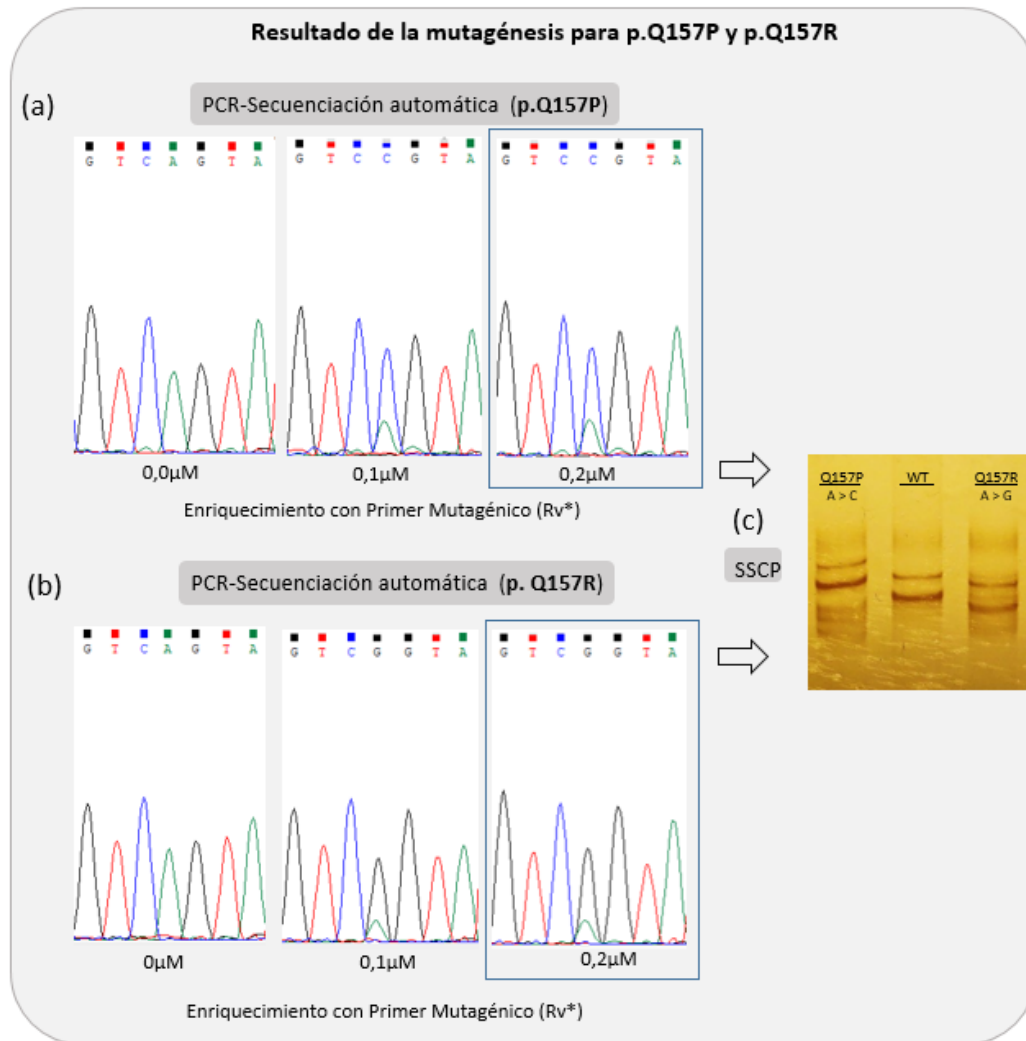


Figura 32: Resultado de la mutagénesis sitio-dirigida para la creación de los controles positivos del exón 6 del U2AF1

Electroferograma resultante del enriquecimiento con primer mutagénico correspondiente a las variante (a) p.Q157P. (b) p.Q157R. (c) Patrón de bandas obtenido como resultado del SSCP del fragmento de amplificación del exón 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes (37,5:1) al 14% en TBE 1X y tinción con nitrato de plata. WT: *wild type*; Fw: *forward*; Rv: *reverse* Rv*: *reverse* mutagénico

3.2.2 Variantes encontradas y su interpretación

Las muestras utilizadas en el análisis de variantes para el exón 6 del gen *U2AF1* pertenecían a 39 pacientes *SRSF2*- y *SF3B1*-. Se encontraron 2 pacientes con sustituciones nucleotídicas, las cuales fueron caracterizadas recurriendo a bases de datos como ClinVar, COSMIC, ICGC y TCGA (**Anexo 1**). Ambos individuos presentaban la variante p.Phe150Ile (p.F150I), y uno de ellos, además, el cambio sinónimo p.Pro146Pro (p.P146P) (**Figura 33**).

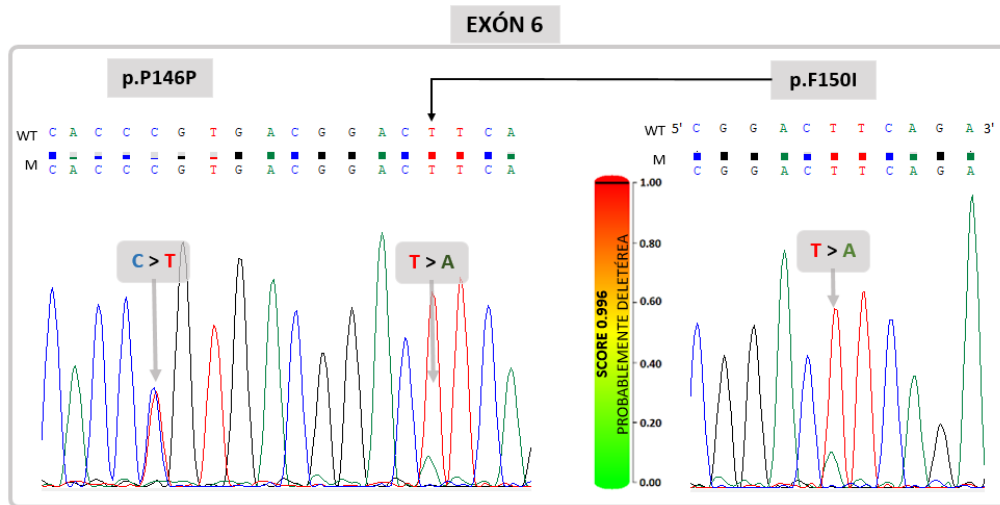


Figura 33: Variantes encontradas en el exón 6 del *U2AF1* en individuos con SMD

Para cada variante encontrada se observa en el título el cambio a nivel proteico, la sustitución nucleotídica señalada en el electroferograma correspondiente al resultado de secuenciación automática según Sanger y, a su izquierda, el gráfico otorgado por el Polyphen-2, el cual detalla el score obtenido y su interpretación. WT: *wild type*; M: muestra

La variante sinónima p.P146P, figuraba en la base de datos COSMIC previamente con el código COSM6494736. Sin embargo, recientemente (entre nov-19 y ene-20) fue excluida por el sitio web por ser reconocido como SNP y se encuentra identificada en el ENSEMBL con el código rs61737061. Al consultar la base GnomAD se observó que presenta una frecuencia alélica de 0,49% (1410/282804) en población general, la cual se incrementa a un 4,8% en población Africana (1204/24962), disminuyendo en población latina y europea a 0,41% (146/35436) y 0,02% (25/129124), respectivamente.

Para profundizar la caracterización de la variante, se decidió estudiar su efecto sobre el funcionamiento de la maquinaria de corte y empalme utilizando los programas ESEfinder y HSF. El primero predice que el cambio nucleotídico generaría un *motif* no reconocido por el SRSF5 (factor 5 de empalme rico en serina/arginina). El motivo de reconocimiento afectado está conformado por una secuencia pequeña de 7 nucleótidos; 5'-TCACCCCG-3' y obtuvo un score de 4,28181 con un punto de corte particular para el SRSF5 de 2,67. El SRSF5 desempeña un papel importante en el empalme constitutivo y puede modular la selección de sitios de empalme alternativos. La falta de reconocimiento de este sector por parte del SRSF5 provocaría un *exon skipping* (**Figura 34**). Un dato a destacar es que el puntaje de un motivo de reconocimiento que comparte 6 de los 7 nucleótidos del ESE 5'-CACCCGTG-3', reconocido por la proteína SRSF1, disminuye de 4,76741 a 2,95562 con el cambio. Teniendo en cuenta que

el punto de corte para el SRSF1 es de 1,956, según el programa, disminuiría la confianza con que lo reconoce (**Figura 34b**).

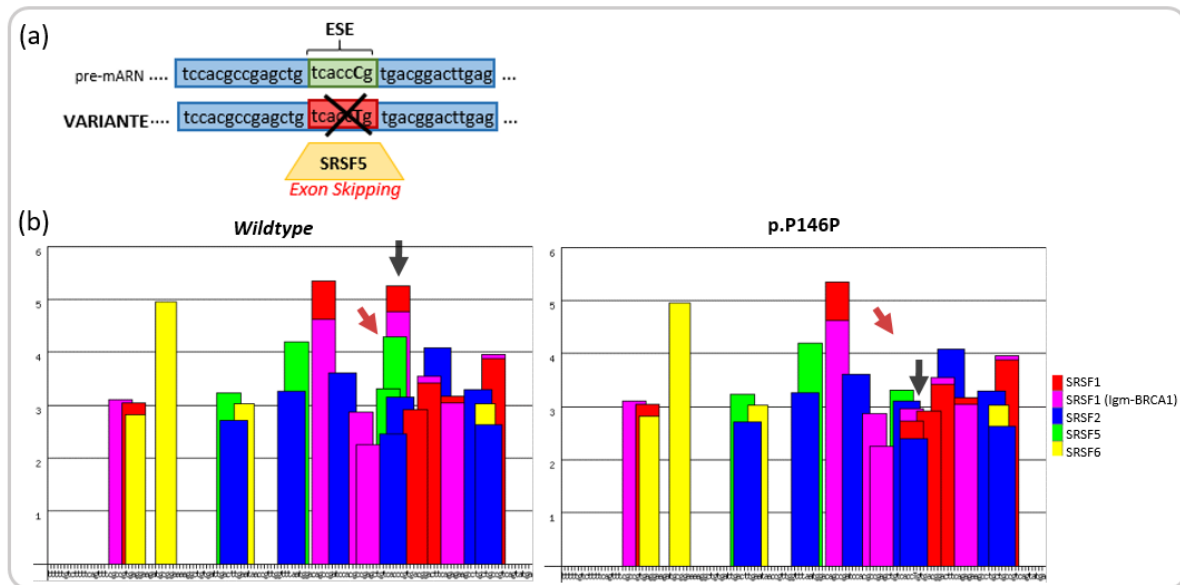
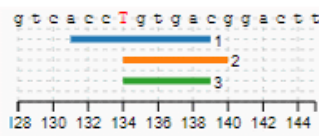


Figura 34: Análisis por ESEfinder de la variación p.P146P del gen *U2AF1* en dos pacientes con SMD

(a) Verde: sitio de reconocimiento funcional de *SRSF1/SF2*; rojo: cambio nucleotídico C > T y su consecuencia potencial; celeste: regiones exónicas flanqueantes. (b) Análisis por ESEfinder donde se observa el *motif* que desaparece debido al cambio señalado. En el eje X se encuentra la secuencia del exón 6 analizada. En el eje Y se representa el puntaje de cada *motif* que supera al punto de corte de 1.956. El grosor de la barra es proporcional a la cantidad de nucleótidos que componen el *motif* (6-8 nucleótidos).

El análisis mediante el HSF dio a conocer que el cambio además tiene como consecuencia la aparición de un nuevo ESS. Esto provocaría potencialmente una alteración en el corte y empalme del mensajero. Como se puede observar en la **tabla 15**, cada uno de los tres algoritmos utilizados por el programa, reconocen un *motif* diferente pero todos tienen la secuencia nucleotídica 5'-TGTGAC-3' como parte del motivo de reconocimiento.

Tabla 15: Resultado del análisis de p.P146P en el programa *Human Splicing Finder*

| Señal Predicha | Algoritmo | Posición (cADN) | Interpretación |
|----------------|-----------------------------------|--|---|
| ESS alterado | 1- IIEs de Zhang et al. |  | Creación de un sitio ESS. Potencial alteración del <i>splicing</i> . |
| | 2- Sironi et al. - Motif 2 | | |
| | 3- Secuencias ESR de Goren et al. | | |

La columna “Algoritmo” muestra los algoritmos que analizaron la alteración. Al menos 2 algoritmos diferentes deben arrojar resultados que se superponen para que se considere un ESS relevante. El número pequeño que procede al nombre del algoritmo se corresponde con la representación gráfica de la señal predicha en la columna siguiente. En la columna de posición (cADN) se observa la representación gráfica de la región donde ocurrió el cambio nucleotídico. En cada señal, cada algoritmo está representado por una línea con un color diferente. Se observa que la posición y el *motif* varían entre algoritmos. En la parte superior de cada gráfico se ve la secuencia con el nucleótido WT en verde (si el sitio está alterado) o con el nucleótido variante en rojo (si un sitio nuevo fue creado). En la parte inferior, las posiciones exónicas. La última columna resume la interpretación de cada algoritmo aplicado. HSF: *Human Splicing Finder*; ESS: *Exonic splicing silencer*

La variante p.F150I, se encuentra reportada únicamente en dos de las bases de datos analizadas (9 de enero del 2020). En COSMIC se encuentra con el identificador COSM6951655 y está caracterizada por ser un cambio somático heterocigota proveniente de un carcinoma de hígado. En el cBioPortal tiene una entrada y muestra que la variante se ubica en el comienzo del segundo dedo de zinc zf-CCCH. No tiene asociado un identificador en el ENSEMBL y tampoco figura en el GnomAD.

Por ende, el impacto de la sustitución en el funcionamiento del U2AF1 se analizó mediante diversos sistemas de predicción. En Polyphen-2 se obtuvo un *score* de 0,996 concluyendo que el cambio de aminoácido es probablemente deletéreo. El sistema PROVEAN, con un *cut-off* de -2,5 y utilizando un total de 177 secuencias y 30 clústeres para hacer la predicción, mostró un score de -5,64, cuyo valor se interpreta como perjudicial. El SIFT, con un punto de corte de 0,05 y utilizando 222 secuencias para hacer el análisis, arrojó un *score* de 0, confirmando la predicción de los otros dos sistemas. Por lo tanto, la variante se interpreta como probablemente patogénica.

El estudio sobre la importancia relativa del aminoácido en la proteína de interés se llevó a cabo utilizando el programa *Universal Evolutionary Trace* (**Figura 35**). Se concluyó que la fenilalanina en la posición 150 de la proteína es un aminoácido importante en la formación de la estructura secundaria. Si bien tanto la fenilalanina como la isoleucina son aminoácidos no polares, el primero posee un anillo bencénico en su cadena lateral, mientras que el segundo un 1-metilpropilo. Esto concuerda y apoya lo encontrado con los algoritmos de predicción, que la sustitución afectaría de manera negativa a la estructura de la proteína.

Uno de los pacientes presentaba un riesgo muy bajo al diagnóstico según el IPSS-R con antecedentes de exposición a radioterapia como tratamiento por un adenocarcinoma de próstata. A los 2 años profundiza citopenias con requerimiento transfusional e inicia tratamiento con agentes hipometilantes. La variación fue detectada en la muestra analizada luego de 4 años de su diagnóstico durante su tratamiento. El paciente progresó a LMA 10 meses después con un desarrollo fatal a los 3 meses.

La paciente que portaba ambas variantes posee características de intersección clínica con la aplasia pura de glóbulos rojos ya que presenta anemia severa y un componente eritroide menor al 5%. Sin embargo, presenta displasia leve en línea mieloide y sideroblastos en anillo, resistencia a la eritropoyetina y, actualmente, se encuentra en plan de tratamiento con terapia

inmunesupresora. La presencia de otras variantes diferentes del *SF3B1* en estos pacientes se asocia a un pronóstico adverso. (Radich, 2015)

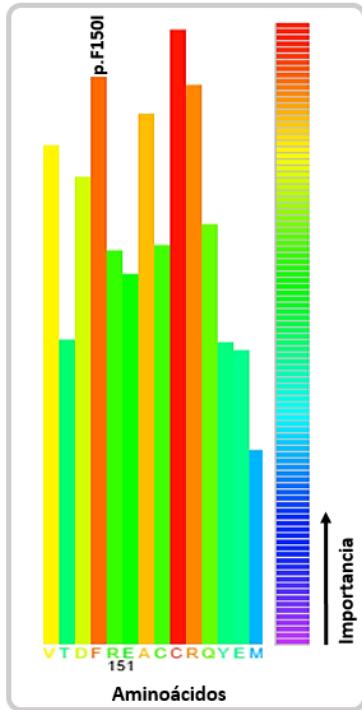


Figura 35: Importancia relativa de los aminoácidos involucrados en el exón 6 del *U2AF1*.

El histograma detalla la importancia de cada aminoácido particular involucrado en la región estudiada donde se produjeron las sustituciones. En negrita y al final de la columna se menciona la variante encontrada.

3.3 Descripción de las variantes en pacientes *U2AF1+*

El análisis de los exones 2 y 6 del *U2AF1* evidenció que 4/41 (9,8%) individuos *SRSF2/SF3B1-* presentaban variantes; distribuidas en igual proporción entre los exones 2 y 6 acorde a la **figura 36**. Estos pacientes no se agruparon en ningún subtipo de SMD en particular. Aquellos que tenían el exón 2 comprometido por las variantes p.C33C y p.S34F pertenecen a los subtipos AREB-2 y LMMC-2, respectivamente. El individuo portador de las variantes p.P146P y p.F150I en el exón 6 se recategorizó al subtipo ARSA, mientras que el que posee únicamente la sustitución p.F150I posee características vinculables con una CRDU secundaria.

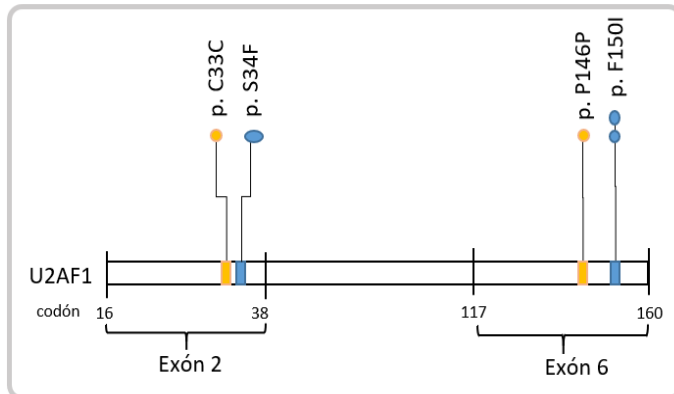


Figura 36: Variantes en el gen *U2AF1* y su clasificación

Representación esquemática de la distribución de mutaciones a lo largo de los exones 2 y 6 del *U2AF1*. Círculo azul: variante con cambio de sentido; círculo amarillo: variante sinónima. La cantidad de círculos se corresponde con la cantidad de individuos portadores de la variante.

4. Asociación con parámetros clínicos

Debido a que las variantes en *SF3B1* se asocian a características clínicas particulares (Papaemmanuil et al., 2011; Malcovati et al., 2011; Wang et al., 2019), los 14 pacientes *SF3B1*⁺ fueron comparados con los 28 individuos *U2AF1/SRSF2*⁺, incluyendo o no a las variantes sinónimas. Los parámetros evaluados fueron: los niveles de hemoglobina, recuento de plaquetas y neutrófilos, porcentaje de blastos en MO, supervivencia global y supervivencia libre de leucemia.

En relación a los niveles de hemoglobina, no se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos ($9,0 \pm 1,4$ vs $9,7 \pm 2,0$ g/dL, test de T, $p=0,294$), con resultados similares al excluir las variantes sinónimas. Sin embargo, en población de bajo riesgo con un IPSS-R $\leq 3,5$, el primer grupo reducido a 9 pacientes presentó niveles de hemoglobina significativamente inferiores con una media de $9,4 \pm 1,6$ g/dL (Mdn 9,0, RIQ 2,5 g/dL), mientras que el nivel fue de $10,5 \pm 2,4$ g/dL (Mdn 11,0, RIQ 1,9 g/dL) para los 11 *U2AF1/SRSF2*⁺ (Mann-Whitney U, $p=0,033$). Esta población de bajo riesgo no incluye individuos con variantes sinónimas (**Figura 37**).

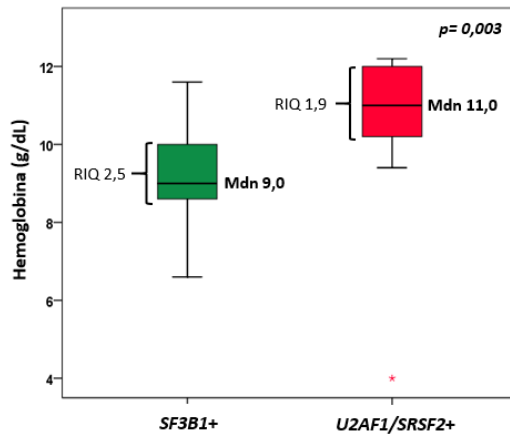


Figura 37: Niveles de hemoglobina de los pacientes *SF3B1*+ vs. *U2AF1/SRSF2*+

Test de Mann-Whitney U / Verde: niveles de hemoglobina de los pacientes *SF3B1*+; Rojo: niveles de hemoglobina de pacientes *U2AF1/SRSF2*++; RIQ: rango intercuartílico; Mdn: mediana. La caja representa el RIQ, mientras que la línea negra dentro de ellas representa la mdn. Los bigotes representan los niveles límites superior e inferior. La estrella roja corresponde a un dato atípico perteneciente al paciente que mostró las variantes p.P146P y p.F150I.

Como se puede apreciar en la **figura 38**, los pacientes *SF3B1*+ demostraron tener un porcentaje de blastos en MO significativamente menor (Mann-Whitney U, $p= 0,009$) con respecto a los pacientes *U2AF1/SRSF2*+, con una mediana de 0,0% (RIQ 2%) y 4,5% (RIQ 9%), respetivamente. De acuerdo a lo esperado, no se observaron diferencias significativas al analizar la población de bajo riesgo.

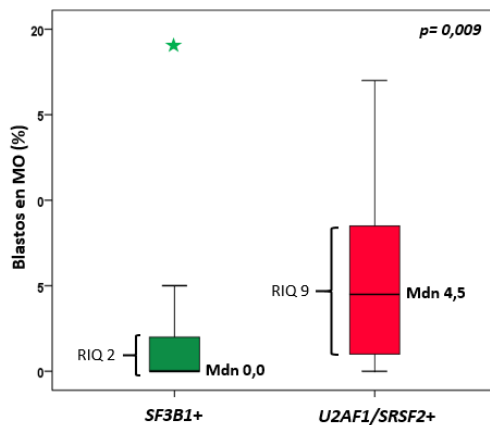


Figura 38: Porcentaje de blastos en MO en los pacientes *SF3B1*+ vs. *U2AF1/SRSF2*+

Test de Mann-Whitney U / Verde: porcentaje de blastos de pacientes *SF3B1*+; Rojo: porcentaje de blastos de pacientes *U2AF1/SRSF2*++; RIQ: rango intercuartílico; Mdn: mediana. La caja representa el RIQ, mientras que la línea negra dentro de ellas representa la mdn. Los bigotes representan los niveles límites superior e inferior. La estrella verde corresponde a un dato atípico perteneciente a un paciente que mostró la variante p.K700E con pronta evolución a LMA.

En relación a los recuentos de neutrófilos y de plaquetas, no se observaron diferencias significativas ni en la comparación general (**Tabla 16**) ni al excluir los pacientes de alto riesgo, teniendo o no en consideración la presencia de variantes sinónimas.

Tabla 16: Datos clínicos analizados en la población portadora de variantes en *SF3B1*, *U2AF1* y *SRSF2*

| Parámetro | Población | Media ± D.E | Mediana (rango) | RIQ |
|--------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|--------|
| Plaquetas (/μL) | <i>SF3B1</i> + | 187571 ± 143119,5 | 160000 (23000-587000) | 163250 |
| | <i>U2AF1/SRSF2</i> + | 150410 ± 106990,3 | 129000 (15000-374000) | 136250 |
| Neutrófilos (/μL) | <i>SF3B1</i> + | 2948,0 ± 2598,6 | 2034,2 (250-9108) | 3069 |
| | <i>U2AF1/SRSF2</i> + | 5856,7 ± 10099,2 | 1689 (180-49504) | 7435 |
| Hemoglobina (g/dL) | <i>SF3B1</i> + | 9,0 ± 1,4 | 9 (6,6-11,6) | 1,9 |
| | <i>U2AF1/SRSF2</i> + | 9,7 ± 2,0 | 9,8 (4,0-12,2) | 3,9 |
| Blastos en MO (%) | <i>SF3B1</i> + | 2,2 ± 5,1 | 0,0 (0-19) | 2 |
| | <i>U2AF1/SRSF2</i> + | 5,8 ± 5,2 | 4,5 (0-17) | 9 |

D.E: desvío estándar; RIQ: rango intercuartílico; MO: médula ósea

Al evaluar el impacto en el pronóstico de estos hallazgos, la sobrevida global fue significativamente mayor en pacientes portadores de variantes en *SF3B1* con una mediana de 60,5 (IC95% 40,4 – 80,7) meses, mientras que aquellos *U2AF1/SRSF2*+ poseen una mediana de 28,0 (IC95% 20,8 – 35,3) meses (test de Log-Rank, Mantel Cox, $p=0,048$). En la **figura 39** se observa la curva según Kaplan-Meier para la sobrevida global de los grupos evaluados. Al excluir un individuo de cada grupo que presentaba variantes sinónimas se observa una tendencia donde se manifiesta el buen pronóstico de los pacientes *SF3B1*+ con un leve incremento en la mediana de los pacientes *U2AF1/SRSF2*+ (60,5 vs 31,3 meses, $p=0,068$).

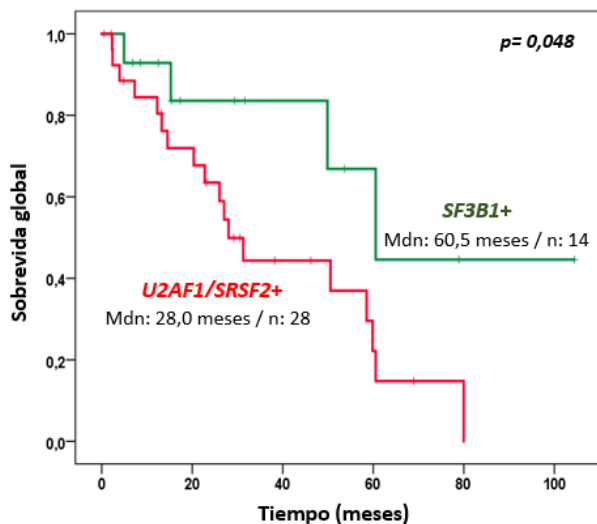


Figura 39: Sobrevida de los pacientes *SF3B1*+ vs *U2AF1/SRSF2*+

Curva según Kaplan Meier / Verde: sobrevida de pacientes *SF3B1*+; Rojo: sobrevida de pacientes *U2AF1/SRSF2*+; Mdn: mediana; n: cantidad de individuos. Cada caída representa el evento de muerte de un paciente, mientras que líneas finas perpendiculares indican la censura del paciente al último seguimiento.

Finalmente, como se puede observar en la **figura 40** los pacientes *SF3B1*+ evidenciaron una tendencia a una mayor sobrevida libre de leucemia ($p=0,094$). El 25% *U2AF1/SRSF2*+ evolucionó a LMA a los 21,6 meses, mientras que este percentilo no se alcanzó para los

pacientes *SF3B1*+ durante el período de seguimiento. Al excluir los pacientes con variantes sinónimas se pierde la tendencia estadística a expensas de un incremento en el tiempo de evolución de los individuos *U2AF1/SRSF2*+ de 25 meses ($p=0,138$).

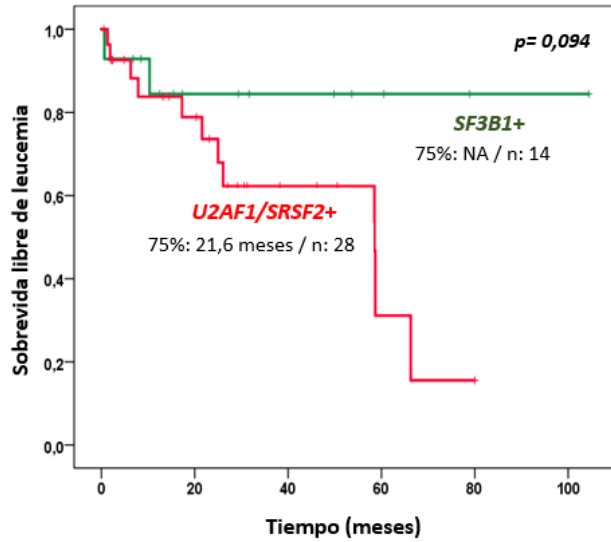


Figura 40: Sobrevida libre de leucemia de los pacientes *SF3B1*+ vs *U2AF1/SRSF2*+

Curva según Kaplan Meier / Verde: sobrevida libre de leucemia de pacientes *SFB31*+; Rojo: sobrevida libre de leucemia de pacientes *U2AF1/SRSF2*+; Mdn: mediana; n: cantidad de individuos; cada caída representa el evento de evolución a LMA de un paciente, mientras que líneas finas perpendiculares indican la censura del paciente al último seguimiento

Discusión

DISCUSIÓN

Los SMD son un conjunto de enfermedades hematológicas clonales altamente heterogéneas que afectan la célula madre hematopoyética. La presencia de displasia/s acompañada de citopenia(s) es un reflejo de la hematopoyesis ineficaz y múltiples mecanismos pueden colaborar en la etiología y/o la progresión de la enfermedad. Estos pacientes, cuya edad mediana es de alrededor de 68 años, suelen tener diversas vías biológicas alteradas y, particularmente, la vía mayormente afectada es la de la maquinaria de corte y empalme. (Papaemmanuil et al., 2011; Bejar y Steensma, 2014; Haferlach et al., 2014) Además, la presencia de variantes en estos genes se torna más común a medida que las personas envejecen y se asocian a un aumento en el riesgo de desarrollar patologías hematológicas. (Genovese et al., 2014) Esto sugiere un papel crítico de la regulación del *splicing* del ARN en la patogenicidad de la enfermedad. (Shiozawa et al., 2018)

La eliminación de los intrones en el proceso de corte y empalme de los ARNm inmaduros es un proceso elemental en la expresión de la mayoría de los genes humanos. Es uno de los mecanismos responsables de la gran diversidad de proteínas, ya que permite la formación de múltiples isoformas a partir de un único transcrito primario. Este proceso es llevado a cabo mediante el espliceosoma, un complejo de 5 snRNPs, U1, U2, U4, U5 y U6, y proteínas asociadas. En el proceso de corte y empalme, la formación del complejo ocurre en diversas etapas finamente reguladas. Los genes de la maquinaria que se encuentran con mayor frecuencia alterados en pacientes con SMD son: *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2* y *ZRSR2*, los cuales forman parte del complejo E/A de *splicing* que se encarga del reconocimiento del 3'SS en las fases tempranas del procesamiento del ARNm inmaduro. (Yoshida et al., 2011; Papaemmanuil et al., 2013) En este proceso, el SF1 se une al BPS río arriba del 3'SS y *SRSF2* y *ZRSR2* se unen al ESE del exón adyacente para ayudar en la unión y estabilidad del *U2AF1* y *U2AF2* (complejo E). El *SF3B1* es un componente central del snRNP-U2 y está involucrado en el reconocimiento del BPS, dirigiendo el snRNP-U2 al 3'SS (complejo A). (Schellenberg et al., 2011; Pellagatti y Boulwood, 2017)

Las alteraciones en los miembros del complejo de corte y empalme, sus consecuencias, sus dianas específicos y el efecto a nivel transcripcional no han sido completamente aclarados. Debido a que existe información limitada de las características moleculares de los pacientes afectados por variantes en *SF3B1* y *U2AF1*, resulta clave su estudio. La importancia de la

detección de estas variantes, no sólo yace al momento del diagnóstico sino también en la estadificación de riesgo y en la selección o desarrollo de nuevas estrategias terapéutica.

1. Detección de variantes en *U2AF1* y *SF3B1* en la población seleccionada

En el presente trabajo se analizó la presencia de variantes en los exones 14 y 15 del *SF3B1* y los exones 2 y 6 del *U2AF1* en un total de 55 pacientes *SRSF2*⁻, seleccionados al azar, diagnosticados con diversos subtipos de SMD. A fines comparativos, se incluyeron 24 pacientes con SMD *SRSF2*⁺ (exón 1 - codón caliente P95), previamente analizados en el laboratorio por Serale et al., SAH 2017. El criterio de selección de los pacientes se basó en el carácter excluyente que presentan los factores del espliceosoma ya que la coexistencia de variantes en *SF3B1*, *U2AF1* y *SRSF2* serían incompatibles con la vida de la célula. (Pellagatti y Boulwood, 2017; Visconte et al., 2019)

Las variantes adquiridas en el linaje hematopoyético se pueden detectar mediante diversas técnicas de tamizaje. En este trabajo se optó por la técnica PCR-SSCP debido a que es una manera rápida y sencilla de detectar la presencia de variantes si se incorporan controles positivos. Sin embargo, tiene una desventaja directamente relacionada a la longitud del amplicón analizado. La técnica disminuye su sensibilidad a determinadas alteraciones en los fragmentos >300pb, adoptando siempre la misma conformación tridimensional a pesar de haberse producido un cambio nucleotídico en su secuencia. (Orita et al., 1989) Debido a esta limitante la técnica se utilizó solamente para los productos del exón 15 del *SF3B1* (209pb) y los exones 2 y 6 del *U2AF1* (161pb y 203pb, respectivamente). La generación de controles positivos, mediante la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, de las sustituciones más frecuentemente reportadas en la literatura, permitió optimizar las condiciones para su correcta visualización. La confirmación de todas las variantes obtenidas y la detección en el caso particular del exón 14 del *SF3B1* (375pb) se realizó mediante secuenciación automática de Sanger.

1.1 Variantes en *SF3B1*

Los primeros trabajos que describen la presencia de estas variantes en los SMD fueron publicados casi en simultaneidad a fines de 2011 por Yoshida et al. y Papaemmanuil et al.. El primer grupo estudió, mediante secuenciación de exoma completo, una serie de 29 pacientes

con SMD. (Yoshida et al., 2011) Mientras que, Pappaemanuil et al. 2011, evaluaron 9 pacientes con la misma metodología y, luego, estudiaron todos los dominios HEAT del gen mediante técnicas de NGS en 2087 individuos provenientes del ICGC con SMD u otros tipos de cáncer no mieloides. En la presente serie, el análisis del gen *SF3B1* reveló que un 27,5% (14/51) de los pacientes *SRSF2/U2AF1*- evidenciaron variantes distribuidas de manera equitativa entre los exones 14 y 15. Este valor concuerda con la literatura, el cual varía entre 23 y 35%. (Malcovati et al., 2011; Bejar y Steensma, 2014; Visconte et al., 2015) Sin embargo, fue superior al 18% detectado en población proveniente del norte de Tailandia, donde se estudiaron los mismos exones y la misma cantidad de pacientes, y al 7% detectado en población de origen brasilero al analizar los exones 12-15 mediante secuenciación de Sanger. (Donaires et al., 2016; Yimpak et al., 2019) Janusz et al., 2017 sugieren que al estudiar sólo los exones 14 y 15 se obtiene el 94% de las variantes en pacientes con sideroblastos en anillos. En relación a la asociación con este hallazgo morfológico, el 80% (4/5) de los individuos que pertenecían a los subtipos ARSA y CRDM-SA mostraron alteraciones, porcentaje similar al 83% reportado por Malcovati et al. 2011. La sustitución p.K700E se encontró con mayor frecuencia y se ve validada en ser el cambio más veces registrado en las bases de datos consultadas (**Anexo 1**). Sin embargo, la misma representó el 36% (5/14) de los cambios obtenidos en el *SF3B1*, resultando en un porcentaje menor al 55% reportado por Pappaemanuil, et al. 2011 y Yimpak et al. en 2019. La ubicación geográfica del paciente, como el origen del tejido afectado, la metodología aplicada, el número reducido de pacientes, entre otros factores, puede afectar los resultados obtenidos.

Una de las muestras que presentó el cambio p.K700E fue evaluado mediante NGS. La utilización de paneles mieloides no sólo confirmó la presencia de la sustitución con una frecuencia del 44%, sino que también evidenció que coexistía con otras variantes patogénicas pertenecientes al *TET2* (p.Y1245fs*22 , p.L1721W y p.P363L). Si bien *SF3B1* no suele verse acompañado de otras alteraciones además de *DNMT3A* (Papaemmanuil et al., 2013), ocasionalmente, los pacientes *SF3B1*+ presentan, además, variación en *TET2*. Un estudio realizado en 2019 por Song et al. describen que los pacientes *SF3B1*+ o *SF3B1/TET2*+ muestran una mayor sobrevida libre de progresión a LMA en comparación a aquellos *TET2*+. Además, los pacientes con ambos genes alterados suelen tener, con mayor frecuencia, un incremento en los sideroblastos en anillo, similar a los pacientes *SF3B1*+. Finalmente, aquellos pacientes *SF3B1/TET2*+ poseen una sobrevida mediana significativamente mayor que los

SF3B1⁺. Debido a esto, portar *TET2* alterado en conjunto con *SF3B1* no parecería tener efectos adicionales y el pronóstico de estos pacientes sería al menos igual o mejor que los pacientes con la variante aislada. (Song et al., 2019)

Las variantes p.R625C, p.K666N, p.H662Q, p.T663I y p.P615H se encuentran en orden decreciente en las diversas bases de datos consultadas. Todas ellas son sustituciones heterocigotas, patogénicas y forman parte de los aminoácidos conservados. Estos cambios tuvieron una frecuencia menor del 2% (1/51) cada una, inferior las descritas por Malcovati et al. 2011 en donde establece una frecuencia del 6%, 10,7% y 10,1% para las primeras tres variantes mencionadas, respectivamente. La diferencia en las frecuencias puede deberse al número reducido de pacientes analizado, coincidiendo con Yimpak et al, 2019 quienes también encontraron las variantes p.R625C y p.H662Q con la misma frecuencia.

Las sustituciones p.V635E y p.A713G no han sido reportadas previamente en ninguna de las bases de datos consultadas y resultaron ser probablemente patogénicas al aplicar diversos algoritmos de predicción., Esto concuerda con lo descrito por Visconte et al. en 2015 sobre los efectos deletéreos que presentan las variantes que afectan a los 4 dominios HEAT de la proteína. Las sustituciones en estos dominios conllevan al incremento en alteraciones aberrantes en el uso del 3'SS, lo que conlleva a una reducción pronunciada de transcritos canónicos. Entre los genes afectados se encuentran supresores de tumores (por ejemplo, *NF1*, *DICER1*, *PML*, *PDS5A*, *MAP3K7* y *PPP2R5A*) y genes relacionados con el metabolismo de hierro mitocondrial o la biosíntesis del hemo (por ejemplo: *ABCB7*, *PPOX* y *TMEM14C*). (Shiozawa et al., 2018) Por su parte, el cambio nucleotídico correspondiente a la sustitución p.M620I también es novel y, si bien se asociaría a un cambio tolerado, la caracterización cristalográfica del residuo es dificultosa, y este paciente presentó 5% de sideroblastos anillados avalando su posible patogenicidad.

Finalmente, se detectó el cambio sinónimo p.R702R cuya variante alélica posee una frecuencia muy baja en población general. Los programas de predicción mostraron su carácter perjudicial al generar una falla en el reconocimiento de uno de los *motif* del ESE por parte del SRSF1. El cambio nucleotídico afectaría la correcta maduración de su propio ARNm y, consecuentemente, podría clasificarse como posiblemente patogénica. La diferencia en el mecanismo relacionado a esta variante justificaría la ausencia de sideroblastos en anillo en este paciente.

1.2 Variantes en *U2AF1*

La detección de variantes en *U2AF1* reveló una frecuencia del 9,8% (4/41 *SF3B1/SRSF2*-). En pacientes con SMD se observa un porcentaje entre 7,5-8,0% descrito por Wu et al., 2013, Haferlach et al., 2014 y Wang et al., 2019 donde se estudiaron 421, 944 y 4320 pacientes, respectivamente, los cuales se incrementan alrededor del 14% al excluir los pacientes *SF3B1/SRSF2*+ (Wu et al. 2013, Haferlach et al. 2013). Los cambios tuvieron una relación de sexo masculino/femenino de 3 (3/1), favoreciendo a los pacientes de sexo masculino por sobre el femenino, lo cual coincide con Wang et al. 2019. Además, si bien la relación entre edad y la presencia de variantes en el gen es un tema controversial, parecería ser más frecuente en pacientes jóvenes (Wu et al. 2013, Wang et al. 2019), con un predominio en <40 años. (Li et al. 2017) En el presente estudio, contrariamente, 3 de los 4 pacientes poseían una edad > 72 años y, el restante, 55 años. Además, los pacientes se clasificaron en diferentes subtipos morfológicos.

En la literatura, las variantes en *U2AF1* son reconocidas por provocar el *splicing* diferencial en múltiples genes, afectando diversas vías biológicas como la metilación *de novo* del ADN (*DNMT3B*), la inactivación del cromosoma X (*H2AFY*), la respuesta al daño de ADN (*ATR*, *FANCA*) y la apoptosis (*CASP8*). (Ilagan et al., 2015)

Las alteraciones que afectan a los dedos de zinc del *U2AF1*, en particular a los residuos p.S34 y p.Q157, se caracterizan por modificar el uso alternativo de exones o *exon cassette* al reconocer preferentemente ciertos nucleótidos en las posiciones -3 y +1 flanqueantes al AG del 3'SS. Estas posiciones responden al motivo de reconocimiento yAGr donde el "y" corresponde a una pirimidina y el "r" a una purina (**Figura 41**).

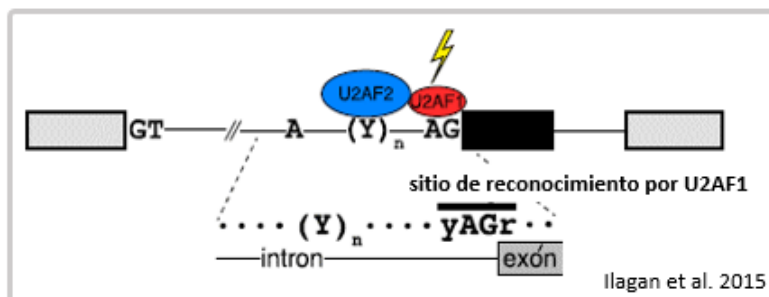


Figura 41: Representación esquemática de la interacción entre *U2AF1* y 3'SS del exón *cassette* (negro)

Las alteraciones p.S34F/Y, ubicadas en el primer dedo de zinc, conducen a la exclusión preferencial de exones precedidos por el motivo intrónico (posición -3) -UAG-. Por otro lado,

las variantes p.Q157P/R, que afectan al segundo dedo de zinc, excluyen preferencialmente los exones que comienzan (posición +1) con el motivo **-AGA-** (**Figura 42**). La preferencia contribuye a la patogenicidad ya que generan cambios cuantitativos en el *splicing* de múltiples genes (Przychodzen et al., 2013; Brooks et al., 2014; Ilagan et al., 2015; Biancon et al., 2019) Ilagan et al., 2015 sugieren que las características distintivas que presentan las alteraciones de los residuos mencionados podrían definir nuevos subtipos para SMD, aportando a la heterogeneidad de la patología.

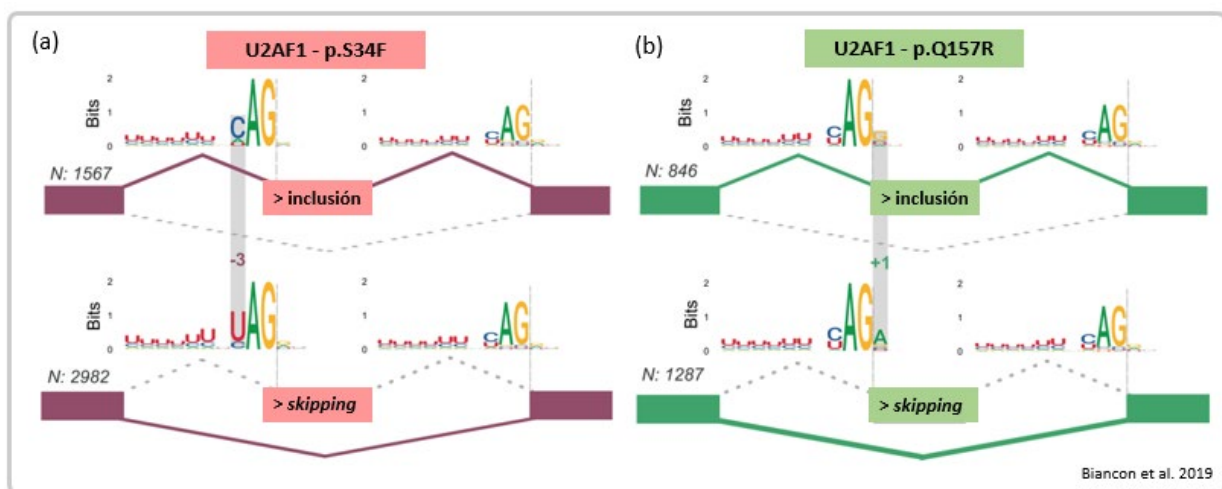


Figura 42: Consenso 3' SS de los *exon cassettes* con inclusión o *skipping* en células expresando las variantes (a) p.S34F y (b) p.Q157R

Sombreadas en gris: las posiciones -3 o +1 según corresponda. Contenido de información en bits, N: número de *exon cassette* con favorecimiento de inclusión o de *skipping*.

Un paciente presentó la variante p.S34F, con una frecuencia del 25% (1/4) entre las muestras *U2AF1+*. Graubert et al., 2012 y Hahn et al., 2012 la describen como altamente específica y recurrente. En particular, Graubert et al. le otorga un 62% de frecuencia en pacientes *U2AF1+*. Esta sustitución se observa altamente reportada en las diversas bases de datos consultadas (**Anexo 1**) y se la considera patogénica. Cabe destacar que su patogenicidad no sólo se debe a las consecuencias mencionadas previamente sino también a la alteración de una función no canónica de la proteína. El *U2AF1* une directamente los ARNm maduros en el citoplasma, regulando negativamente la traducción. Este rol del *U2AF1*, independiente de su función en el *splicing*, se ve alterado también por la presencia de la variante p.S34F. Una consecuencia funcional es el aumento de la síntesis de la interleucina 8 que contribuye a la metástasis, la inflamación y la progresión del cáncer en ratones y humanos. Por ende, esta variante tiene el potencial de desempeñar funciones tanto autónomas como no autónomas en la

progresión de la patología. Los autores sugieren que las células portadoras se verían favorecidas en condiciones de falta de nutrientes o hipoxia. (Palangat et al., 2019) Esto último, podría haber contribuido en el desarrollo fatal del individuo por sepsis en dos meses.

La sustitución p.F150I se encontró en 2 de los 41 pacientes *SRSF2/SF3B1*- analizados y, aunque ha sido descripta previamente en carcinoma de hígado, no ha sido reportada en SMD. La fenilalanina se ubica al comienzo del segundo dedo de zinc y este sitio es de gran importancia para la proteína. Esta sustitución probablemente patogénica, con una ubicación cercana al otro residuo recurrente p.Q157, podría afectar de una manera similar las funciones no canónicas de *U2AF1*. Los cambios en la maquinaria de traducción son particularmente relevantes en SMD asociados a la haploinsuficiencia de *RPS14* en el SMD asociado al 5q- (Ebert et al., 2008; Vlachos, 2017). También existen otros síndromes asociados a falla medular con características clínicas que dificultan el diagnóstico diferencial que últimamente se agrupan dentro de las “ribosomopatías”. La Anemia de Blackfan-Diamond se caracteriza por una aplasia pura de glóbulos rojos y la presencia de variantes germinales en diversos miembros de la familia de genes que codifican proteínas ribosomales. (Wlodarski et al., 2018) En particular, el segundo paciente presentaba características de superposición con la aplasia pura de glóbulos rojos y sideroblastos en anillo.

Dos cambios sinónimos fueron encontrados, uno en el primer dedo de zinc p.C33C y uno en el segundo p.P146P, este último se encontró acompañando la variante p.F150I. La primer variante mencionada tendría las mismas consecuencias que el p.R702R del gen *SF3B1*, un *motif* reconocido por *SRSF1* comprometido por el cambio nucleotídico, causando una falla en su consenso. El segundo cambio afectaría el reconocimiento por parte de *SRSF1* y de *SRSF5*. En ambos casos se vería favorecido la omisión de exones del propio *U2AF1*.

Finalmente, diversos autores han mencionado la coexistencia de las variantes en *U2AF1+* y en *ASXL1*, *JAK2* o *DNMT3A*. (Thol et al., 2012; Damm et al., 2012; Wu et al., 2013; Tefferi, Mudireddy, et al., 2018) Particularmente, Serale *et al.* (Tesis de Maestría en Biología Molecular Médica, Universidad de Buenos Aires, manuscrito en preparación) analizaron la región que involucra al codón caliente R882 de *DNMT3A* y ninguno de los pacientes *U2AF1+* presentó variantes acompañantes.

2. Relación con características clínicas

La pesquisa de variantes en genes relacionados a los SMD contribuye como un co-criterio en el diagnóstico de estos pacientes. (Valent et al., 2007; Steensma, 2018) Sin embargo, la premisa es que estos pacientes presenten displasia en, al menos, 10% de un linaje hematopoyético acompañado de citopenia persistente. Particularmente, en *SF3B1* aporta a la nueva clasificación de los pacientes según las pautas establecidas por la OMS en 2016 en presencia de, al menos, 5% de sideroblastos en anillo. (Arber et al., 2016) La necesidad de establecer criterios decisivos se basa en que un subconjunto de los genes que se encuentran afectados en pacientes con SMD, también se observan en menor porcentaje en personas clínicamente sanas. Las variantes en *SF3B1* y en *U2AF1* se encuentran, en esta población, con una incidencia del 0,11% (13/11845) y 0,01% (1/11845) respectivamente. Estos cambios nucleotídicos pueden representar eventos tempranos característicos en el desarrollo de cánceres hematológicos con un riesgo de progresión de 0,5-1% por año. (Genovese et al., 2014; Steensma et al., 2015)

Múltiples autores como Thol et al., 2012 y Wu et al., 2013 han mencionado que los individuos con SMD portadores de *SF3B1*⁺ se asocian a buen pronóstico, mientras que los pacientes *SRSF2*⁺ o *U2AF1*⁺ se asocian a un pronóstico adverso. Las variantes en *SF3B1* se asocian fuertemente con parámetros clínicos distintivos: niveles bajos de hemoglobina, menor proporción de blastos en MO y una sobrevida mayor. (Papaemmanuil et al., 2011; Malcovati et al., 2011; Shahrabi et al., 2016) Los pacientes *SF3B1*⁺ pertenecientes a la población de bajo riesgo analizada, poseían niveles de hemoglobina significativamente menores a aquellos *U2AF1/SRSF1*⁺. Sin embargo, la diferencia no se evidenciaba al incorporar el total de los pacientes afectados y esto se puede deber a que los niveles de citoténias se profundizan conforme progresa la enfermedad. Adicionalmente, el grupo de *SF3B1*⁺ demostró tener un porcentaje de blastos en MO significativamente menores. Estas diferencias no se observaron en la población de bajo riesgo, lo cual es esperable ya que los pacientes de bajo riesgo presentan bajos porcentajes de blastos en su MO. Aunque Malcovati et al. 2015, Rujirachaivej et al. 2018 y Yimpak et al. 2019, asocian las variantes en *SF3B1* a un mayor recuento de plaquetas y neutrófilos, en la presente serie, no se pudieron confirmar estos hallazgos.

En relación al pronóstico, el análisis de la sobrevida de los pacientes *SF3B1*⁺ vs aquellos *U2AF1/SRSF2*⁺ evidenció una mayor sobrevida global y sobrevida libre de progresión

en los portadores de variantes en *SF3B1*. El mayor porcentaje de blastos en médula ósea en *U2AF1* o *SRSF2* se considera un factor no favorable, brindándoles a estos pacientes un incremento en la probabilidad de progresión a LMA. (Thol et al., 2012; Wu et al., 2012; Meggendorfer et al., 2012; Wang et al., 2019). Particularmente, Wang et al. 2019 realizaron un meta-análisis involucrando 19 estudios (4320 pacientes con SMD) y confirmaron el pronóstico adverso de las variantes en *U2AF1*.

Dentro de los nuevos abordajes y con la finalidad de incorporar estas determinaciones en los sistemas de predicción de riesgo, el modelo de la Clínica Mayo (*Mayo Alliance Prognostic Model*) propone como factor de riesgo a la ausencia de variantes en *SF3B1* (Tefferi et al, 2018). Por su parte, el modelo de Cleveland recomienda, entre otros parámetros, ajustar el valor del IPSS-R de acuerdo a la presencia de variantes en *SF3B1* como un factor protector en la predicción de sobrevida global. (Nazha et al., 2016; Tefferi, Gangat, et al., 2018)

Conclusiones

CONCLUSIONES

Puesta a Punto

- Se logró la amplificación mediante PCR de los productos correspondientes a los exones 14 y 15 del gen *SF3B1* y de los exones 2 y 6 del *U2AF1*.
- Se construyeron controles positivos de los sitios calientes pertenecientes al exón 15 del *SF3B1* (p.K700E) y a los exones 2 y 6 del *U2AF1* (S34/Y/F y Q157/P/R, respectivamente) mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.
- Se diferenciaron bandas atípicas, mediante la técnica SSCP, correspondientes a diversos cambios nucleotídicos en los exones analizados (*SF3B1*-exón 15 y *U2AF1*-exón 2 y 6).

Secuenciación de ADN

- Este método clásico según Sanger permitió confirmar e identificar todas las variantes encontradas mediante SSCP como también los cambios en el exón 14 del *SF3B1*.
- Un paciente portador de la variante p.K700E del *SF3B1* fue analizado utilizando paneles mieloides logrando identificar mutaciones co-existentes en *TET2*.

Variantes Detectadas

- Se estudiaron 55 muestras de pacientes con SMD *SRSF2*-, de los cuales un 27,5% presentaron variantes en *SF3B1* y un 9,8% en *U2AF1*.
- Se identificaron un total de 14 variantes en *SF3B1*, 13 de las cuales fueron con cambio de sentido y la restante sinónima. Entre ellos, 5 pacientes presentaron la variante clásica p.K700E; mientras que, 3 se destacaron por poseer cambios nucleotídicos nóveles correspondientes a las sustituciones p.M620I, p.V635E y p.A713G.
- Se encontraron 4 pacientes con variaciones *U2AF1*: 2 con cambio de sentido y 2 sinónimas. Entre ellos, 1 paciente presentó la variante caliente p.S34F, 2 portaron la sustitución p.F150I, la cual no ha sido reportada previamente en SMD, uno de los cuales también presentó el cambio sinónimo p.P146P
- Todas las variantes que tuvieron como consecuencia un cambio de aminoácido, a excepción de la p.M620I del *SF3B1*, se interpretaron como posiblemente patogénicas.
- Los cambios sinónimos detectados poseían una frecuencia alélica inferior al 0,5% según las bases de datos consultadas y afectarían el propio *splicing*.

Relación con Parámetros Clínicos

- Los pacientes portadores de variantes en *SF3B1*, en comparación con los *U2AF1/SRSF2*+, se asociaron a buen pronóstico ya que mostraron una sobrevida global y libre de leucemia más prolongada relacionada a un menor porcentaje de blastos en MO. Sin embargo, los pacientes de bajo riesgo presentaron menores niveles de hemoglobina.

Perspectivas Futuras

PERSPECTIVAS FUTURAS

Estos resultados preliminares sentaron las bases de la detección de estas variantes en nuestra población. El hallazgo de sustituciones nóveles y la presencia de cambios sinónimos ameritan estudios en mayor profundidad, como RNAseq, a fin de corroborar si los mismos interfieren o no con el correcto corte y empalme. Además, para poder aportar a la caracterización de los cambios identificados, sería de gran interés evaluar el efecto que imponen en la estructura funcional de la proteína. Por otra parte, continuar con la detección de variantes en los exones que no se abarcaron en este trabajo evidenciaría el porcentaje pequeño de variantes que se encuentran fuera de las regiones calientes. Si bien se pudo confirmar la asociación con parámetros de impacto clínico, se debería incrementar el tamaño muestral a fin de fortalecer los hallazgos obtenidos. Finalmente, con la incorporación del Luspatercept en la práctica clínica, en el futuro cercano, se podría evaluar el impacto de las variantes encontradas en *SF3B1* en relación a la respuesta obtenida.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

ANCZUKOW, O. y KRAINER, A. "Splicing-factor alterations in cancer", *RNA*, 2016, 22 (9), 1285- 1301. ISSN 14699001

ARBER, D., *et al.* "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia", *Blood*, 2016; 127 (20), 2391–2405. ISSN 15280020

ASLAN, D., *et al.* "Tumor suppressor microRNAs are downregulated in myelodysplastic syndrome with spliceosome mutations", *Oncotarget*, 2016, 7, (9), 9951-63.

AUJLA, A., *et al.* "SRSF2 mutations in myelodysplasia/myeloproliferative neoplasms", *Biomarker Research*, 2018, 6 (1).

BEHJATI, S. y TARPEY, P. "What is next generation sequencing?", *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 2013, 98 (6), 236-238. ISSN 17430585

BEJAR, R., LEVINE, R. y EBERT, B. "Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes", *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2011, 29 (5), 504-515. ISSN 1527-7755

BEJAR, R., *et al.* "Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes", *Journal of Clinical Oncology*, 2012, 30 (27), 3376-3382. ISSN 0732183X

BEJAR, R. y STEENSMA, D. "Recent developments in myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2014, 124 (28), 2793-2803. ISSN 15280020

BELLI, C., *et al.* "Application of the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for Myelodysplastic Syndromes (MDS) in 511 Argentinean patients", *Hematología*, 2014, 18 (1), 24-32.

BELLI, C., *et al.* "Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients", *American Journal of Hematology*, 2015, 90 (10), 851-858. ISSN 10968652

BENBOUZA, H., *et al.* "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels", *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2006, 10 (2), 77-81.

BENNETT, J., *et al.* "Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes", *British Journal of Haematology*, 1982, 51 (2), 189-199. ISSN 0007-1048

BENNETT, J., *et al.* "Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group", *Annals of internal medicine*, 1985, 103 (4), 620-625. ISSN 0003-4819

-
- BENNETT, J. "The myelodysplastic syndromes: A personal recollection of four decades of classification and prognostic scoring systems", *Leukemia & Lymphoma*, 2013, 54 (12), 2588-2591. ISSN 10428194
- BIANCON, G., *et al.* "U2AF1 Driver Mutations in hematopoietic disorders alter but do not abrogate RNA binding and enlighten structural dependencies of the U2AF-RNA complex", *Blood*, 2019, 134 (Supplement_1), 1230-1230. ISSN 0006-4971
- BROOKS, A., *et al.* "A pan-cancer analysis of transcriptome changes associated with somatic mutations in U2AF1 reveals commonly altered splicing events", *PLoS ONE*, 2014, 9 (1). ISSN 19326203
- CAMACHO M., *et al.* "Implicancia en la presencia de mutaciones en el gen SRSF2, NRAS Y FLT3 en pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD)", Mar del Plata: XXII Congreso Argentino de Hematología, 2015
- CAZZOLA, M. y MALCOVATI, L. "Myelodysplastic syndromes-coping with ineffective hematopoiesis", *The New England journal of medicine*, 2005, 352 (6), 536-538. ISSN 1533-4406
- CAZZOLA, M., ROSSI, M., MALCOVATI, L. "Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms", *Blood*, 2013 121 (2), 260-269. ISSN 00064971
- CRETU, C., *et al.* "Structural basis of splicing modulation by antitumor macrolide compounds molecular cell structural basis of splicing modulation by antitumor macrolide compounds", *Molecular Cell*, 2018, 70, 265–273.
- CRISP, R., *et al.* "Accesibilidad de herramientas diagnóstico-terapéuticas para los pacientes con síndromes mielodisplásicos en la República Argentina", *Hematología*, 2017, 21 (2), 127-138.
- DAMM, F., *et al.* "Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2012, 119 (14), 3211-3218. ISSN 00064971
- DAS, M., CHAUDHURI, S. y LAW S. "Unveiling the paradoxical nature of myelodysplastic syndromes (MDS): why hypercellular marrow strongly favors accelerated apoptosis", *Biochemistry and Cell Biology*, 2013, 91 (5), 303-308. ISSN 12086002
- DONAIRES, F., *et al.* "Splicing factor SF3B1 mutations and ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes: a Brazilian cohort screening study", *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 2016, 38 (4), 320-324. ISSN 1516-8484
- DOTSON J. y LEBOWICZ, Y. "Myelodysplastic Syndrome", *StatPearls*, 2019.

EBERT, B., *et al.* "Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen", *Nature*, 2008, 451 (7176), 335-339. ISSN 14764687

ENRICO, A., *et al.* "Anemia in Myelodysplastic Syndromes", en "Anemia: Prevalence, Risk Factors and Management Strategies", New York, 2014, p. 65-98

FENAUX, P., KILADJIAN, J. y PLATZBECKER, U. "Luspatercept for the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes and primary myelofibrosis", *Blood*, 2019, 133 (8), 790-794. ISSN 15280020

GANGAT N., PATNAIK M. y TEFFERI, A. "Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat", *American Journal of Hematology*, 2016, 91 (1),76-89. ISSN 03618609

GENOVESE, G., *et al.* "Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence", *New England Journal of Medicine*, 2014, 371 (26), 2477-2487. ISSN 0028-4793

GERMING, U., *et al.* "Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment", *Deutsches Arzteblatt International*, 2013, 110 (46), 783-790. ISSN 18660452

GRAUBERT, T., *et al.* "Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes", *Nature Genetics*, 2012, 44 (1), 53-57. ISSN 10614036

GREENBERG, P., *et al.* "International scoring system for evaluating prognosis in MDS" *Blood*, 1997, 89 (6), 2079-2088. ISSN 00064971

GREENBERG, P., *et al.* "Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2012, 120 (12), 2454-2465. ISSN 00064971

HAFERLACH, T., *et al.* "Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes", *Leukemia*, 2014, 28 (2), 241-247. ISSN 08876924

HAHN, C. y SCOTT, H. "Spliceosome mutations in hematopoietic malignancies", *Nature Genetics*, 2012, 44 (1), 9-10. ISSN 10614036

HANSSENS, K., *et al.* "SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes", *Haematologica*, 2014, 99 (5), 830-835. ISSN 15928721

HOSONO, N. "Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS", *International Journal of Clinical Oncology*, 2019, 24 (8), 885-892. ISSN 14377772

HUMPHRIES, S., GUDNASON, V. y WHITTALL, R. "Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia", *Clinical Chemistry*, 1997, 43 (3), 427–435.

ILAGAN, J., *et al.* "U2AF1 mutations alter splice site recognition in hematological malignancies", *Genome Research*, 2015, 25 (1), 14-26. ISSN 15495469

JAFFE, E., *et al.* "Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues", Lyon: World Health Organization, 2001, 351. ISBN 978-92-832-2411-2

JANUSZ, K., *et al.* "A two-step approach for sequencing spliceosome-related genes as a complementary diagnostic assay in MDS patients with ringed sideroblasts", *Leukemia Research*, 2017, 56, 82-87.

KAPLAN, E. y MEIER, P. "Nonparametric Estimation from Incomplete Observations", *Journal of the American Statistical Association*, 1958, 53 (282), 457-481. ISSN 1537274X

KENNEDY, J. y EBERT, B. "Clinical implications of Genetic mutations in Myelodysplastic syndrome", *Journal of Clinical Oncology*, 2017, 35 (9), 968-974. ISSN 15277755

KIM, Y., *et al.* "Genetic and epigenetic alterations of bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients", *Stem cell research*, 2015, 14 (2), 177-184. ISSN 1876-7753

KOUIDES P. y BENNETT, J. "Understanding the Myelodysplastic Syndromes", *The oncologist*, 1997, 2 (6), 389-401. ISSN 1549-490X

LASHO, T., *et al.* "SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival", *Blood*, 2012, 120 (20), 4168-4171. ISSN 1528-0020.

LI, B., *et al.* "Clinical features and biological implications of U2AF1 mutations in myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2017, 130 (Suppl 1).

LIN, J., *et al.* "Detection of SRSF2-P95 mutation by high-resolution melting curve analysis and its effect on prognosis in myelodysplastic syndrome", *PLoS ONE*, 2014, 9 (12). ISSN 19326203

MALCOVATI, L., *et al.* "Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes", *Journal of Clinical Oncology*, 2007, 25 (23), 3503-3510. ISSN 0732183X

MALCOVATI, L., *et al.* "Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms", *Blood*, 2011, 118 (24), 6239-6246. ISSN 00064971

MALCOVATI, L., *et al.* "SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts", *Blood*, 2015, 126 (2), 233-241. ISSN 15280020

MATERA, A. y WANG, Z. "A day in the life of the spliceosome", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15 (2), 108-112. ISSN 14710072

MCQUILTEN, Z., *et al.* "Underestimation of myelodysplastic syndrome incidence by cancer registries: Results from a population-based data linkage study", *Cancer*, 2014, 120 (11), 1686-1694. ISSN 10970142

MEGGENDORFER, M., *et al.* "SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML)", *Blood*, 2012, 120 (15), 3080-3088. ISSN 00064971

MIAN, S. *et al.* "Spliceosome mutations exhibit specific associations with epigenetic modifiers and proto-oncogenes mutated in myelodysplastic syndrome", *Haematologica*, 2013, 98 (7), 1058-1066. ISSN 03906078

MIYAZAKI, Y., *et al.* "Differing clinical features between Japanese and Caucasian patients with myelodysplastic syndromes: Analysis from the International Working Group for Prognosis of MDS", *Leukemia Research*, 2018, 73, 51-57. ISSN 18735835

MIZUTA, S., *et al.* "Evaluation of SF3B1 Mutation Screening by High-Resolution Melting Analysis and its Clinical Utility for Myelodysplastic Syndrome with Ring Sideroblasts at the Point of Diagnosis", *Laboratory Medicine*, 2019, 50 (3), 254-262. ISSN 0007-5027

MONTALBAN-BRAVO, G. y GARCIA-MANERO, G. "Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management", *American Journal of Hematology*, 2018, 93 (1), 129-147. ISSN 10968652

MONTALBAN-BRAVO, G., *et al.* "Transcriptomic analysis implicates necroptosis in disease progression and prognosis in myelodysplastic syndromes", *Leukemia*, 2019. ISSN 14765551

NAZHA, A., *et al.* "Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes", *Leukemia*, 2016, 30 (11), 2214-2220. ISSN 14765551

NIMER, S. "Myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2009, 111 (10), 4841-4851.

ORITA, M., *et al.* "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms", *National Academy of Sciences*, 1989, 86, 2766-2770. ISSN 0027-8424

PALANGAT, M., *et al.* "The splicing factor U2AF1 contributes to cancer progression through a noncanonical role in translation regulation", *Genes and Development*, 2019, 33 (9-10), 482-497. ISSN 15495477

PAPAEMMANUIL, E., *et al.* "Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts", *New England Journal of Medicine*, 2011, 365 (15), 1384-1395. ISSN 15334406

PAPAEMMANUIL, E *et al.* "Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2013, 122 (22), 3616-3627. ISSN 00064971

PATNAIK, M., *et al.* "Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance", *American journal of hematology*, 2013, 88 (3), 201-206. ISSN 1096-8652

PELLAGATTI, A. y BOULTWOOD, J. "Splicing factor gene mutations in the myelodysplastic syndromes: impact on disease phenotype and therapeutic applications", *Advances in Biological Regulation*, 2017, 63, 59-70. ISSN 22124926

PLATZBECKER, U., *et al.* "Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study", *The Lancet Oncology*, 2017, 18 (10), 1338-1347. ISSN 14745488

PLATZBECKER, U. "Treatment of MDS", *Blood*, 2019, 133 (10), 1096-110. ISSN 15280020

PRZYCHODZEN, B., *et al.* "Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood*, 2013, 122 (6), 999-1006. ISSN 15280020

RADICH, J. "Splicing up the classification of myelodysplasia", *Blood*, 2015, 126 (2), 128-129. ISSN 0006-4971

REILLY, B., *et al.* "DNA methylation identifies genetically and prognostically distinct subtypes of myelodysplastic syndromes", *Blood Advances*, 2019, 3 (19), 2845-2858. ISSN 24739537

REIMER, K. y NEUGEBAUER, K. "Open peer review blood relatives: Splicing mechanisms underlying erythropoiesis in health and disease", 2018.

ROLLISON, D. *et al.* "Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs", *Blood*, 2008, 112 (1), 45-52. ISSN 00064971

ROMAN, E., *et al.* "Myeloid malignancies in the real-world: Occurrence, progression and survival in the UK's population-based Haematological Malignancy Research Network 2004-15", *Cancer Epidemiology*, 2016, 42, 186-198. ISSN 1877783X

ROSENFELD, C. y LIST, A. "A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: Implications for new therapies", *Nature Publishing Group*, 2000, 14 (1), 2-8. ISSN 08876924

RUJIRACHAIVEJ, P., *et al.* "The frequency of SF3B1 mutations in Thai patients with myelodysplastic syndrome", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2018, 19 (7), 1825-1831. ISSN 2476762X

SALLMAN, D., *et al.* "Unraveling the Pathogenesis of MDS: The NLRP3 Inflammasome and Pyroptosis Drive the MDS Phenotype", *Frontiers in oncology*, 2016, 6 (151). ISSN 2234-943X

SAYGIN, C., *et al.* "Mutations in DNMT3A, U2AF1, and EZH2 identify intermediate-risk acute myeloid leukemia patients with poor outcome after CR1", *Blood Cancer Journal*, 2018, 8 (1). ISSN 20445385

SCHELLENBERG, M., DUL, E. y MACMILLAN, A. "Structural model of the p14/SF3b155-branch duplex complex", *RNA*, 2011, 17 (1), 155-165. ISSN 13558382

SERALE C., *et al.* "Valor pronóstico de las mutaciones en los genes SRSF2 y NRAS en los Síndromes Mielodisplásicos", Mar del Plata: XXIII Congreso Argentino de Hematología, 2017

SHAHRABI, S. *et al.* "Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: new insights", *Oncology Reviews*, 2016, 10 (2). ISSN 1970-5557

SHIOZAWA, Y., *et al.* "Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia", *Nature Communications*, 2018, 9 (1). ISSN 20411723

SHIRAI, C., *et al.* "Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-mRNA Splicing In Vivo", *Cancer cell*, 2015, 27 (5), 631-643. ISSN 1878-3686

SONG, J., *et al.* "Does SF3B1/TET2 double mutation portend better or worse prognosis than isolated SF3B1 or TET2 mutation?" *Cancer Genomics and Proteomics*, 2019, 16 (1),91-98. ISSN 17906245

SPERLING, A., GIBSON, C. y EBERT, B. "The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal haematopoiesis to secondary leukaemia", *Nature Publishing Group*, 2017, 17 (1), 5-19. ISSN 14741768

STEENSMA, D. "The spectrum of molecular aberrations in myelodysplastic syndromes: In the shadow of acute myeloid leukemia", *Haematologica*, 2007, 92 (6), 723-727. ISSN 03906078

STEENSMA, D., *et al.* "Disparity in perceptions of disease characteristics, treatment effectiveness, and factors influencing treatment adherence between physicians and patients with myelodysplastic syndromes", *Cancer*, 2014, 120 (11), 1670-1676. ISSN 10970142

STEENSMA, D., *et al.* "Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2015, 126 (1) , 9-16. ISSN 15280020

STEENSMA, D. "How I use molecular genetic tests to evaluate patients who have or may have myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2018, 132 (16), 1657-1663. ISSN 15280020

STONE, R. "How I treat patients with myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2009, 113 (25), 6296-6303. ISSN 00064971

SUCH, E., *et al.* "Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia", *Blood*, 2013, 121 (15), 3005-3015. ISSN 15280020

SUCH, E. y SOLÉ, F. "Guía de aplicación clínica de la secuenciación masiva en síndromes mielodisplásicos y leucemia mielomonocítica crónica", Madrid: Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, 2017. ISBN 978-84-697-6291-2

TEFFERI, A. y VARDIMAN, J. "Myelodysplastic syndromes", *The New England journal of medicine*, 2009, 361 (19), 1872-1885. ISSN 1533-4406

TEFFERI, A., *et al.* "U2AF1 mutation variants in myelodysplastic syndromes and their clinical correlate", *Mayo Clinic proceedings*, 2018, 93 (10), 1363-1374. ISSN 1942-5546

THOL, F., *et al.* "Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes", *Blood*, 2012, 119 (15), 3578-3584. ISSN 00064971

VALENT, P., *et al.* "Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference", *Leukemia Research*, 2007, 31 (6), 727-736. ISSN 01452126

VARDIMAN, J., *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), 937-951. ISSN 00064971

VISCONTE, V., *et al.* "Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders", *Leukemia*, 2012, 26 (12), 2447-2454. ISSN 08876924

VISCONTE, V., *et al.* "Distinct iron architecture in SF3B1-mutant myelodysplastic syndrome patients is linked to an SLC25A37 splice variant with a retained intron", *Leukemia*, 2015, 29 (1), 188-195. ISSN 14765551

VISCONTE, V., NAKASHIMA, M. y ROGERS, H. "Mutations in splicing factor genes in myeloid malignancies: Significance and impact on clinical features", *Cancers*, 2019, 11 (12). ISSN 20726694

WANG, X., SONG, X. y YAN, X. "Effect of RNA splicing machinery gene mutations on prognosis of patients with MDS: A meta-analysis", *Medicine*, 2019, 98 (21), E15743. ISSN 15365964

WILL, C. y LÜHRMANN, R. "Spliceosome structure and function", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, 3 (7), 1-2. ISSN 19430264

WLODARSKI, M., *et al.* "Recurring mutations in RPL15 are linked to hydrops fetalis and treatment independence in Diamond-Blackfan anemia", *Haematologica*, 2018, 103 (6), 949-958. ISSN 1592-8721

WU, S., *et al.* "The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution", *Blood*, 2012, 120 (15). ISSN 1528-0020

WU, S., *et al.* "Clinical implications of U2AF1 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression", *American Journal of Hematology*, 2013, 88 (11), 277-282. ISSN 03618609

XU, J., *et al.* "Modeling human RNA spliceosome mutations in the mouse: not all mice were created equal", *Experimental Hematology*, 2019, 70, 10-23.

YIMPAK, P., *et al.* "Alteration of SF3B1 and SRSF2 Genes in Myelodysplastic Syndromes Patients in Upper Northern Thailand", *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 2019, 20 (4), 1215-1221. ISSN 2476-762X

YOSHIDA, K., *et al.* "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia", *Nature*, 2011, 478 (7367), 64-69. ISSN 00280836

YU, X., *et al.* "Characterization of somatic mutations in air pollution-related lung cancer", *EBioMedicine*, 2015, 2 (6), 583-590. ISSN 23523964

ZEIDAN, A. "Risk stratification in therapy-related myelodysplastic syndromes", *Oncotarget*, 2017, 8 (46), 80103-80104. ISSN 19492553

ZHANG, X., *et al.* "Structure of the human activated spliceosome in three conformational states", *Cell Research*, 2018, 28 (3), 307-322. ISSN 17487838

SITIOS WEB

GUÍAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO edición 2019 [en línea]. [consulta: 10 de Agosto 2019] <http://www.sah.org.ar/guias_hematolo_2019.asp>

MISEQ ILLUMINA INC. [en línea] [consulta: 24 Agosto 2019]. <<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/applications.html>>

Anexo

ANEXO 1

| Gen | Exón | Ubicación | | Bases de Datos | | | | | | | | | | | | Predictores informáticos | | | | | |
|--|------|-----------------------|---------------------------|----------------|-------------|---------|---------------------------|-----|-------------|-----|------|---------|------------|------|--------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|---|
| | | Variante de secuencia | Variante a nivel proteico | Abreviatura | ENSEMBL | ClinVar | COSMIC | | ICGC | | TCGA | Intogen | cBioportal | PCGP | GnomAD PG-FA | Polyphen-1 | PROVEAN | SIFT | HSF | ESEfinder | |
| SF3B1 NM_012433.3 NP_036565.2 | 14 | c.1986C>A | p.His662Gln | H662Q | rs778467242 | --- | COSM130416 | 20 | MU54880 | 2 | --- | --- | --- | --- | --- | 1.193E-05 | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- |
| | | c.1904T>A | p.Val635Glu | V635E | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- |
| | | c.1998G>T | p.Lys666Asn | K666N | rs377023736 | 3 | COSM131537/ COSM132937 | 80 | MU54890 | 5 | 2 | --- | 1 | 1 | 3.979E-05 | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- | --- |
| | | c.1988C>T | p.Thr663Ile | T663I | rs123934168 | --- | COSM145921 | 10 | MU49864 | 2 | --- | --- | --- | --- | 0 | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- | --- |
| | 15 | c.1844C>A | p.Pro615His | P615H | --- | --- | COSM7257984 | 1 | MU113930375 | 2 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- |
| | | c.1873C>T | p.Arg625Cys | R625C | rs775623976 | 4 | COSM110696/ COSM133600 | 85 | MU54909 | 10 | 9 | 3 | 16 | --- | 3.982E-06 | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- | --- |
| | | c.1860G>A | p.Met620Ile | M620I | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | benigno | neutro | tolerado | --- | --- | --- |
| | | c.2138C>G | p.Ala713Gly | A713G | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- | nuevo sitio dador/ nuevo ESS / ESE alterado |
| | | c.2104C>A | p.Arg702Arg | R702R | rs16865307 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 0.005596 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| | | c.2098A>G | p.Lys700Glu | K700E | rs559063155 | 1 | COSM84677/ COSM133591 | 830 | MU9178 | 116 | 16 | 31 | 20 | 2 | 8.314E-05 | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- | --- |
| | 2 | c.101C>T | p.Ser34Phe | S34F | rs371769427 | 9 | COSM166866 | 324 | MU820754 | 44 | --- | 13 | 47 | 2 | 3.553E-06 | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- | --- |
| | | c.99C>T | p.Cys33Cys | C33C | rs139959814 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 0.0007217 | --- | --- | --- | no afecta | --- | ESE alterado |
| | 6 | c.438C>T | p.Pro146Pro | P146P | rs61737061 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 4.99E-03 | --- | --- | --- | nuevo ESS | --- | ESE alterado |
| | | c.448T>A | p.Phe150Ile | F150I | --- | --- | COSM6951655 | 1 | --- | --- | --- | --- | 1 | --- | --- | perjudicial | deletéreo | perjudicial | --- | --- | --- |

N: número de reportes; ID: identificador; PG-FA: Población general- Frecuencia Alélica; ICGC: International Cancer Genome Consortium; TCGA: The Cancer Genome Atlas (Genomic Data Commons Data Portal); PCGP: Pediatric Cancer Genome Project; SIFT: HSF: Human Splicing Finder ESE: Exonic Splicing Enhancer