



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Caracterización de la expresión de
proteínas relacionadas con
mutaciones somáticas de significado
pronóstico en Síndrome
Mielodisplásico en biopsia de
médula ósea de pacientes con
citopenia en el Hospital Universitario
Nacional de Colombia entre 2017 y
2022**

Juan Camilo Cataño Pulgarin

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Patología
Bogotá DC, Colombia
2024

Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con mutaciones somáticas de significado pronóstico en Síndrome Mielodisplásico en biopsia de médula ósea de pacientes con citopenia en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022

Juan Camilo Cataño Pulgarin

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Patología Anatómica y Clínica

Director (a):

Doctor Oscar Andrés Franco Tavera

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Patología
Bogotá DC, Colombia
2024

Resumen

Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con mutaciones somáticas de significado pronóstico en Síndrome Mielodisplásico en biopsia de médula ósea de pacientes con citopenia en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022

Introducción. Los Síndromes Mielodisplásicos son desórdenes clonales de las células hematopoyéticas definidos por citopenia, displasia mieloide y anormalidades genéticas características. La inclusión de las mutaciones somáticas es útil en el abordaje pronóstico y la inmunohistoquímica se ha explorado como marcador indirecto de estas. **Objetivo.** Caracterizar en términos de frecuencia relativa, patrón e intensidad de tinción las proteínas P53, EZH2 y H3K27me3 en biopsia de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico. **Métodos.** Estudio observacional, analítico de corte transversal en pacientes con síndrome mielodisplásico atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022. Se estudió la expresión de los marcadores P53, EZH2 y H3K27me3. Se empleó X2 o coeficiente de relación de Pearson para establecer asociaciones entre la expresión y variables de interés. **Resultados y Conclusiones.** Se practicaron los marcadores en 23 biopsias de médula ósea. Dos casos (5%) fueron positivos para TP53; los casos restantes fueron negativos. Todos los casos mostraron algún grado de tinción con EZH2 y H3K27me3 (exceptuando un caso negativo para EZH2). La expresión de EZH2 y H3K27me3 mostró una correlación positiva en el análisis de regresión lineal. La expresión de EZH2 y H3K27me3 no mostró asociación estadística con el conteo de plaquetas, neutrófilos, los valores de hemoglobina o el IPSS-R. La expresión de EZH2 no mostró asociación con cariotipo anormal, requerimiento transfusional o necesidad de tratamiento farmacológico. El establecimiento del estado de los genes EZH2 y TP53 permitirá determinar la implicación de la expresión de estas proteínas en el pronóstico de esta entidad.

Palabras clave: síndrome mielodisplásico, inmunohistoquímica, pronóstico, mutación, médula ósea.

Abstract

Characterization of the expression of proteins related to somatic mutations of prognostic significance in Myelodysplastic Syndrome in bone marrow biopsy of patients with cytopenia at the Hospital Universitario Nacional de Colombia between 2017 and 2022

Introduction. Myelodysplastic Syndromes are clonal disorders of the hematopoietic cells, defined by the presence of cytopenia, dysplasia, and characteristic genetic abnormalities. Inclusion of somatic mutations is useful in the prognostic assessment and immunohistochemistry is an indirect way to detect the presence of these mutations. **Objective.** To characterize the relative frequency, stain pattern and stain intensity of P53, EZH2 and H3K27me3 by immunohistochemistry in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic syndrome. **Methods.** An observational, analytic cross-sectional study was conducted in patients with myelodysplastic syndrome at the Hospital Universitario Nacional de Colombia between 2017 and 2022. Immunohistochemistry for P53, EZH2 and H3K27me3 was studied. Pearson correlation coefficient or Chi-square tests were used to establish the association between the expression of these proteins and clinical variables of interest. **Results and Conclusions:** Twenty-three bone marrow biopsies were studied. Two cases (5%) were positive for p53. The rest of the cases were negative. All cases were positive for EZH2 and H3K27me3 (except for one case negative for EZH2). The expression of EZH2 and H3K27me3 were positively correlated in the linear regression analysis. The expression of EZH2 and H3K27me3 did not show association with platelet and neutrophil values, hemoglobin values or IPSS-R. The expression of EZH2 did not show association with abnormal karyotype, transfusions or requirement of pharmacological treatment. The assessment of the status of EZH2 and TP53 genes will allow us to establish the implication of the expression of these proteins in the prognostic assessment of myelodysplastic syndrome.

Keywords: myelodysplastic syndrome, immunohistochemistry, prognosis, mutations, bone marrow.

Contenido

Resumen Ejecutivo	4
1. JUSTIFICACIÓN.....	7
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO.....	8
3.1. Síndrome Mielodisplásico: definiciones	8
3.2. Epidemiología.....	10
3.3. Fisiopatología	11
3.4. Manifestaciones Clínicas.....	16
3.6. Subtipos del Síndrome Mielodisplásico	24
3.7. Pronóstico.....	27
3.8. Uso de Inmunohistoquímica en el abordaje de mutaciones con impacto clínico en Síndrome Mielodisplásico	30
4. OBJETIVOS.....	33
5. METODOLOGÍA	33
6. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	39
7. CRONOGRAMA.....	40
8. PRESUPUESTO.....	40
9. RESULTADOS.....	41
10. DISCUSIÓN.....	66
11. LIMITACIONES.....	70
12. CONCLUSIONES.....	70
13. PRODUCTOS ESPERADOS	71
14. BIBLIOGRAFÍA.....	72
15. ANEXOS	80

Resumen Ejecutivo

Problema

El Síndrome Mielodisplásico (SMD) comprende una serie de desórdenes clonales de las células hematopoyéticas definidos por la presencia de citopenia, displasia de alguna de las líneas mieloides y una serie de anormalidades genéticas características pero diversas.

El comportamiento y pronóstico de esta entidad es muy variable y depende entre otros del subtipo, la edad, el género y otras variables clínicas. Actualmente está ampliamente extendido el uso del *International Prognostic Scoring System Revised (IPSS-R)* para la estratificación pronóstica de los pacientes y el establecimiento de su plan terapéutico; esta herramienta evalúa el porcentaje de blastos en médula ósea, los hallazgos por citogenética y la severidad de la citopenia.

A pesar del significado pronóstico de las aberraciones citogenéticas en el SMD, estas solo son encontradas en el 50% de los pacientes; además de esto, algunos pacientes clasificados en grupos de bajo riesgo presentan un curso clínico tórpido. Por su parte, el uso de tecnologías de secuenciación en estos pacientes ha permitido identificar mutaciones somáticas recurrentes en ciertos genes hasta en el 90% de los casos, varias de estas con impacto pronóstico y con la capacidad de predecir la respuesta terapéutica a ciertas intervenciones.

En consideración de lo anterior, se ha propuesto la inclusión de varias mutaciones somáticas en puntajes pronósticos, tales como el IPSS-R con el fin de mejorar la capacidad de predecir los desenlaces en estos pacientes. A pesar de la indiscutible utilidad de las tecnologías de secuenciación para la detección de dichas mutaciones, su costo limita su uso rutinario en ciertos escenarios, mientras que la inmunohistoquímica es un método relativamente rápido, reproducible y ampliamente disponible para uso en el laboratorio, lo que hace valiosa su exploración como marcador indirecto de la presencia de mutaciones en el SMD, como se hace por ejemplo con el uso de marcadores para IDH-1 y p53 como subrogados de mutaciones en estos genes en glioblastoma y cáncer de ovario respectivamente.

Por otro lado, un porcentaje considerable de pacientes se presentan con citopenia persistente inexplicada que no cumple con los criterios de SMD, pero en los que sería deseable realizar pruebas de clonalidad con el fin de descartar estadios pre-malignos como citopenia clonal de significado indeterminado y hematopoyesis clonal de potencial indeterminado, condiciones que requerirían un seguimiento más estricto, pero donde nuevamente los costos serían una limitante.

Objetivo General: Caracterizar en términos de frecuencia relativa, patrón e intensidad de tinción las proteínas P53, EZH2, H3K27me3 y ABCB7 en biopsia de médula ósea de pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022.

Impacto Esperado: contribuir en el futuro a la construcción de evidencia que justifique la posibilidad de uso de inmunohistoquímica en biopsia de médula ósea de pacientes con SMD, citopenia inexplicada persistente o de otras causas como alternativa para la detección indirecta de mutaciones somáticas en contextos en los que el acceso a tecnologías de secuenciación sea limitado.

Palabras claves: síndrome mielodisplásico, inmunohistoquímica, pronóstico, mutación, médula ósea

Métodos

Diseño de estudio: estudio observacional, analítico de tipo corte transversal de pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) a quienes se les tomó una biopsia de médula ósea y fueron atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022.

Población:

- **Población De Referencia:** Pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas).
- **Población Objetivo:** Pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) a quienes se les tomó una biopsia de médula ósea y fueron atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia.
- **Población Elegible**
 - **Criterios De Inclusión:**
 - Pacientes ≥ 18 años
 - Pacientes con diagnóstico de citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) de acuerdo con lo registrado en su Historia Clínica
 - Disponibilidad de material suficiente de biopsia de médula ósea dentro del repositorio del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario Nacional de Colombia.
 - **Criterios De Exclusión:**
 - Material insuficiente para estudio, definido por el agotamiento del tejido o potencial agotamiento de este con su procesamiento para la realización del estudio.
 - Pacientes con diagnóstico de Neoplasia Hematolinfoide diferente al Síndrome Mielodisplásico de acuerdo con la clasificación de la OMS de tumores hematolinfoides:
 - Leucemias Mieloides Agudas
 - Leucemia de Linaje Ambiguo
 - Neoplasias Mieloproliferativas
 - Neoplasias Mieloproliferativas/Mielodisplásicas
 - Neoplasias de Precursores Linfoides
 - Neoplasias maduras de células B
 - Neoplasias maduras de células T y NK

- Linfomas Hodgkin
- Neoplasias de células dendríticas e histiocíticas

Estudios de inmunohistoquímica: se estudiará la expresión de P53, EZH2, H3K27me3 y ABCB7.

Resultados: Se practicaron estudios de inmunohistoquímica para P53, EZH2 y H3K27me3 en 23 biopsias de médula ósea (18 con diagnóstico de Síndrome Mielodisplásico, 1 paciente con Neoplasia Mielodisplásica/Mieloproliferativa, 1 paciente con Leucemia Mieloide Aguda con cambios relacionados con mielodisplasia, 1 caso de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y 2 casos con citopenia y sospecha de Síndrome Mielodisplásico). 2 de los casos (5%) fueron positivos para p53 ($\geq 1\%$ con intensidad 3+), con expresión nuclear en las líneas mieloide y megacariocítica; los casos restantes fueron negativos por ausencia completa de tinción o tinción tenue en un porcentaje bajo de la celularidad. Todos los casos mostraron algún grado de tinción con EZH2 y H3K27me3 (exceptuando el caso de Neoplasia Mielodisplásica/Mieloproliferativa, el cual fue negativo para EZH2). La expresión de EZH2 y H3K27me3 mostró una correlación positiva en el análisis de regresión lineal ($R^2 = 0.31$, $p = 0.005$). La expresión de EZH2 y H3K27me3 no mostró correlación con el conteo de plaquetas, el conteo de neutrófilos, los valores de hemoglobina o el IPSS-R. La expresión de EZH2 no mostró asociación con la presencia de cariotipo normal, el requerimiento de transfusiones o la necesidad de tratamiento farmacológico.

Conclusiones: La interpretación de la expresión de P53 en biopsia de médula ósea en el contexto de SMD es sencilla. La expresión de EZH2 y de H3K27me3 se correlacionan positivamente, sin encontrarse asociación significativa con variables clínicas o de laboratorio. El establecimiento del estado de los genes *EZH2* y *TP53* (mutado vs no mutado, VAF de la mutación y tipo de mutación) permitirá determinar las implicaciones de la expresión de estas proteínas por inmunohistoquímica para el abordaje en el diagnóstico y pronóstico de esta entidad.

1. JUSTIFICACIÓN

El proceso de transición epidemiológica en curso en Colombia tiene impacto en la distribución de las patologías dentro de su población (11), siendo el SMD una de las neoplasias mieloides más frecuentes y una entidad predominantemente presente en individuos de la tercera edad (1,12), la caracterización de esta entidad adquiere particular importancia.

La documentación de la incidencia de ciertas mutaciones somáticas en el pronóstico del SMD y la propuesta para incorporar las mismas en herramientas de clasificación pronóstica suponen tendencias interesantes y con impacto no menor en el manejo de estos pacientes (5,6,8) sin embargo, la disponibilidad limitada de tecnologías de secuenciación podría representar una limitante para la incorporación de estos hallazgos en la práctica diaria (9,10).

El uso de inmunohistoquímica para la documentación indirecta de ciertas mutaciones en neoplasias sólidas es rutinario y su utilidad ya ha sido ampliamente estudiada y soportada para *TP53* en SMD con del(5q) aislada, siendo una alternativa menos costosa y más disponible (13–15). La interpretación de otros marcadores (punto de corte, patrón y localización de expresión) no ha sido bien caracterizada.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El Síndrome Mielodisplásico (SMD) es un desorden clonal de las células hematopoyéticas que se manifiesta con citopenia y un mayor riesgo de desarrollar leucemia mieloide aguda (LMA). Más que una sola patología, esta denominación abarca múltiples entidades que, a pesar de compartir las características descritas, tienen un comportamiento clínico y un pronóstico heterogéneo (1–4).

La valoración del pronóstico en cada caso tiene implicaciones importantes en las intervenciones terapéuticas a realizar; para su objetivación se disponen de herramientas de estratificación de riesgo, de las cuales la de uso más amplio es el *International Prognostic Scoring System Revised (IPSS-R)*. Este sistema toma en cuenta la citogenética, el porcentaje de blastos en médula ósea y la severidad de las citopenias como variables para establecer el riesgo de mortalidad y progresión a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (1).

A pesar del desempeño de esta herramienta en la estratificación de los pacientes con Síndrome Mielodisplásico, se ha observado que algunos individuos presentan una evolución tórpida inesperada para su categoría de riesgo. Este comportamiento en parte se ha explicado por la frecuente asociación de aberraciones citogenéticas de buen pronóstico e incluso cariotipos normales con mutaciones somáticas (5); mientras que las alteraciones en el cariotipo se documentan en cerca del 50% de los casos de SMD, las mutaciones somáticas pueden encontrarse hasta en el 90%, muchas de estas con implicaciones en el fenotipo de la enfermedad (por ejemplo, profundidad de la citopenia), la respuesta a intervenciones terapéuticas y el pronóstico (mortalidad y transformación a LMA) (1,2,5,6)

Por otro lado, existe un conjunto de pacientes con citopenia persistente en los que a pesar de un estudio extensivo no puede hallarse causa; estos pacientes no muestran criterios suficientes para ser clasificados dentro de los SMD. En muchos de estos casos es posible documentar alteraciones genéticas clonales de las células hematopoyéticas (tanto cariotípicas como mutaciones somáticas), cuya detección tiene implicaciones en el seguimiento y manejo de estos pacientes, en consideración del mayor riesgo que tienen de desarrollar SMD u otras malignidades hematológicas (7).

La incorporación de la presencia de ciertas mutaciones somáticas en los puntajes pronósticos parece mejorar el desempeño de los mismos en la clasificación de los pacientes (8); sin embargo, las tecnologías de secuenciación no son ampliamente disponibles, con costos y requerimientos de talento humano que limitan su uso rutinario; en este punto, la inmunohistoquímica (como marcador indirecto de la presencia de mutaciones mediante la detección de la expresión de proteínas aberrantes o la pérdida de la expresión de los productos mutados u otros regulados por estos) es una alternativa interesante, siendo menos costosa, rápida y de uso frecuente en el laboratorio(9,10).

Pregunta: ¿Cuál es **frecuencia relativa, el patrón y la intensidad de tinción** de las proteínas P53, EZH2, H3K27me3 y ABCB7 en biopsia de médula ósea de pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022?

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Síndrome Mielodisplásico: definiciones

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un conjunto de desórdenes clonales de las células madre hematopoyéticas que se manifiestan con citopenia, displasia de las líneas mieloides, anomalías genéticas y un mayor riesgo de desarrollar leucemia mieloide aguda (LMA) (1–4).

El diagnóstico de SMD se basa en 3 ejes (2): citopenia persistente y sin otra explicación, displasia morfológica significativa y evidencia citogenética o molecular de hematopoyesis clonal.

La citopenia es definida de acuerdo al *International Prognostic Scoring System* (IPSS) de 1997 como un valor de hemoglobina $<10\text{g/dL}$, un conteo de plaquetas $<100 \times 10^9/\text{L}$ y un conteo de neutrófilos $<1.8 \times 10^9/\text{L}$ (16); sin embargo en presencia de hallazgos morfológicos o citogenéticos típicos puede hacerse el diagnóstico con valores mayores de hemoglobina (12 g/L en mujeres o 13g/L en hombres) o plaquetas ($<150 \times 10^9/\text{L}$) (1).

La displasia debe comprometer al menos el 10% de alguna de las líneas mieloides; los casos con conteo de blastos $\geq 20\%$, así como aquellos con rearrreglos cromosómicos característicos, tales como $t(15;17)$ *PML-RARA*, $inv(16)/t(16; 16)$ *CBFB-MYH11* o $t(8; 21)$ *RUNX1-RUNX1T1*, deben ser clasificados como LMA (2,4).

Las anomalías citogenéticas están presentes en el 40-50% de los casos primarios y en $>90\%$ de los casos asociados a terapia. Aunque su presencia no es indispensable, hay cambios citogenéticos típicos que permiten diagnosticar SMD en pacientes con citopenia inexplicada sin cambios displásicos (por ejemplo, pérdida de cromosoma 7, $del(7q)$, $del(5q)$, $i(17q)$, pérdida del cromosoma 13, $del(13q)$ y pérdida del cromosoma 11). Sin embargo, algunas de las anomalías citogenéticas más comunes, como la $del(20q)$, la ganancia del cromosoma 8 y la pérdida del cromosoma Y pueden observarse en pacientes sanos o con otras causas de citopenia y por sí solos no permiten hacer diagnóstico de SMD (1,2).

Por su parte, las mutaciones somáticas están presentes en el 80-90% de los casos; muchas de estas se observan en individuos sanos de edad avanzada, por lo que su presencia en ausencia de otros criterios tampoco debe usarse para hacer el diagnóstico (1,2). En una cohorte de 53 individuos con pancitopenia no asociada a SMD y 38 casos de SMD o LMA se evaluó la frecuencia de mutaciones en 20 genes asociados con SMD, sin que se encontraran diferencias significativas entre ambos grupos; adicionalmente durante el seguimiento ninguno de los casos del primer grupo desarrolló SMD o LMA (17).

3.1.1. Pre-fases Potenciales del Síndrome Mielodisplásico

Las células hematopoyéticas pueden exhibir aisladamente alteraciones citogenéticas, mutaciones somáticas, citopenia o displasia. Se ha propuesto que estas condiciones sean previas o precursoras al SMD y se han clasificado en 4 grupos: *citopenia idiopática de significado indeterminado (ICUS por sus siglas en inglés)*, *displasia idiopática de significado desconocido (IDUS por sus siglas en inglés)*, *citopenia clonal de significado desconocido (CCUS por sus siglas en inglés)* y *hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP por sus siglas en inglés)*(4).

3.1.1.1. **Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado (ICUS)**

Es la citopenia persistente (mayor de 4-6 meses) en cualquier línea mieloide, en ausencia de otros criterios diagnósticos de SMD y no explicada por otra condición. No hay un consenso para la definición de citopenia y diferentes grupos han propuesto puntos de corte diferentes; el International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome (IWGM-MDS) propone los mismos criterios que la Organización Mundial de la Salud (OMS) emplea para SMD, mientras que un grupo conformado por expertos del US National Comprehensive Cancer Network (NCCN), el International Working Group (IWG) y el European Leukemia Net (ELN) en 2007 fijaron valores diferentes para la hemoglobina y el conteo de neutrófilos (11g/dl y $1.5 \times 10^9/L$ respectivamente) (18,19). Incluso algunos autores proponen emplear los puntos de corte de normalidad del cuadro hemático de la OMS (hemoglobina <13 g/dL [hombres], <12 g/dL [mujeres]; conteo absoluto de neutrófilos < $1.8 \times 10^9/L$; plaquetas < $150 \times 10^9/L$) (7).

El curso clínico es variable, con resolución espontánea o aparición de SMD u otra neoplasia hematolinfoide, desenlace que se observa en 10% al 12% de los casos (7,18–20).

3.1.1.2. **Citopenia Clonal de Significado Desconocido (CCUS)**

El término describe la presencia de citopenia inexplicada con evidencia de una mutación clonal que no cumple los criterios de neoplasia hematolinfoide y que está presente en al menos 4% de las células analizadas (carga clonal) o el 2% del DNA analizado (frecuencia de la variante alélica). Estas anomalías clonales pueden ser aberraciones citogenéticas detectadas por FISH o mutaciones somáticas por secuenciación de última generación. (7,19).

Algunos autores consideran que una carga clonal del 4% o frecuencia de variante alélica del 2% no es suficiente para explicar una citopenia dependiente de un proceso clonal, por lo que proponen un punto de corte de 20%, basándose en observaciones previas que indican que el 95% de los pacientes con valores mayores a este progresan a neoplasia mieloide en el transcurso de 10 años (7).

3.1.1.3. **Displasia idiopática de significado desconocido (IDUS)**

Ocurre en casos con displasia mieloide sin causa obvia y sin evidencia de citopenia o anomalías citogenéticas y moleculares. En la mayoría de los casos la displasia es reactiva a algún proceso posteriormente identificado en el seguimiento (4,7).

3.1.1.4. **Hematopoyesis Clonal de Potencial Indeterminado (CHIP)**

Define la detección de alteraciones somáticas (el término se usa por lo general para variantes de un solo nucleótido) en genes ligados a neoplasias hematológicas en una clona con una frecuencia alélica mayor o igual al 2% en un individuo sano sin citopenia persistente, aunque para algunos autores pueden presentarla. Estos individuos presentan un riesgo 10 veces mayor de desarrollar neoplasias hematológicas (18-19); de hecho, estas variantes en un 90% de los casos comprometen genes conductores de cáncer y frecuentemente mutados en SMD como *DNMT3A* (metilación de DNA), *TET2* (hidroximetilación de DNA) y *ASXL1* (metilación y

ubiquitinación de histonas). Sin embargo, a pesar del mayor riesgo de transformación, este es relativamente bajo (0.5-1%/año) (7).

El tamaño mínimo para considerar una clona como biológicamente relevante aún está en discusión y el umbral de 2% fue establecido porque es el límite de detección de variantes por secuenciación de exoma, sin embargo, los métodos de secuenciación dirigida permiten detectar mutaciones de menos del 0.5%; estas clonas minúsculas se detectan y persisten en el 95% de los individuos mayores de 60 años (7).

3.2. Epidemiología

Los SMD ocurren principalmente en adultos mayores, con una edad media al diagnóstico de entre 70 y 76 años (21,22); 86.4% de los pacientes se diagnostican después de los 60 años y más de la mitad de los restantes después de los 75 años. En Estados Unidos la incidencia anual general es de 3-5 casos por cada 100000 personas-año, con una prevalencia estimada en 155 casos en 100000 (22,23), sin embargo, hay evidencia que sugiere un importante subregistro (22,24).

Con respecto al sexo, hay predominancia en hombres con una incidencia de 4.5-7.7 casos por 100000 personas-año y en mujeres de 2.7-4.1 casos por 100000 personas-año. La relación de incidencia hombre/mujer se incrementa con la edad, siendo casi igual a 1 a los 40 años y entre 1.8-2.8 hacia la octava década de vida (22,23).

Igualmente se ha estudiado la distribución racial, encontrando mayor incidencia en personas blancas (4.8 por cada 100000 personas año) respecto a personas asiáticas y de las islas del Pacífico (3.2 por cada 100000 personas-año) (22).

3.2.1. Etiología

Para el SMD primario (*de novo*), aquel que ocurre en ausencia de antecedente de quimioterapia o exposición a radiación, se han descrito múltiples factores de riesgo. Una revisión sistemática de 33 estudios encontró una relación positiva entre el SMD y obesidad (índice de masa corporal o IMC>30), tabaquismo (mayor en activos con una exposición de un paquete/año o más), enfermedades autoinmunes, anemia, antecedente de infecciones adquiridas en comunidad en el año previo y antecedente de uso de fármacos antituberculosos (25).

El SMD asociado a la exposición a benceno se ha estudiado principalmente en trabajadores de la industria petrolera; un análisis internacional que incluyó personal de Australia, Canadá y Estados Unidos encontró un OR de 4.3 para el desarrollo de SMD en individuos con una exposición acumulada mayor 2.93 ppm-año respecto a aquellos con una menor o igual a 0.348 ppm-año (26).

Algunos desórdenes hematológicos tales como la anemia de Fanconi, la disqueratosis congénita, el síndrome Shwachman-Diamond y la anemia de Diamond-Black también se asocian con un mayor riesgo de padecer esta entidad; en la neutropenia congénita severa, por ejemplo, la incidencia acumulada de SMD y LMA es de 10.8% en 20 años y de 22% en 15 años en pacientes tratados con G-CSF; en el síndrome Shwachmann-Diamond, por su parte, la incidencia acumulativa a 20 años es de 18.8% y a 30 años de 36.1% (27).

El SMD asociado a terapia se incluye dentro de la denominación de neoplasias mieloides relacionados a terapia y corresponde del 2.3 al 20% de los casos de SMD (28); La incidencia en pacientes tratados con quimioterapia puede ser hasta de 6.3% a 20 años y de 24.3% a 5 años en aquellos con antecedente de trasplante autólogo de células hematopoyéticas (29).

3.3. Fisiopatología

La aparición de mutaciones somáticas es un evento inevitable ligado a la división celular y la acumulación de estas ocurre rápidamente en células con alta capacidad replicativa, como es el caso de las células hematopoyéticas. Por esta razón, el hallazgo de estas mutaciones es casi que ubicuo después de la quinta década de vida, siendo la mayor parte de estas, por su naturaleza aleatoria, funcionalmente silentes. Sin embargo, su aparición en relación con ciertos genes puede dar a su célula portadora ventajas en el crecimiento y la expansión (7).

Mediante secuenciación de última generación se reveló que los pacientes con SMD tienen en promedio 9 mutaciones en la región codificante; en el 65% de los casos están comprometidos genes de splicing de mRNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*), en el 47% genes de metilación de DNA (*DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*) y en el 28% genes de modificación de histonas (*ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*). A pesar de que muchos de los genes comprometidos se comparten con LMA, esta última se caracteriza por tener mayor frecuencia de mutaciones en el receptor tirosina quinasa, la vía RAS y los genes *CEBPA* e *IDH1/2*, mientras que muestran menor compromiso de reguladores epigenéticos y factores de splicing, frecuentes en SMD (30).

3.3.1. Compromiso del Splicing del RNA en Síndrome Mielodisplásico

Las mutaciones que comprometen los genes de splicing ocurren en regiones altamente preservadas y las que afectan los genes *SF3B1*, *SRSF2* y *U2AF1* son excluyentes entre sí (30).

Las mutaciones en *SF3B1* se relacionan estrechamente el SMD con sideroblastos en anillo y tiene un valor predictivo positivo del 98% para la presencia de estos precursores anormales (31). Los sideroblastos en anillo son células precursoras eritroides con acumulación de hierro en la mitocondria. El compromiso en *SF3B1* en SMD es heterocigoto y consiste en variaciones de un solo nucleótido (en el 50% de los casos, K700E). Este gen es un componente del espliceosoma, específicamente de la U2snRNP, la cual participa en el reconocimiento de sitios de empalme canónicos en 3'. La disfunción de este gen por lo tanto reduce la expresión de proteínas involucradas en la síntesis del grupo hemo en la mitocondria y su transporte al citosol (Ver figura 1) (30,31).

Las características de otros genes involucrados en el SMD y sus implicaciones clínicas se muestran en la Tabla 1 (30,32,33).

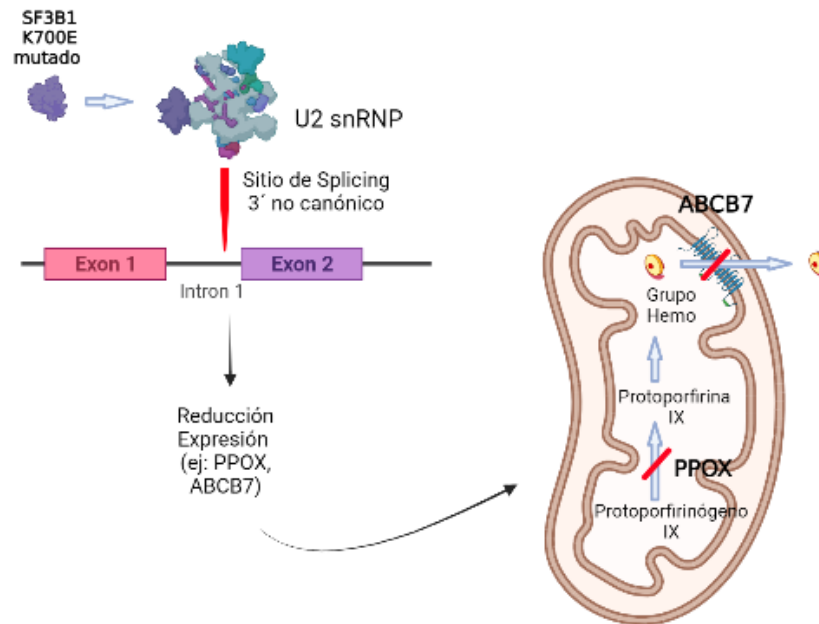


Figura 1. La mutación del gen *SF3B1* reduce la expresión de proteínas involucradas en la síntesis del grupo Hem; la protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) cataliza la formación de protoporfirina IX a partir de protoporfirinógeno IX, mientras que ABCB7 es un transportador localizado en la membrana interna de la mitocondria que participa en la exportación del grupo Hem al citosol. Elaboración propia, creado con BioRender.com

3.3.2. Reguladores Epigenéticos en Síndrome Mielodisplásico

EZH2 es un componente del Complejo Represivo Polycomb 2 (PRC2). Este complejo inicia el silenciamiento de la expresión genética al catalizar la trimetilación de la histona 3 en la lisina 27, permitiendo la unión del Complejo Represivo Polycomb 1 (PRC1), el cual cataliza la ubiquitinación de la histona 2A en la lisina 119, lo que mantiene el silenciamiento de genes reguladores de la hematopoyesis. Las mutaciones en *EZH2* son probablemente inactivantes, lo que resulta en un aumento de expresión de los oncogenes regulados por PRC2/PRC1 (Ver Figura 2) (30).

ASXL1 no tiene actividad enzimática intrínseca, pero apoya la metilación de la histona 3 en la lisina 4 por OGT y en lisina 27 por PRC2, así como la ubiquitinación de la histona H2A en la lisina 119 por PRC1. En modelos murinos se ha observado que la hipometilación de H3K27 particularmente afecta regiones de promotor de genes involucrados en la diferenciación eritroide como *Sox6*, *Id3*, *Tjp1* y *Hha*. Por otro lado, la unión del ASXL1 mutado a BAP1 promueve su actividad desubiquitinasa, desregulando la expresión de los genes *HOXA*, partícipes en la transformación leucémica, así como de *IRF8*, esencial en la monopoiesis (30,33).

Gen	Frecuencia	Función	Gen mutado	Significado Clínico	Observaciones
<i>SRSF2</i>	20-30%	Reconoce el Elemento Promotor Exónico de Splicing (ESE) en regiones ricas en citosina y guanina	Preferencia por ESEs ricos en citosina con splicing aberrante de <i>EZH2</i>	Mal pronóstico Mayor progresión a LMA	Se relaciona con mutaciones en <i>RUNX1</i> , <i>IDH2</i> y <i>ASXL1</i> . Excluyente con mutaciones de <i>EZH2</i> .
<i>U2AF1</i>	7-10%	Reconoce dinucleótidos adenina-guanina en posición 3' en la unión de intrones-exones	Altera la generación de isoformas de H2AFY, de la familia de histonas H2A		En modelos murinos se relaciona con leucopenia y aumento de blastos.
<i>ZRSR2</i>	2-6%	Componente del snRNA que hace contacto en 3' con intrones U12	Splicing ineficiente y retención de mRNA	SMD con exceso de blastos. Mayor progresión a LMA	

Tabla 1. Mecanismos fisiopatológicos e implicaciones clínicas de genes del splicing mutados descritos en SMD.

La familia de proteínas DNMT (*DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT1*) también se han vinculado con la fisiopatología del SMD; estas proteínas catalizan la metilación del DNA en posición 5' de los nucleótidos de citosina de las islas CpG ubicadas en regiones de promotor y en cuerpos de genes, donde funcionan como promotores alternativos. *DNMT3A* y *DNMT3B* se encargan de la metilación de novo y su papel en la carcinogénesis probablemente esté en relación con el silenciamiento de genes de reparación de DNA (Ver Figura 3) (30).

Otras mutaciones asociadas al SMD comprometen los genes *TET1*, *TET2* y *TET3*, que son oxigenasas dependientes de alfa-cetoglutarato y hierro férrico que modifican el DNA metilado, catalizando la formación de 5-hidroximetilcitosina a partir de 5-metilcitosina; la oxidación subsecuente de este nucleótido genera formas que son reconocidas y removidas mediante escisión de nucleótidos, restaurando la expresión génica (Ver Figura 3) (30).

Las mutaciones en *IDH1* (citoplasmática) e *IDH2* (mitocondrial), que en condiciones usuales cataliza la formación de alfa-cetoglutarato, también participan en la carcinogénesis mediante la síntesis de 2-hidroxiglutarato en condiciones de hipoxia, lo que inhibe la acción de *TET2* y otras desmetilasas (30).

En la tabla 2 se resumen las características clínicas de los SMD con mutaciones en genes de regulación epigenética (30,32,33).

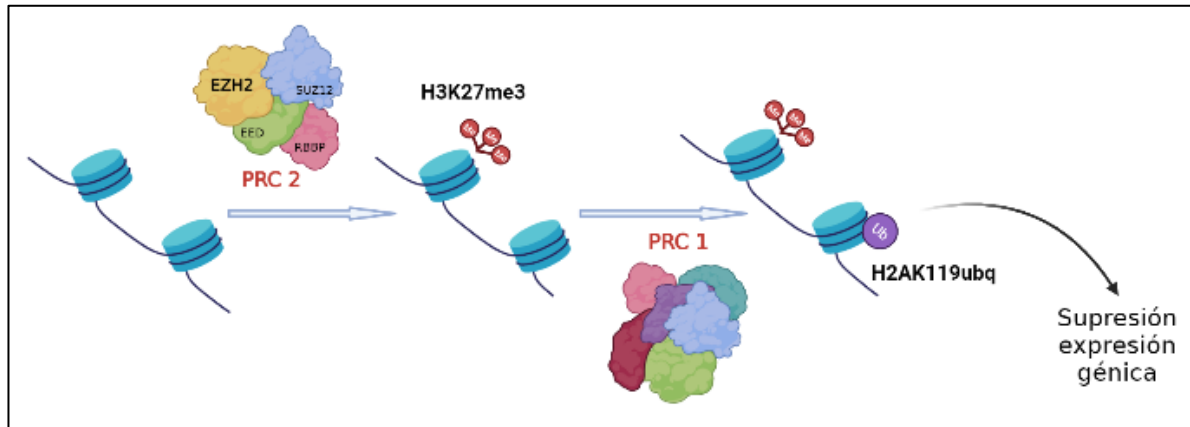


Figura 2. El complejo PRC2, formado por las proteínas EZH2, SUZ12, EED y RBDP, cataliza la trimetilación de la Histona 3 en la lisina 27, lo que favorece la unión del PRC1, encargado de la ubiquitinación de la Histona 2A en la lisina 119; estas modificaciones generan la supresión de la expresión génica de oncogenes. Elaboración propia, creado con BioRender.com

3.3.3. Aberraciones Citogenéticas

El papel de las alteraciones citogenéticas en la fisiopatología del SMD se ha estudiado con relación a la pérdida de genes supresores tumorales, entre otros mecanismos.

La del(5q), que es la aberración citogenética más frecuente (20% de todos los casos y 40% de los casos relacionados con quimioterapia) (34), compromete comúnmente el locus 5q32, generando haploinsuficiencia de miR-145 y miR-146a, lo que aumenta los niveles del factor transcripcional Fli1, así como de TIRAP y TRAF6 (dos proteínas transductoras de señal de toll-like receptors); la mayor expresión de Fli1 se relaciona con un aumento de la población megacariocítica, mientras que TIRAP y TRAF6 activan las vías de PI3K/AKT y de NFκB (33); por su parte la caseína quinasa CSNK1A1 haploinsuficiente, localizada en este mismo locus favorece la proliferación al disminuir la inhibición de la β-catenina (30,33). Otro gen afectado por la del(5q) es RPS14, cuya haploinsuficiencia afecta el ensamblaje de la unidad ribosomal 40S, generando acumulación y activación de p53, lo que se relaciona con diseritropoyesis y displasia megacariocítica (Ver figura 4) (33,35).

El SMD con del(5q) es un subtipo específico que se caracteriza por mostrar buena respuesta a lenalidomida, al tener como blanco la caseína quinasa CSNK1A1 (1,34). Mientras que la CSNK1A1 haploinsuficiente favorece la proliferación, como se mencionó previamente, su pérdida completa resulta en arresto del ciclo y activación de TP53; la lenalidomida promueve la ubiquitinación y eliminación de esta enzima al modular a cereblon, un componente de la E3 ubiquitin ligasa, lo que en últimas lleva a muerte celular y eliminación selectiva de las clonas con del(5q) (Ver figura 5). Por esta razón, las mutaciones inactivantes de TP53 en los pacientes portadores de esta aberración citogenética se relacionan con resistencia a lenalidomida y peor supervivencia con más riesgo de transformación leucémica (1,30,33).

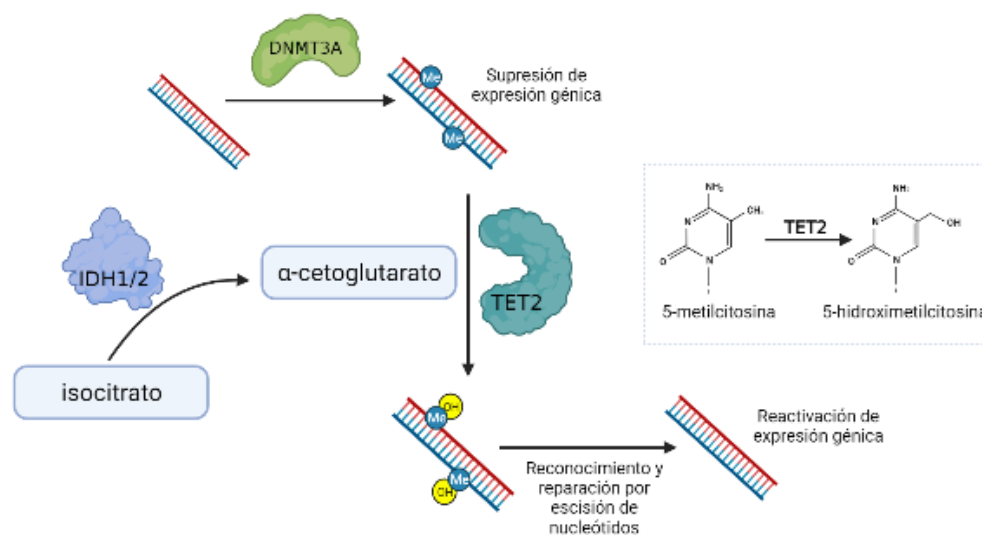


Figura 3. Las mutaciones en *DNMT3A*, *TET2* e *IDH1/2* participan en la carcinogénesis mediante la supresión de genes de reparación de DNA; en condiciones usuales *TET2* cataliza la oxidación de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina, posteriormente reconocida por la maquinaria de reparación de DNA, lo que reactiva la expresión génica; Las mutaciones de *TET2* en SMD son inactivantes, lo que se traduce en la persistencia del silenciamiento de los genes metilados. Por su parte el *IDH* mutado inhibe la acción de *TET2* mediante la síntesis del oncometabolito 2-hidroxi-glutarato. Elaboración propia, creado con BioRender.com

Gen	Frecuencia	Implicaciones Clínicas	Observaciones
<i>EZH2</i>	3-7%	Peor supervivencia independiente de edad, anomalías citogenéticas y citopenias	
<i>ASLX1</i>	11-14%		
<i>DNMT3A</i>	10%	Peor respuesta a inducción con daunorubicina en LMA	Mayor frecuencia en LMA (23%)
<i>TET2</i>	30%	Mal pronóstico Mayor progresión a LMA	
<i>IDH 1/2</i>	1-5%		

Tabla 2. Implicaciones clínicas de genes de regulación epigenética mutados en SMD.

Las aberraciones cromosómicas del cromosoma 7 (del(7q) en el 8% de los casos *de novo* y monosomía 7 en el 4%) siguen en frecuencia. Estas alteraciones comprometen consistentemente loci 7q22 y en menor medida 7q32-36, en donde se localizan entre otros los genes *CUX1*, *MLL5*, *DOCK4* y *EZH2* (33). Un modelo de pez cebra vincula el gen *DOCK4* en la

aparición de cambios displásicos de la línea eritroide; este gen, participa en la activación de ROC1, una GTPasa fundamental para la formación del esqueleto de actina de los glóbulos rojos. Este mismo estudio encontró que la reducción de la expresión de este gen se relaciona con peor pronóstico (36).

Otras anomalías citogenéticas documentadas incluyen la trisomía 8 (con regulación al alza de los factores antiapoptóticos survivina, c-myc y CD1) y varias con compromiso del cromosoma 3, que, aunque raras, se relacionan con un mal pronóstico, probablemente por compromiso del gen *EVI1*, un factor de transcripción involucrado en la regulación del ciclo celular (33).

3.3.4. Mecanismo Fisiopatológicos Particulares: Neutropenias Congénitas

Los síndromes mielodisplásicos en contexto de neutropenias congénitas tienen características genéticas distintivas en su transformación maligna. La neutropenia congénita severa es un desorden genéticamente heterogéneo (aunque la mitad de los casos se deben a mutación del gen de la elastasa neutrofílica *ELANE*) que se caracteriza por la detención en estado de promielocito; la transformación a SMD/leucemia mieloide aguda se caracteriza por mayor presencia de monosomía 7/del(7q) y mutaciones de *CSF3R* y de *RUNX1* con respecto a otros casos de SMD (44% vs 6%, 88% vs 0.5% y 76% vs 6.6% respectivamente). De forma interesante, *CSF3R* codifica para el receptor de G-CSF y la mutación descrita en estos pacientes favorece la proliferación de la clona portadora por activación de STAT5; se ha sugerido que la transformación maligna en estos pacientes ocurre por la estimulación persistente con G-CSF (por infecciones a repetición o farmacológica) que favorece la proliferación de las células madre hematopoyéticas con esta mutación, con expansión subsecuente y acumulación de otras mutaciones (27,37). Por su parte, el síndrome de Schwachman-Diamond, que clínicamente se manifiesta con insuficiencia pancreática exocrina y anomalías hematológicas y óseas, es causado por la pérdida bialélica del gen *SBDS*, lo que impide el ensamblaje del ribosoma funcional 80S por la no liberación del EIF6 de la unidad 60S; molecularmente, la transformación maligna de esta entidad se caracteriza por una alta presencia de mutación de *TP53* (100% vs 6.3% en otros síndromes mielodisplásicos). El stress ribosomal induce la expresión de *TP53* con arresto celular consecuente, sin embargo su mutación atenúa este efecto, dotando a la clona portadora de una ventaja proliferativa sobre las demás; este mecanismo también se ha descrito en el síndrome de Diamond-Blackfan (mutación de *SPF14*) y en SMD con del(5q) (27).

3.3.5. SMD asociado a terapia

En caso de los SMD asociados a terapia, la patogénesis se relaciona con el mecanismo de acción de los agentes quimioterapéuticos; la alquilación genera un mal apareamiento de las bases y ruptura de cadenas sencillas y dobles, mientras que los inhibidores de topoisomerasa II estabilizan el complejo covalente formado por la enzima y el DNA, impidiendo la religación y generando ruptura cromosómica. Los intentos de reparación pueden generar traslocaciones y posterior transformación maligna (29).

3.4. Manifestaciones Clínicas

La mayoría de los pacientes se presentan con sintomatología asociada con las citopenias. La anemia suele presentarse más comúnmente que la trombocitopenia o la neutropenia y al menos 1/3 de los pacientes requieren transfusión de glóbulos rojos al momento del diagnóstico (1). En la tabla 3 se resumen las manifestaciones clínicas asociadas a síndrome mielodisplásico (21,38–43).

3.5. Diagnóstico

El diagnóstico requiere de análisis morfológico en los extendidos de sangre periférica, aspirado de médula ósea y biopsia de médula ósea. Así mismo debe contarse con la historia clínica, los resultados del cariotipo convencional en médula ósea, las pruebas genéticas moleculares y el inmunofenotipo en citometría de flujo (2).

3.5.1. Análisis Morfológico

La clasificación morfológica del SMD se basa en el porcentaje de blastos en la médula ósea y sangre periférica, el tipo y grado de displasia y en el porcentaje de sideroblastos en anillo; las líneas afectadas por la citopenia a veces no son necesariamente las que manifiestan la displasia (1).

3.5.1.1. Determinación del porcentaje de blastos.

Debe hacerse un conteo diferencial de todas las células nucleadas en 500 células del extendido de médula ósea (mielograma), de las cuales al menos 100 deben ser no eritroides (3,4). Las tinciones apropiadas son Wright-Giemsa, Peppenheim o Romanowsky, además de la tinción para hierro, que es indispensable para identificar y contar sideroblastos en anillo (4).

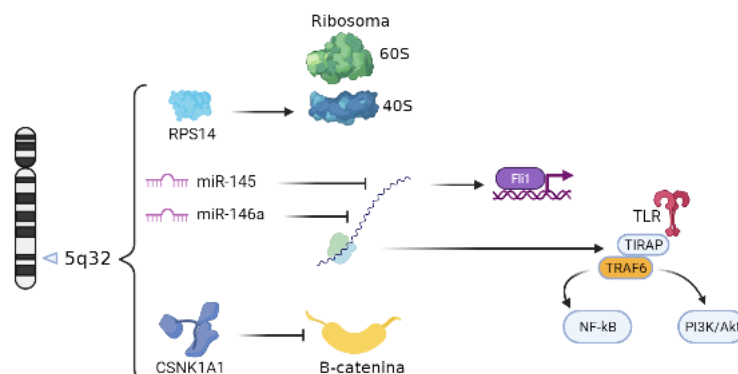


Figura 4. Funciones de algunos de los genes del locus 5q32, comúnmente perdido en SMD con del(5q). Elaboración propia, creado con BioRender.com

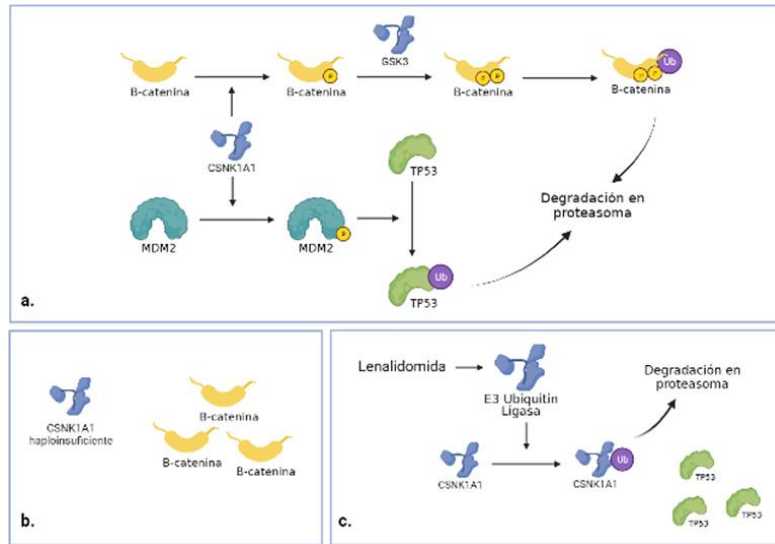


Figura 5. a. En condiciones usuales, la CSNK1A1 hace parte del complejo proteico de degradación de la B-catenina, junto con APC, axina y GSK3; CSNK1A1 fosforila la B-catenina para su posterior fosforilación por GSK3, lo que marca la proteína para ser ubiquitinada y degradada en los proteasomas. La fosforilación de MDM2 por CSNK1A1 activa su actividad ubiquitina ligasa sobre TP53, el cual es posteriormente degradado por el proteosoma. **b.** En la del(5q), la haploinsuficiencia de CSNK1A1 reduce la inhibición de la B-catenina, favoreciendo la proliferación de las células portadoras. **c.** La lenalidomida favorece la degradación de la CSNK1A1 por ubiquitinación modulando la acción de la E3 ubiquitin ligasa, generando la pérdida total de la proteína y eliminando la inhibición TP53 con apoptosis de las células portadoras. Elaboración propia, creado con BioRender.com

Manifestaciones	Definición	Frecuencia	Observaciones
Trombocitopenia	<100 x 10 ⁹ /L	40-65%	Peor pronóstico: supervivencia media de 7 meses (vs 41 meses sin trombocitopenia).
	<20 x 10 ⁹ /L	17%	Sangrado es causa de muerte en 24% de pacientes.
Anemia	<10g/dL	Hasta 98%	Hasta el 66% son dependientes de transfusión.
Neutropenia	<1.5 x 10 ⁹ /L	Hasta 39%	
Síndromes Paraneoplásicos/ Enfermedades Autoinmunes	Hipotiroidismo, AR, anemia perniciosa. Raros: SRIS con o sin linfohistiocitosis hemofagocítica, LES, enfermedad de Behcet.	10-48%	Retrasan el diagnóstico. Se relacionan con ↑IPSS. Menor supervivencia (69% vs 88% a los 30 meses). Enfermedad de Behcet: relacionada con trisomía 8 y mayor compromiso gastrointestinal.

Cutáneas	Dermatitis neutrofilicas, vasculitis leucocitoclástica	9.55-25%	Sin implicación pronóstica.
Otras	Sarcoma Mieloide Adenomegalias/ Organomegalias	Muy raras	Reportes de caso con infiltración de SNC y cardíaca ^(9,10) .

Tabla 4. Manifestaciones Clínicas descritas en SMD.

Igualmente, debe hacerse conteo diferencial en sangre periférica, el cual además de ser útil para la clasificación, tiene valor pronóstico, dado que un conteo de blastos en sangre periférica mayor que en médula ósea predice una menor supervivencia (3)(44).

La presencia de bastones de Auer indica SMD con exceso de blastos tipo 2, independientemente del porcentaje de estos (45).

3.5.1.2. Valoración de la displasia.

El número de líneas displásicas es importante para la clasificación y también es predictor del comportamiento de la enfermedad. La evaluación del grado de displasia se hace mejor en el extendido de médula ósea, el cual debe obtenerse de especímenes frescos no expuestos a agentes anticoagulantes por más de 2 horas, lo que garantiza la adecuada preservación de la morfología (1). El abordaje de la línea megacariocítica requiere el conteo de al menos 30 células; si son escasas en el extendido, pueden valorarse en la biopsia de médula ósea (4).

Debe tenerse en cuenta que la valoración del grado de displasia está sujeta a cierto grado de variación Inter observador; las concordancias descritas entre expertos es de máximo 78% (46).

3.5.1.3. Características de la displasia.

Diseritropoyesis. Se manifiesta principalmente en el núcleo, con gemación, formación de puentes internucleares, cariorrexis y multinucleación. Los cambios megaloblásticos, mejor valorados en los estadios policromático y ortocromático, pueden estar presentes, pero no son suficientes para el diagnóstico. En el citoplasma puede haber vacuolización, formación de sideroblastos en anillo y positividad aberrante para PAS (1).

La inclusión de criterios adicionales a estos (sugeridos por la OMS), no aumenta la sensibilidad ni especificidad para el diagnóstico (46).

Disgranulopoyesis. Se caracteriza por binucleación, hipersegmentación nuclear, núcleos en anillo, pseudo anormalidad de Pelger-Huet, hipogranularidad citoplasmática, pseudo gránulos de Chédiak Higashi y tamaño pequeño (Ver figura 6) (1,47).

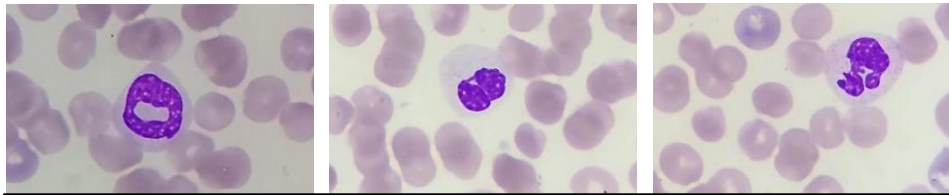


Figura 6. Displasia de la línea granulocítica. **a.** Núcleos en anillo. **b.** Pseudo anormalidad de Pelger-Huet e hipogranularidad citoplasmática. **c.** Hipersegmentación nuclear.

Displasia megacariocítica. El hallazgo más confiable lo constituyen los micromegacariocitos, definidos por un tamaño menor o igual al de un promielocito y con un núcleo no lobulado o bilobulado (1,4,45). Otros hallazgos son los núcleos hipolobulados, no lobulados, hipersegmentados, bizarros y la presencia de múltiples núcleos separados (47).

3.5.1.4. Biopsia de Médula Ósea

La biopsia de médula ósea aporta información adicional sobre el porcentaje de blastos, distribución espacial de los mismos, la celularidad, la morfología de los megacariocitos y la fibrosis del estroma.

Los especímenes se toman usualmente de la espina ilíaca posterior y deben contar con una longitud mínima de 1.5cms. Deben fijarse en formalina neutra, descalcificarse en EDTA por lo menos durante 8 horas y embeberse en parafina para cortarse en secciones de 1-3 μ m. Las tinciones de rutina son hematoxilina-eosina, Giemsa o AS-D cloroacetato esterasa (4).

La médula ósea es usualmente hiper celular y menos frecuentemente normocelular o hipocelular (4,45). La celularidad debe siempre valorarse en la biopsia de médula ósea, dado que el aspirado tiene una concordancia con la misma de solo el 36.5% (48).

Los síndromes mielodisplásicos agresivos se caracterizan por la presencia de agregados (3-5 células) o clusters (>5 células) de células mieloides inmaduras, ubicados centralmente y lejos de estructuras vasculares y superficies endostiales de las trabéculas óseas ("*localización anómala de precursores inmaduros*" o ALIP por sus siglas en inglés) (45).

La inmunohistoquímica (CD34 y CD117) es útil para confirmar la naturaleza blástica de las células inmaduras, sobre todo en presencia de hipocelularidad y fibrosis. Por su parte CD42b y CD61 facilitan la identificación de megacariocitos pequeños y micromegacariocitos, para lo cual también puede ser útil el uso de PAS. Tanto la triptasa como el CD117 identifican los mastocitos, los cuales están elevados en casi todos los pacientes con SMD y pueden tener apariencia de célula ahusada; si estos son prominentes, forman grupos compactos o expresan CD2/CD25, es apropiado hacer análisis de *KIT (KIT D816V)* para detección de mastocitosis sistémica coexistente. Los marcadores para otras líneas como CD3, CD14 o CD20 pueden usarse a discreción; p53 tiene valor pronóstico significativo, como se indica más adelante) (4,45).

La eosinofilia (conteo >5%) y basofilia (conteo >1%) en médula ósea tienen una prevalencia del 12.5% y el 11.8% respectivamente y se relacionan con puntajes de IPSS más altos y anormalidades citogenéticas de grupo de riesgo pobre e intermedio (49).

3.5.1.5. Consideraciones diagnósticas en casos especiales

3.5.1.5.1. Síndrome mielodisplásico hipoplásico.

Ocurre en el contexto de médula ósea hipocelular ($\leq 25\%$); se relaciona más con trombocitopenia y neutropenia, aunque parece tener un pronóstico favorable (45,48). No constituye un subtipo específico, sin embargo, debe tenerse en cuenta para el diagnóstico diferencial con anemia aplásica de la cual puede distinguirse por la presencia de displasia significativa, aumento de blastos por marcación con CD34 y un cariotipo anormal (45,50). La transformación gelatinosa (hipoplasia medular, atrofia grasa y depósito de material gelatinoso extracelular) es un hallazgo muy raro en pacientes diagnosticados con SMD y parece relacionarse con aberraciones del cromosoma 7 (51).

3.5.1.5.2. Síndrome mielodisplásico con fibrosis.

Corresponde a los casos con mielofibrosis grado 2 o 3 de la OMS. Se observan en el 10-15% de los SMD. No constituye tampoco un subtipo específico de esta entidad, pero estos casos pueden ser erróneamente diagnosticados como síndromes mielodisplásicos de bajo grado si solo se hace conteo de blastos en aspirado de médula ósea, por lo que la biopsia con estudio de inmunohistoquímica con CD34 y CD117 es de particular importancia. A diferencia de la mielofibrosis primaria, raramente cursa con esplenomegalia, leucoeritroblastosis o hematopoyesis intrasinusoidal, además se asocia con morfología típica en los megacariocitos, así como con aumento de blastos por CD34. Estos casos suelen tener un mal pronóstico (52).

3.5.1.6. Diagnósticos Diferenciales de Displasia

Aunque algunas características morfológicas como la presencia de neutrófilos agranulares y de micromegacariocitos son altamente sugestivos de SMD, siempre debe establecerse si la displasia tiene origen en un desorden clonal o es resultado de otro proceso (Ver tabla 4) (46).

Otros escenarios en los que puede observarse displasia morfológica incluyen el hipotiroidismo, las enfermedades autoinmunes, la enfermedad renal crónica, la hepatopatía crónica (que se asocia con neutropenia y trombocitopenia), la hemoglobinuria paroxística nocturna, los síndromes hereditarios de falla medular, la aplasia pura de serie roja y el compromiso de la médula ósea en leucemia de células peludas y en leucemia de linfocitos grandes granulares (4,45).

Diagnóstico Diferencial	Hallazgos Morfológicos
Déficit Nutricional Vitamina B12 Ácido fólico Cobre	Megaloblastosis, ↑ células CD34+ Sideroblastos en anillo
Tóxicos Arsénico Plomo Zinc	Sideroblastos en anillo Citopenias severas y displasia
Medicamentos Isoniazida Mofetil micofenolato TMP/SMX y tacrolimus Quimioterapia G-CSF	Sideroblastos en anillo (sin suplementación de vitamina B6) Hiposegmentación de los neutrófilos y eritroblastopenia Hiposegmentación de los neutrófilos Desviación a la izquierda, hipergranularidad e hiposegmentación

Infecciones Virales CMV, EBV HBV, HCV Parvovirus B19 Infecciones Bacterianas Leishmaniasis	Eritroblastos displásicos (>10%) Eritroblastopenia con pronormoblastos gigantes
---	--

Tabla 4. Diagnósticos diferenciales de displasia.

3.5.2. Inmunofenotipo

El análisis inmunofenotípico por citometría de flujo no constituye un criterio diagnóstico ni clasificatorio en SMD y no reemplaza la valoración morfológica, dado que está sujeto a discordancias por fibrosis o dilución (1,4) y sobreestima la relación mieloeritroide (calculada como la relación de células CD33+ con todas las células rojas nucleadas); así, la concordancia entre la citometría de flujo y la biopsia/extendido de médula ósea para el diagnóstico de SMD es del 87% (53).

A pesar de esto, la citometría de flujo puede emplearse para guiar el tratamiento y es de utilidad para soportar el diagnóstico en casos dudosos. Los resultados posibles son *ausencia de características relacionadas con SMD, anomalidades no conclusivas, o anomalidades altamente consistentes con neoplasia mieloide clonal tipo SMD* (4).

Las anomalidades inmunofenotípicas pueden ser detectadas en progenitores CD34+, neutrófilos en maduración, monocitos y precursores eritroides; las características inmunofenotípicas en SMD en cada uno de estos compartimentos ya ha sido descrita (1,4,53,54). El Grupo de Trabajo de Citometría de Flujo de la International/European LeukemiaNet sugieren evaluar como mínimo la dispersión lateral, así como la expresión de CD45, CD34, HLA-DR, CD11b, HLA-DR/CD11b, CD11b/CD16, CD13/CD11b, CD13/CD16, CD13/CD33, CD14, CD15, CD15/CD10, CD19, CD19/CD10, CD36, CD36/CD14, CD5, CD56, CD7, CD71 y CD71/CD235 (4)(55). Los hallazgos aberrantes en al menos 3 de las características evaluadas y al menos 2 compartimentos celulares afectados son altamente sugestivos de SMD (1).

Se ha valorado el rendimiento de estos parámetros para el diagnóstico de SMD; en los progenitores CD34+, por ejemplo, los hallazgos significativamente relacionados con SMD son una menor proporción de granulocitos CD10+ y mayor proporción de granulocitos CD56+, con un aumento del compartimento más inmaduro de las células mieloides (CD33+ CD16-, CD45+ CD16-, CD13+ CD16-) (53). La reducción de CD38 en las células CD34 positivas ha mostrado una sensibilidad de 95% y una especificidad del 92% para el diagnóstico de SMD de bajo grado (56). Por otro lado, la disminución de la expresión de CD117 a un nivel <30% en los neutrófilos, tiene una especificidad del 95% y un valor predictivo positivo del 90% (57).

Se han desarrollado criterios diagnósticos objetivos para la valoración de SMD, siendo los más conocidos los propuestos por Ogata, que establecen un diagnóstico de SMD con 2 o más de los siguientes: cluster de mieloblastos mayor o igual al 1%, baja dispersión lateral de los granulocitos (menor o igual a 6), expresión anormal de CD45 en los mieloblastos (<3.77 o >6.2) y cluster de progenitores de células B menor de 5%. La inclusión de una expresión de CD177 menor o igual a 30% en los granulocitos en estos criterios incrementa la sensibilidad del 78% al 90% conservando una especificidad del 91% (57).

3.5.3. Perfil Genético

Los estudios citogenéticos son de importancia para la determinación de la clonalidad, el pronóstico y la correlación con las características morfológicas y clínicas. El cariotipo convencional con la valoración de mínimo 20 metafases debe realizarse en todos los pacientes; una clona se define como dos o más metafases con el mismo rearrreglo estructural (delección, inversión, traslocación) o al menos 3 con pérdida del mismo cromosoma. En caso de obtener un resultado equívoco o de no lograr crecimiento celular, debe emplearse FISH con análisis de al menos las regiones 5q31, cep7, 7q31, 20q, cep8, cepY y p53. Los estudios de citogenética deben repetirse durante el seguimiento dado que la evolución de este se relacionan con el pronóstico y la progresión (4).

Las aberraciones citogenéticas han sido bien caracterizadas como factores pronósticos en SMD y se clasifican en subgrupos que se correlacionan con la supervivencia media de acuerdo al Comprehensive Cytogenetic Scoring System (CCSS) (Ver tabla 5) (58).

Los cariotipos complejos (3 o más anomalías) típicamente incluyen a los cromosomas 5 y/o 7 con pérdida completa o del(5q) o del(7q); tienen un curso clínico no favorable, clasificándose en la categoría de muy pobre pronóstico (32)(58); en estos pacientes debe considerarse el trasplante de precursores hematopoyéticos independientemente de su puntaje IPSS-R (Ver más adelante) (59).

Las mutaciones somáticas, que ya se discutieron previamente, pueden coexistir en una misma clona (frecuentemente se relacionan las que afectan el spliceosoma con las que comprometen factores epigenéticos). Además, algunas mutaciones tienen características morfológicas específicas: mientras que la mutación en *SF3B1* se asocia con sideroblastos en anillo, las alteraciones de *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* y *SRSF2* se asocian con displasia granulocítica severa (34).

Comprehensive Cytogenetic Scoring System (CCSS)			
Subgrupo Pronóstico	Anomalia Citogenética	Frecuencia	Supervivencia Media (meses)
Muy Bueno	-Y del(11q)	2.9%	60.8
Bueno	Cariotipo normal del(5q) del(12p) del(20q) der(1; 7) Doble, incluyendo cromosoma 5	65.9%	48.5
Intermedio	del(7q) +8 iso(17q) +19 +21 Otras no pertenecientes a otros grupos Dos o más clonas sin cariotipo complejo	20.7%	25.0
Pobre	-7 Doble, incluyendo -7 ó del(7q) inv(3)(q21; q26) t(3;3)(q21; q26) del(3q) Cariotipo complejo de 3 aberraciones	3.6%	15.0
Muy Pobre	Cariotipo complejo > 3 aberraciones	7.0%	5.7

Tabla 5. -: pérdida cromosómica; del: deleción; der: translocación no balanceada; +: ganancia de cromosoma; iso: isocromosoma.

3.6. Subtipos del Síndrome Mielodisplásico

El SMD comprende varios subtipos según el número de citopenias presentes al momento del diagnóstico, el número de líneas mieloides con displasia, la presencia de sideroblastos en anillo y el porcentaje de blastos en sangre y médula ósea. Respecto a las aberraciones genéticas, solo la del(5q) corresponde a un subtipo diferenciado de SMD, aunque la mutación del gen SF3B1 se incluye como criterio diagnóstico del SMD con sideroblastos en anillo dada su estrecha relación con este subtipo (1). En las figuras 7 a 8 hay un algoritmo diagnóstico para la subclasificación a partir del número de líneas comprometidas por displasia y en la tabla 6 se resumen las principales características de cada uno de los subtipos (1,21,22,30–32,34).

Los casos de SMD inclasificables deben ser seguidos cuidadosamente para su mejor clasificación; en un estudio con 43 casos de SMD inclasificable (40 de pancitopenia con displasia de una sola línea, 2 de anomalías citogenéticas definitorias y 1 de 1% de blastos en sangre periférica), el 54% fueron reclasificados en el seguimiento, 42% a SMD con exceso de blastos, 24% a SMD con displasia multilinea, 14% a leucemia mielomonocítica crónica, 10% a SMD/neoplasia mieloproliferativa y 5% a SMD con sideroblastos en anillo y displasia de una sola línea (60).

Subtipo SMD	Frecuencia	Criterios de Diagnóstico				Pronóstico			Mutaciones	Citogenética
		Líneas con displasia (#)	Citopenia (#)	Sideroblastos en Anillo (%)	Blastos (%)	SM	PAL (% a 5 años)	Notas		
Displasia de una sola línea	7-20%	1	1 o 2	<15% ó <5% si SF3B1 mutado	SP: <1% MO: <5% Sin bastones de Auer	66-89	10	IPSS: Bueno/Muy bueno en >90%. Trombocitopenia ↓ SM a 16 meses.	70% de los casos. Más comunes: TET2 y ASXL1	Normal , del(20q), +8, -5, del(5q), -7, del(7q).
Con sideroblastos en anillo*	3-11%		1-3	≥15% ó ≥5% si SF3B1 mutado	SP: <1% MO: <5% Sin bastones de Auer			TET2, DNMT3A y RUNX1 empeoran el pronóstico. La displasia multilinea tiene peor pronóstico e IPSS.	70-90%: SF3B1 mutado. <10%: SRF2, U2AF1 y ZRSR2 (excluyentes con SF3B1).	
Con displasia de una sola línea		1				108	2			20% de los casos
Con displasia multilinea		2-3				28	8			50% de los casos
Con displasia multilinea	45-65%	2-3	1-3	<15% ó <5% si SF3B1 mutado	SP: <1% MO: <5% Sin bastones de Auer	36	28	Fibrosis: en el 16%, peor pronóstico, ↑blastos, ↑trombocitopenia	>50%: STAG2, ASXL1, SRSF2, RUNX1, CBL, TP53 y TET2.	50%. +8, -5, del(5q), -7, del(7q), del 20q.

Con exceso de blasto	40%	1-3	1-3	Cualquiera	SP: 2-19% MO: 5-19%			Fibrosis: en el 15%, peor pronóstico.	<i>SRSF2</i> (excluyente con <i>TP53</i> mutado). <i>IDH1/2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>CBL</i> , <i>RUNX1</i> , <i>RAS</i> .	30-50%: +8, -5, del(5q), -7, del(7q), del 20q.
Tipo I					SP: <5% MO: <10%	16	25			
Tipo II					SP: 5-19% MO: 10-19% ó bastones de Auer	9	33			
con del(5q) aislada	2-5%	1-3	1-2	Cualquiera	SP: <1% MO: <5% Sin bastones de Auer	66-145	10	Mutaciones de <i>TP53</i> : peor pronóstico y supervivencia; mayor riesgo de transformación leucémica. **	Menor frecuencia de mutaciones somáticas (excepto <i>TP53</i>)	La presencia de -7 y del(7q) descarta el diagnóstico.
Inclasificable	4-6%									
Con 1% de blastos		1-3	1-3	Cualquiera	SP: 1% (medido 2 veces) MO: <5% Sin bastones de Auer.	35	14			
Con displasia de una línea y pancitopenia		1	3	Cualquiera	SP: <1% MO: <5% Sin bastones de Auer	30	18			
Con aberración citogenética definitiva		0	1-3	<15%	SP: <1% MO: <5% Sin bastones de Auer	?	?			Ver tabla 8. Excluye +8, -Y e del(20q).

Tabla 6. Resumen de los subtipos de SMD. SM: supervivencia media en meses; PAL: progresión a leucemia. *Sideroblastos en anillo: 5 o más gránulos de hierro rodeando $\frac{1}{2}$ o más del núcleo en tinción para hierro). **Dado su valor pronóstico, debe realizarse TP53 por secuenciación o inmunohistoquímica; la tinción de >1% de las células en médula ósea se correlaciona con la presencia de mutación en este gen.

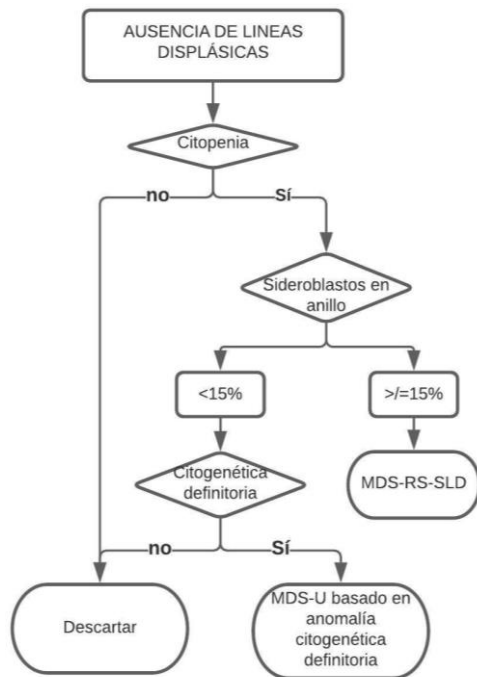


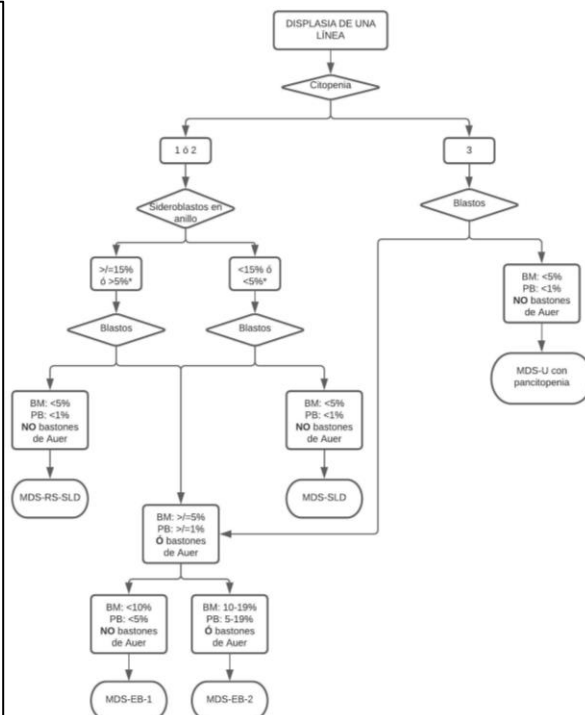
Figura 7. Algoritmo de clasificación de síndromes mielodisplásicos en ausencia de displasia. En ausencia de displasia morfológica, el diagnóstico de SMD solo debe hacerse en presencia de citopenia con alteraciones citogenéticas definitivas. La presencia de sideroblastos en anillo en porcentaje mayor o igual a 15% es por definición displasia eritroide significativa; en presencia de mutaciones del gen SF3B1, el umbral de porcentaje de sideroblastos en anillo es del 5%. MDS-U: síndrome mielodisplásico inclasificable; MDS-RS-SLD: síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo con displasia de una sola línea.

Gráfico realizado a partir de las recomendaciones de WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition.

Figura 8. Algoritmo de clasificación de síndromes mielodisplásicos con displasia de una línea.

* Casos con sideroblastos en anillo del 5% o más y mutación de SF3B1 también se clasifican como síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo. MDS-RS-SLD: síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo con displasia de una sola línea; MDS-EB-1: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos tipo 1; MDS-EB-2: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos tipo 2; MDS-SLD: síndrome mielodisplásico con displasia de una sola línea; MDS-U: síndrome mielodisplásico inclasificable.

Gráfico realizado a partir de las recomendaciones de WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition.



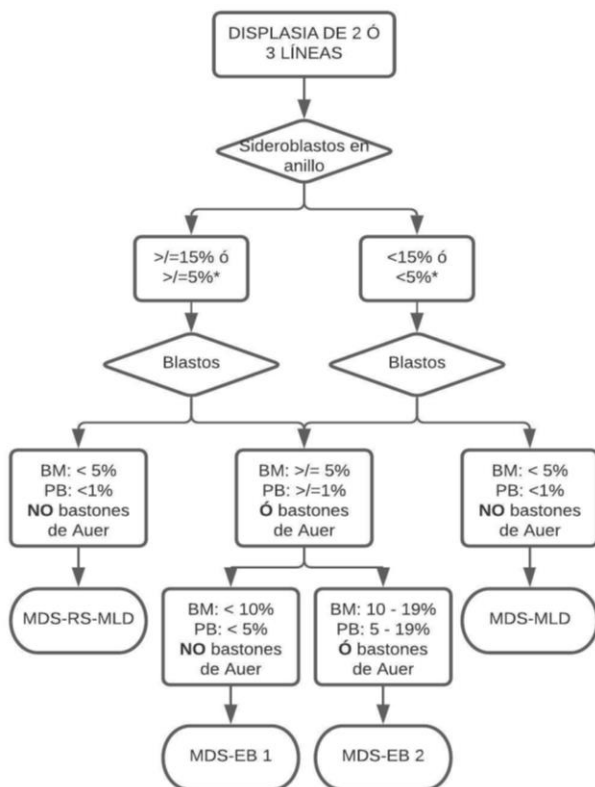


Figura 9. Algoritmo de clasificación de síndromes mielodisplásicos con displasia de 2 o 3 líneas.

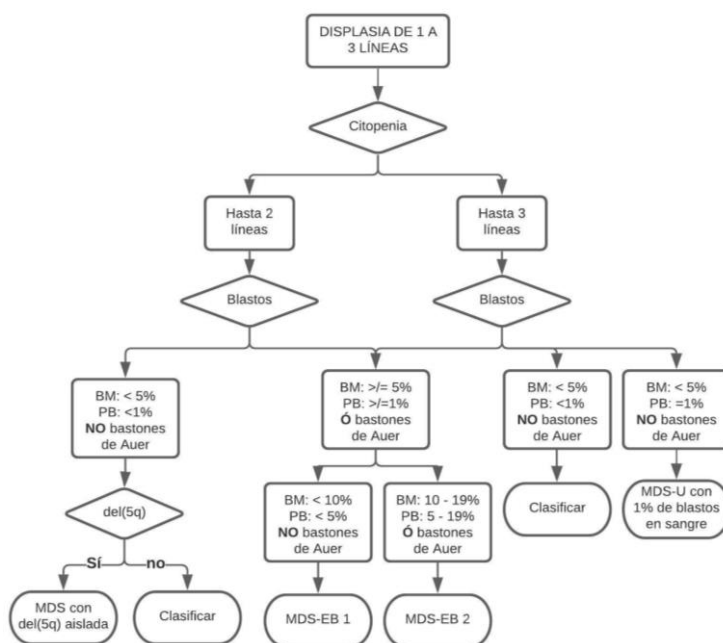
* Casos con sideroblastos en anillo del 5% o más y mutación de SF3B1 también se clasifican como síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo. MDS-RS-MLD: síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo con displasia multilínea; MDS-EB-1: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos tipo 1; MDS-EB-2: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos tipo 2; MDS-MLD: síndrome mielodisplásico con displasia multilínea.

Gráfico realizado a partir de las recomendaciones de WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition.

Figura 10. Algoritmo de clasificación de síndromes mielodisplásicos con displasia de 1 a 3 líneas.

Los procesos que terminan en "Clasificar" deben remitirse a los algoritmos previos. MDS: síndrome mielodisplásico; MDS-EB-1: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos tipo 1; MDS-EB-2: síndrome mielodisplásico con exceso de blastos tipo 2; MDS-U: síndrome mielodisplásico inclasificable.

Gráfico realizado a partir de las recomendaciones de WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition.



3.7. Pronóstico

El pronóstico del SMD varía dependiendo del subtipo, aunque en general es pobre, con una supervivencia del 31.3% a los 5 años (3,22). En consideración de esto, la OMS clasifica esta entidad en tres grupos de riesgo según su predisposición al desarrollo de LMA y a la

supervivencia, excluyendo los SMD inclasificables, debido a que su comportamiento es heterogéneo (1):

Riesgo Bajo: con displasia de una sola línea; con sideroblastos en anillo y displasia de una sola línea; y con delección aislada de 5q.

Riesgo Intermedio: con displasia multilínea; y con sideroblastos en anillo y displasia multilínea.

Riesgo Alto: con exceso de blastos.

De la misma forma, para la determinación del pronóstico, se aplica el IPSS-R el cual define 5 grupos de riesgo (Muy bajo, Bajo, Intermedio, Alto y Muy Alto), mediante la valoración de 5 parámetros que han demostrado tener el mayor impacto pronóstico en cuanto a supervivencia media y transformación a LMA: porcentaje de blastos en médula ósea, grupo de riesgo citogenético CCSS (*Comprehensive Cytogenetic Scoring System*) (56) y severidad de la citopenia (concentración hemoglobina, conteo de plaquetas y conteo absoluto de neutrófilos); a cada una de estas variables se les asigna un valor de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 o 4 y la sumatoria de estas da como resultado un puntaje de riesgo clasificado como muy bajo, bajo, intermedio, alto y muy alto (Ver tablas 7 y 8) (61).

En casos de bajo riesgo, es útil el uso del Sistema de Puntaje Pronóstico basado en la Clasificación de la OMS (WPSS), el cual incluye el requerimiento de transfusión y la displasia morfológica (de una sola línea vs multilínea) (1).

IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System)							
Variable	Puntaje						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Cariotipo (subgrupo CCSS)	Muy bueno		Bueno		Interm.	Pobre	Muy Pobre
Blastos de médula ósea (%)	≤2%		>2% a <5%		5 a 10%	>10%	
Concentración Hemoglobina (g/dL)	≥10		8 a <10	<8			
Plaquetas (x10 ⁹)	≥100	50 a <100	<50				
Conteo Neutrófilos (x10 ⁹)	≥0.8	<0.8					

Tabla 7. Sistema de Puntaje Pronóstico Internacional Revisado.

Categoría de Riesgo IPSS-R	Puntaje IPSS-R	Supervivencia Media (Años)	Transformación AML*
----------------------------	----------------	----------------------------	---------------------

Muy Bajo	≤1.5	8.8	NR
Bajo	>1.5 a 3	5.3	10.8
Intermedio	3 a 4.5	3.0	3.2
Alto	>4.5 a 6	1.6	1.4
Muy Alto	>6	0.8	0.73

Tabla 8. Categorías de Riesgo/Puntajes del IPSS-R y pronóstico.

* Medida en años hasta la transformación a AML del 25% de los pacientes.

Además del valor pronóstico descrito del IPSS-R, esta herramienta también se emplea en la práctica para guiar el tratamiento de los pacientes, clasificándolos en 2 grupos con abordajes terapéuticos distintos. En el grupo de menor riesgo, que comprende las categorías muy baja y baja, el manejo se centra en la mejoría de las citopenias y síntomas relacionados con estas. Por su parte, en el grupo de mayor riesgo, que comprende las categorías intermedio, alto y muy alto, los esfuerzos se enfocan en cambiar el curso natural de la enfermedad y en mejorar la sobrevida mediante trasplante de precursores hematopoyéticos en los pacientes que sean candidatos a este (62)(63).

La mayoría de los pacientes con SMD fallecen por complicaciones asociadas a la enfermedad: LMA (47%), infección (27%), sangrado (10%) y sobrecarga de hierro (3%) (22).

3.7.1. Consideraciones pronósticas en los síndromes mielodisplásicos asociados a terapia

El pronóstico global en este grupo es pobre, con una sobrevida media de 8 meses tras el diagnóstico y una sobrevida a 5 años menor del 10%. En estos casos, ni el WPSS ni el IPSS-R estratifican correctamente a los pacientes. Como factores de mal pronóstico se han reportado una edad mayor de 65 años, ciertas anormalidades citogenéticas (pérdida de cromosoma 7 o cariotipo complejo), la profundidad de la citopenia (anemia con hemoglobina <10g/dL, conteo de plaquetas <50x10⁹) y los subtipos con exceso de blastos (29). Por su parte en pacientes candidatos a trasplante alogénico de células hematopoyéticas los factores pronósticos de importancia reportados son la presencia de anormalidades citogenéticas, la remisión incompleta al momento del trasplante y la edad >40 años (64).

3.7.2. Otros factores pronósticos

Edad. Los pacientes <50 años presentan mejor funcionalidad, anemia menos severa, mejor función renal, menor infiltración de blastos en médula ósea y una mayor sobrevida (39.7 meses vs 19 meses) respecto a los pacientes mayores de 50 años (65).

Género. Las mujeres tienen mejor sobrevida que los hombres (33.6% vs 27.6% a los 5 años) (66).

Comorbilidades. Predicen los resultados tanto en pacientes candidatos a trasplante de células madre hematopoyéticas como en candidatos a manejo conservador; hasta un 93% de estos pacientes tienen una o más comorbilidades, siendo las más comunes las enfermedades cardíacas y la diabetes y sus complicaciones. El uso del MDS-CI (Índice de Comorbilidades en SMD) y del CCI (Índice de Comorbilidades de Charlson) en estos casos predice satisfactoriamente la sobrevida y la muerte por causas no relacionadas con leucemia (67,68).

Albúmina sérica. Predice tanto mortalidad como transformación leucémica independientemente de la clasificación pronóstica (IPSS y WPSS); de hecho, la clasificación de los pacientes en tres grupos según el nivel de albúmina, menor o igual a 3.5, 3.5 a 4.0 y mayor de 4.0 predice sobrevidas medias de 24, 39 y 77 respectivamente (69).

Mutaciones somáticas. Tienen importancia en pronóstico o se asocian a respuesta a terapias específicas; por ejemplo, *TET2* y *DNMT3A* afectan la respuesta terapéutica a agentes hipometilantes y *TP53* asociada a del(5q) predice pobre respuesta a lenalidomida, puntajes IPSS-R alto, mayor conteo de blastos, mayor progresión a leucemia y menor supervivencia (9 meses vs 66 meses en casos con *TP53* silvestre) (30,70). En la sección de fisiopatología se revisaron las implicaciones de ciertas mutaciones somáticas en el comportamiento clínico del SMD.

En este sentido, se ha sugerido la inclusión de las mutaciones somáticas en puntajes pronósticos como el IPSS-R; por ejemplo, un estudio en pacientes con SMD encontró que la incorporación de la edad y las mutaciones en *TP53*, *EZH2* y *SF3B1* al IPSS-R en un modelo de predicción lineal mejoraba la capacidad de discriminación de los desenlaces respecto al uso de solo el IPSS-R (8). Otro modelo que incluyó el análisis de 5 genes (*CBL*, *IDH2*, *ASXL1*, *DNMT3A* y *TP53*) junto con el IPSS-R y la edad clasificó los pacientes en cuatro grupos de riesgo relacionados con supervivencia y transformación a LMA (71). Un abordaje interesante consiste en la creación de un sistema de puntaje basado en el número de mutaciones documentadas (sin discriminar por los genes específicos mutados, excepto por *SF3B1*, relacionado con un mejor pronóstico), en combinación con el IPSS-R; empleando esta herramienta los autores del estudio reportaron la clasificación correcta de pacientes con resultados clínicos adversos a pesar de pertenecer a grupos de menor riesgo empleando solo IPSS-R (72).

3.8. Uso de Inmunohistoquímica en el abordaje de mutaciones con impacto clínico en Síndrome Mielodisplásico

A pesar de la indiscutible utilidad de las tecnologías de secuenciación para la detección de mutaciones somáticas en SMD, su costo limita su uso rutinario en ciertos escenarios; por otro lado, la inmunohistoquímica es un método relativamente rápido, reproducible y ampliamente disponible para uso en el laboratorio, lo que hace valiosa su exploración como marcador indirecto de la presencia de dichas mutaciones (9,10).

3.8.1. Inmunohistoquímica para P53 en SMD

La expresión de P53 por inmunohistoquímica es un marcador subrogado de mutación de esta, considerando que la forma mutada de la proteína se une a HSP70, prolongando su vida media de aproximadamente 15 minutos a varias horas (73). De hecho, el uso de inmunohistoquímica en SMD ha mostrado una adecuada correlación con la secuenciación del gen para la detección de mutaciones empleando un umbral de expresión en $\geq 1\%$ de la celularidad (9,10,13,73), con sensibilidad que varía entre 59.1 - 86% y especificidad entre 90 - 100% (9,10).

En un estudio con 51 biopsias de médula ósea de pacientes con diagnóstico de SMD, el 14% fueron positivas para P53 en células de la línea mieloide, mientras que ninguno de los controles mostró expresión (20 con diagnóstico de anemia aplásica y 12 sin desórdenes hematológicos. Adicionalmente, los pacientes con SMD que progresaron a LMA presentaron significativamente mayor expresión de P53 respecto a los demás casos de SMD (50% vs 0%, $P < 0.001$) (73).

El escenario en el que mejor se ha establecido la utilidad de *TP53* en SMD es en los casos con del(5q), en donde es un predictor independiente de mortalidad, respuesta a

lenalidomida y transformación a LMA; de hecho, la OMS recomienda su evaluación (por inmunohistoquímica o secuenciación) en casos clasificados en este subtipo (1). Un estudio con 131 biopsias de médula ósea de pacientes con SMD con del(5q) evaluó el valor pronóstico de la inmunohistoquímica para P53 empleando un porcentaje de células con expresión nuclear $\geq 1\%$ como umbral de definición de positividad; de forma interesante, los autores encontraron expresión preponderante en los precursores eritroides, con diferencias significativas entre los pacientes con y sin expresión de P53 en supervivencia media (2.4 años vs 4.3 años, $P=0.0175$) y progresión a LMA (56.3% vs 19.6%, $P=0.0006$) con similares desenlaces en pacientes que recibieron manejo con lenalidomida (14).

El papel pronóstico de la detección de mutaciones de *TP53* también se ha evaluado en el SMD asociado a terapia, entidad en la que se documentan alteraciones en este gen con mayor frecuencia (5-10% en SMD *de novo* vs 40% de los casos asociados a terapia). Un estudio realizado en pacientes con neoplasias mieloides asociadas a terapia, la expresión de P53 por inmunohistoquímica (definida por expresión en $\geq 1\%$ de la celularidad) se relacionó con mayor displasia de las series eritroides y megacariocítica, con una correlación significativa con la presencia de mutaciones por secuenciación ($P < 0.0001$). Igualmente, la expresión de P53 se relacionó con menor supervivencia media (5.2 meses vs 20.6 meses, $P < 0.0001$) (15).

A pesar de esto, el uso de inmunohistoquímica tiene algunas limitaciones; por ejemplo, las mutaciones sin sentido pueden pasarse por alto empleando únicamente inmunohistoquímica, además de que otros mecanismos postraduccionales pueden mediar en la expresión de proteínas no mutadas, como la estabilización por p14ARF o la inhibición de la degradación de esta por MDM2 (15,73).

3.8.2. Valoración de Reguladores Epigenéticos por Inmunohistoquímica: *EZH2*

El abordaje de las mutaciones en *EZH2* mediante inmunohistoquímica ya se ha evaluado previamente. En un estudio con 61 pacientes que incluía casos de MDS, AML y síndrome mielodisplásico/neoplasia mieloproliferativa (MDS/MPN) con mutación conocida para *EZH2* se hizo inmunohistoquímica para evaluar su expresión y se comparó con 29 casos no mutados; se encontró una expresión significativamente menor en los casos mutados respecto a los *wild-type*, así como en los casos con -7/del(7q) (74). Otro estudio realizado con 58 pacientes con neoplasias mieloides (51 con AML, de los cuales 6 tenían *EZH2* mutado) mostró también una correlación significativa entre la disminución de la expresión de *EZH2* y su mutación (75).

Otra posibilidad interesante es la detección indirecta las mutaciones en *EZH2* mediante la valoración de la expresión de H3K27me3. La mayoría de las mutaciones de *EZH2* son de tipo sin sentido o desplazamiento del marco de lectura, lo que sugiere pérdida de función; de hecho, estas mutaciones se relacionan con disminución de la expresión de esta histona trimetilada (30,76).

El uso de inmunohistoquímica para H3K27me3 se ha estudiado previamente en neoplasias sólidas; su papel en el diagnóstico del Tumor Maligno de Vaina Periférica, en consideración de la desactivación de PRC2 frecuentemente observada en esta neoplasia, está bien documentado y la pérdida de su expresión tiene relativa especificidad para su diferenciación de otros sarcomas por lo que la OMS recomienda su uso en el abordaje diagnóstico de esta entidad (77,78). Además de su utilidad diagnóstica, la pérdida de H3K27me3 se ha correlacionado con menor supervivencia y con factores pronósticos propios en pacientes con cáncer de ovario, mama y páncreas (79).

Respecto al uso de inmunohistoquímica para H3K27me3 en neoplasias mieloides, el estudio previamente citado evaluó la expresión de H3K27me3 con la de *EZH2*, encontrando una

relación significativa entre la conservación de ambas en los pacientes sin mutaciones del gen. A pesar de esto, no logró documentarse esta misma relación entre la pérdida de la expresión de ambos marcadores en los pacientes portadores de la mutación, sin embargo, debe resaltarse que no se contó con estudios para H3K27me3 en la totalidad de los individuos con *EZH2* mutado (75).

3.8.3. Inmunohistoquímica en el compromiso de genes Splicing

Dentro de las mutaciones más características de los genes del splicing están las que afectan a *SF3B1*, descrita en el 20-28% de todos los casos de SMD y en más del 80% de los casos de SMD con sideroblastos en anillo; el valor predictivo positivo de esta mutación para la presencia de sideroblastos en anillo es tan alta que sugiere relación etiológica y de hecho en su presencia el umbral diagnóstico para clasificar un caso en este subtipo disminuye del 15% al 5% de sideroblastos en anillo, siendo la primera aberración molecular incluida en la clasificación diagnóstica del SMD (1,30,80).

Además de su relevancia para el diagnóstico, las mutaciones en *SF3B1* también tienen significado pronóstico, relacionándose con una mejor supervivencia y menor progresión a AML (8,80,81); por otro lado, los pacientes portadores son candidatos potenciales a manejo con luspatercept (82), mientras que predicen mejor respuesta a agentes hipometilantes (83) y peor a terapia inmunosupresora (84).

SF3B1 es un componente de la U2snRNP encargada del reconocimiento del *Branch point*, ubicado corriente arriba del sitio de empalme 3' en el pre-RNA (30,85); las mutaciones en *SF3B1* en este contexto son de tipo cambio de sentido y comprometen con mayor frecuencia los dominios HEAT ubicados hacia su extremo C-terminal, resultando en una proteína probablemente estructuralmente íntegra, pero con función alterada (85), que genera un sitio de splicing alternativo 3' en el gen *ABCB7* (entre otros) que agrega 21 pares de bases adicionales entre los exones 8 y 9 dando origen a un codón de terminación proximal al exón 9; este transcrito aberrante es destruido por Degradación de mRNA Mediada por Mutación Terminadora, lo que se traduce en una reducción de su expresión (86). Debe resaltarse que el gen *ABCB7* es un transportador de hierro que ha sido implicado directamente en el fenotipo de los sideroblastos en anillo (87).

A pesar de que las mutaciones en *SF3B1* generan proteínas estructuralmente conservadas, dan como resultado la reducción de la expresión de *ABCB7*; hasta el momento, dentro de la bibliografía consultada, no se ha abordado la capacidad de documentar este defecto mediante inmunohistoquímica.

SRSF2 es otro gen de splicing frecuentemente mutado (20 – 30%) en los pacientes con SMD; este participa en el reconocimiento de una secuencia consenso en los potenciadores exónicos de empalme. Las mutaciones en este gen también han demostrado relacionarse con peores desenlaces; un estudio que incluyó 67 pacientes con SMD portadores de genes de splicing mutados mostró que el compromiso de *SRSF2* estaba presente en el 12.4% de estos, con mayor riesgo de progresión a AML (39 vs 69%) y menor supervivencia (17 vs 39% a los 5 años), independientemente de la clasificación IPSS (88). De la misma forma, un metanálisis que incluyó 294 pacientes con alteraciones de *SRSF2* encontró resultados concordantes, con un HR para transformación a AML de 1.89 y para supervivencia del 1.49; adicionalmente los casos clasificados por IPSS como de riesgo bajo e intermedio-1 mostraron un mayor riesgo de transformación (HR=3.12) (89).

Las mutaciones en *SRSF2* no se traducen en pérdida de la función sino en una alteración de esta, en la que la proteína reconoce preferentemente secuencias consenso en los

potenciadores exónicos de empalme CCNG (sobre las GGNG); esto genera la introducción de un codón de terminación en *EZH2*, por lo que los transcritos de este gen se pierden por Degradación de mRNA Mediada por Mutación Terminadora, con reducción subsecuente de la expresión del gen (90). En la búsqueda realizada no se encontró literatura en la que se evaluara el uso de inmunohistoquímica para *EZH2* en este contexto.

4. OBJETIVOS

Objetivo General: Caracterizar en términos de frecuencia relativa, patrón e intensidad de tinción las proteínas P53, EZH2, H3K27me3 y ABCB7 en biopsia de médula ósea de pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022.

Objetivos específicos:

- Describir las características morfológicas de la biopsia de médula ósea de los pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022
- Caracterizar los patrones de expresión de cada uno de los marcadores de inmunohistoquímica empleados en las biopsias de médula ósea de pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas).
- Identificar las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) a quienes se les tomó una biopsia de médula ósea y fueron atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022

Objetivos secundarios:

- Identificar la magnitud de la asociación entre la expresión de las proteínas P53, EZH2, H3K27me3 y ABCB7 con características clínicas basales y desenlaces clínicos de interés en pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño de estudio: estudio observacional, analítico de tipo corte transversal de pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) a quienes se les tomó una biopsia de médula ósea y fueron atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia entre 2017 y 2022.

5.2. Población:

- **Población De Referencia:** Pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas).
- **Población Objetivo:** Pacientes con citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) a quienes se les tomó una biopsia de médula ósea y fueron atendidos en el Hospital Universitario Nacional de Colombia.
- **Población Elegible**

- **Criterios De Inclusión:**
 - Pacientes \geq 18 años
 - Pacientes con diagnóstico de citopenia (Síndrome Mielodisplásico, Citopenia Inexplicada Persistente y Citopenia de otras causas) de acuerdo con lo registrado en su Historia Clínica
 - Disponibilidad de material suficiente de biopsia de médula ósea dentro del repositorio del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario Nacional de Colombia.
- **Criterios De Exclusión:**
 - Material insuficiente para estudio, definido por el agotamiento del tejido o potencial agotamiento del mismo con su procesamiento para la realización del estudio.
 - Pacientes con diagnóstico de Neoplasia Hematolinfoide diferente al Síndrome Mielodisplásico de acuerdo con la clasificación de la OMS de tumores hematolinfoides:
 - Leucemias Mieloides Agudas
 - Leucemia de Linaje Ambiguo
 - Neoplasias Mieloproliferativas
 - Neoplasias Mieloproliferativas/Mielodisplásicas
 - Neoplasias de Precursores Linfoides
 - Neoplasias maduras de células B
 - Neoplasias maduras de células T y NK
 - Linfomas Hodgkin
 - Neoplasias de células dendríticas e histiocíticas

5.3. Muestra: para el cálculo de tamaño de muestra se utilizará la fórmula y los lineamientos propuestos en el artículo de *Pourhoseingholi et al.* para hacer el cálculo de tamaño de muestra, considerando que se trata de un estudio de corte transversal. Teniendo en cuenta la baja prevalencia de las proteínas a analizar, para aquellas en las que sea menor al 10% se ajustará de forma conservadora el considerar **un cuarto de la prevalencia** como el valor de la precisión. En caso de prevalencias esperadas iguales o mayor al 10%, se considerará un valor de precisión del 5%.

$$n = \frac{Z^2 P(1-P)}{d^2}$$

- Z = Estadístico Z correspondiente al nivel de confianza
- P = Prevalencia esperada
- d = Precisión

Dado el hecho de que se tienen diferentes **prevalencias esperadas** para cada una de las proteínas a estudiar, se calcularon los siguientes escenarios:

Proteína	Estadístico Z	Prevalencia esperada (P)	Precisión (d)	Muestra (n)
P53	1.96 (95% confianza)	8 al 13%	0.02 a 0.0325	174 a 707
EZH2		3 al 7%	0.0075 a 0.0175	817 a 1987

H3K27me3		No data	No data	No data
ABCB7		20 al 28%	0.05	246 a 310

Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Rahimzadeh M. Sample size calculation in medical studies. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2013;6(1):14-17.

5.4. Estudios de inmunohistoquímica: se estudiará la expresión de P53, EZH2, H3K27me3 y ABCB7.

5.5. Descripción de variables:

Variable	Definición	Tipo	Categoría
VARIABLES DEMOGRÁFICAS			
Edad	Tiempo de vida en años al momento de la toma de la biopsia	Cuantitativa continua	No aplica
Sexo	Masculino o femenino de acuerdo con el fenotipo	Cualitativa nominal	0: femenino 1: masculino
VARIABLES CLÍNICAS			
Diagnóstico Clínico	Según reporte en historia clínica	Cualitativa nominal	No aplica
Subtipo de SMD	Según reporte en historia clínica y de acuerdo con la clasificación de la OMS 2016	Cualitativa nominal	0: SMD con displasia de una línea 1: SMD con sideroblastos en anillo 2: SMD con displasia multilínea 3: SMD con del(5q) 4: SMD con exceso de blastos 5: SMD inclasificable
Antecedentes exposicionales	Según reporte en historia clínica	Cualitativa nominal	0: ausente 1: presente
Comorbilidades	Según reporte en historia clínica	Cualitativa nominal	0: ausente 1: presente
Requerimiento Transfusional	Según reporte en historia clínica	Cualitativa nominal	0: no 1: glóbulos rojos 2: plaquetas

Unidades de Glóbulos Rojos (UGRES)	Número de UGRES transfundidas durante el seguimiento	Cuantitativa continua	No aplica
Concentrado de Plaquetas (CUPS)	Número de CUPS transfundidos en el seguimiento	Cuantitativa continua	No aplica
Tratamiento	Intervenciones (diferentes de transfusiones) dirigidas al manejo de SMD	Cualitativa nominal	0: ninguna 1: factores estimulantes 2: agentes hipometilantes 3: inmunosupresores 4: lenalidomida 5: agentes citotóxicos 6: otros
Pronóstico	De acuerdo con la categoría IPSS-R calculada con los parámetros al momento del diagnóstico.	Cualitativa nominal	0: muy bajo 1: bajo 2: intermedio 3: alto 4: muy alto
Citopenia	Según parámetros de normalidad de la OMS: Hemoglobina < 12g/dL, Neutrófilos < 1800/ μ L y/o Plaquetas: <150000/ μ L	Cualitativa nominal	0: Anemia 1: Neutropenia 2: Trombocitopenia
Hemoglobina	Valor en g/dL	Cuantitativa continua	No aplica
Neutrófilos	Conteo por μ L	Cuantitativa continua	No aplica
Plaquetas	Conteo por μ L	Cuantitativa continua	No aplica
Volumen Corpuscular Medio	Valor en fL	Cuantitativa continua	No aplica
IPSS-R	Cálculo de acuerdo con el valor de hemoglobina, conteo de neutrófilos, conteo de plaquetas, porcentaje de blastos y cariotipo	Cuantitativa discreta	No aplica
Desenlace	Según último registro en la historia clínica	Cualitativa nominal	0: Vivo 1: Fallecimiento 2: Pérdida
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA			

Celularidad Médula Ósea	Porcentaje de células hematopoyéticas en biopsia de médula ósea en biopsia	Cuantitativa continua	0 – 100%
Fibrosis Médula Ósea	Aumento significativo en trama de reticulina y presencia de fibras colágenas: grado 2-3 (escala de 0 a 3) ó grados 3-4 (escala de 0 a 4)	Cualitativa nominal	0: ausente 1: presente
Línea Displásica	Línea mieloide con cambios morfológicos de displasia según reporte de extendido/biopsia médula ósea	Cualitativa nominal	0: diseritropoyesis 1: disgranulopoyesis 3: dismegacariopoyesis
Sideroblastos en Anillo	Presencia de precursores eritroides con 5 o más gránulos de hierro que comprometen 1/3 de la circunferencia nuclear de acuerdo con tinción de hierro en extendido de médula ósea	Cualitativa nominal	0: ausente 1: presente
Porcentaje de Blastos	Células hematopoyéticas mieloides CD34 y/o CD117 positivas en biopsia de médula ósea o citometría de flujo	Cuantitativa continua	0 – 100%
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS			
Expresión	Reactividad al anticuerpo por inmunohistoquímica	Cualitativa nominal	0: Ninguna 1: P53 2: EZH2 3: H3K27me3 4: ABCB7
Patrón de tinción	Compartimento celular reactivo al anticuerpo por inmunohistoquímica	Cualitativa nominal	0: núcleo 1: citoplasma 2: membrana celular
Intensidad de tinción		Cualitativa ordinal	0: negativo 1: débil 2: intermedio 3: intenso
Línea mieloide inmunorreactiva		Cualitativa nominal	0: eritroide 1: granulocítica 2: megacariocítica
Porcentaje de la línea reactiva		Cuantitativa continua	0 – 100%

5.6. Análisis estadístico: Las variables cualitativas se reportarán como frecuencias absolutas y las variables cuantitativas como promedios y desviación estándar. Para establecer las asociaciones de interés, se emplearán t-student, X^2 o coeficiente de relación de Pearson, de acuerdo con las características de las variables evaluadas. Se consideran los valores $p < 0.05$ como significativos.

Procedimientos:

Inclusión de los casos: se consultarán las biopsias y extendidos de médula ósea valorados en el Departamento de Patología del Hospital Universitario Nacional (HUN) entre 2017 y 2022, seleccionando los casos con hallazgos morfológicos compatibles con SMD y otros sin neoplasia hematolinfoide en estudio por citopenia. Se consultará la historia clínica de los casos seleccionados en el software HOSVITAL para determinar los antecedentes y diagnóstico definitivo, seleccionando aquellos con SMD y citopenia inexplicada persistente y de otras causas. Para la gestión de la información obtenida, se empleará el programa REDCap. Se realizarán estudios de inmunohistoquímica para P53, EZH2, H3K27me3 y ABCB7; los procedimientos se detallarán en los manuales de procedimientos basándose en las indicaciones del fabricante para cada anticuerpo, sin embargo, el esquema general es el siguiente: (91).

- Los especímenes incluidos en parafina serán cortados y montados en láminas, que serán puestas verticalmente en soportes.
- Las láminas serán calentadas por 20 minutos a 50 – 60°.
- El tejido se rehidratará previa remoción de la parafina: 3 baños de 5 minutos con reactivo aclarante, 2 baños de 5 minutos con etanol 100%, 1 baño de 5 minutos con etanol 90%, 1 baño de 5 minutos con etanol al 70% y 1 baño de 5 minutos con agua doblemente destilada. Cada una de las soluciones empleadas deben ser adecuadamente mezcladas, sumergiendo las láminas repetidamente en estas para evitar la formación de burbujas sobre las láminas
- Para la recuperación del epítipo, las láminas deben ser sumergidas en el buffer de recuperación de antígeno y calentadas en microondas hasta la ebullición durante 15 minutos. Posteriormente las láminas deben enfriarse en buffer de citrato durante 20 minutos.
- Las láminas serán lavadas en PBS durante 5 minutos (el procedimiento se repetirá previo cambio de la PBS).
- La peroxidasa endógena debe ser bloqueada sumergiendo las láminas en 0.3% H_2O_2 por 15 a 40 minutos a temperatura ambiente.
- Las láminas serán lavadas en PBS durante 5 minutos (el procedimiento se repetirá previo cambio de la PBS).
- La unión no específica a antígenos se bloquea cubriendo la totalidad del tejido con agente bloqueante de suero normal 10% (100 μ L-150 μ L por lámina) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Las láminas serán lavadas en PBS durante 5 minutos 2 veces (el procedimiento se repetirá previo cambio de la PBS).
- El anticuerpo primario será disuelto en agente bloqueante; con la solución resultante, se cubrirá el tejido para ser incubado en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente.
- Las láminas serán lavadas en PBS durante 5 minutos 3 veces (el procedimiento se repetirá previo cambio de la PBS cada vez).

- El anticuerpo secundario biotinilado será disuelto en agente bloqueante; la solución resultante se usará para cubrir el tejido para ser incubado en cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente.
- Las láminas serán lavadas en PBS durante 5 minutos 2 veces (el procedimiento se repetirá previo cambio de la PBS).
- El reactivo de amplificación (avidina-peroxidasa de rábano picante) será disuelto en reactivo bloqueante; con la solución resultante se usará para cubrir el tejido e incubarlo por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Las láminas serán lavadas en PBS durante 5 minutos 2 veces (el procedimiento se repetirá previo cambio de la PBS).
- Se preparará la solución de visualización añadiendo 500 µL de diaminobenzidina y 2.5 µL de 30% H₂O₂ a 50 mL de PBS pH 7.4. Con la solución resultante se incubarán las láminas.
- El tejido se lavará sumergiendo las láminas en agua doblemente destilada.
- Se hará contratinción con hematoxilina; posteriormente se realizará lavado de la lámina nuevamente con agua doblemente destilada.
- El tejido se deshidratará incubando las láminas en esta secuencia: 3 baños de 5 minutos cada uno con etanol 70%, 3 baños de 5 minutos cada uno con etanol al 90%, 3 baños de 5 minutos cada uno con etanol al 100% y 3 baños de 5 minutos con reactivo aclarante.
- Se agregarán 3 gotas de medio montaje y se pondrá el cubreobjetos con el tejido.

Los estudios serán interpretados por dos patólogos y la determinación de cada una de las variables en cada caso (patrón de tinción, intensidad de esta, línea inmunorreactiva y porcentaje de células de la línea reactiva), será hecha por consenso y empleando el software de patología digital QuPath 0.5.1. El porcentaje de células reactivas se establecerá mediante el conteo de al menos 300 células de la línea que tenga la expresión del marcador; se tendrá en cuenta el punto de corte de 1% como umbral de positividad, establecido en estudios previos para p53 (14).

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

- La realización del presente trabajo seguirá las recomendaciones promulgadas por el código de Núremberg, Declaración de Helsinki (Corea 2008), Informe Belmont y por la legislación Colombiana Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.
- Se obtendrá consentimiento informado de cada paciente para el uso de sus muestras, así como para la consulta de la información relevante (especificada en la tabla de variables) en su historia clínica. Se garantizará que la realización del estudio no agote la totalidad del material disponible, así como la conservación de la calidad de este. Las muestras en las que se realizará el estudio ya han sido obtenidas y en principio no se introduce ninguna modificación en las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales; sin embargo, en caso de encontrar resultados que de acuerdo con la evidencia disponible sean significativos para el pronóstico del paciente o que potencialmente impacten en su manejo, se dará aviso al paciente y profesional tratante para los fines pertinentes, siempre que se tenga la autorización del primero.
- Los pacientes serán contactados por correo electrónico y/o mediante comunicación telefónica empleando el siguiente libreto:
“Señor/Señora (nombre completo del paciente), usted está invitado a participar voluntariamente en un estudio de investigación médica. Si decide participar, se utilizará, con su autorización, una pequeña porción de su muestra de médula ósea. Esta muestra ya está

en custodia del Laboratorio de Patología del Hospital Universitario Nacional de acuerdo con el Código Sanitario Ley 9 de 1979, la Resolución 1995 de 1999 y otros protocolos establecen que las muestras de estos especímenes sean estudiadas y almacenadas por un periodo mínimo de 20 años.

Si está interesado en participar en este proyecto, a continuación se adjunta/se le hará llegar el formato de consentimiento informado, en el cual se explica en qué consiste la investigación y podrá manifestar su deseo de participar o no. Tenga en cuenta que su decisión en ningún momento va a afectar la continuidad de su atención o las condiciones de las muestras que estén bajo el cuidado del Laboratorio de Patología”.

- Los procedimientos de la investigación serán efectuados por personas calificadas.
- El estudio se realizará ajustado a otras normas científicas, técnicas y administrativas para la Investigación en Salud establecidas en los siguientes documentos regulatorios: Resolución 1995 de 1999, Resolución 001715 de 2005 (junio 13), CIOMS 1991, Resolución 3492 de 1998, Resolución 2935 de 2001 del ICA, Decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones, Decreto 309 del 2000 del Ministerio de Medio Ambiente, Buenas prácticas de laboratorio (BPL).
- El presente trabajo garantizará la seguridad de la información obtenida y su publicación, hasta la revisión por el comité editorial y los pares evaluadores.
- Las sustancias serán desechadas de acuerdo con las normas establecidas por el Hospital Universitario Nacional y se imprimirá la menor cantidad de papel posible para minimizar el impacto ambiental del trabajo.
- La información sólo se socializará con los investigadores. Las muestras biológicas e información clínica serán manejadas con códigos para mantener la seguridad y anonimato de los pacientes.

7. CRONOGRAMA

Descripción de la Actividad	Número de mes	Duración en meses
Elaboración del protocolo de investigación y anexos (consentimientos informados, protocolos técnicos, etc)	0	1
Selección de pacientes	2	1
Compra de insumos y reactivos	4	6
Entrenamiento del investigador en inmunohistoquímica	10	2
Realización de inmunohistoquímica en tejido de casos seleccionados	12	2
Análisis de resultados y realización de documento escrito.	14	2

8. PRESUPUESTO

La consecución de los recursos espera conseguirse por participación en convocatorias para acceder a recursos destinados a investigación.

Descripción	Valor
ABCB7 Polyclonal Antibody. Vial x 100uL. Marca Invitrogen	\$2,250,000.00
p53 Monoclonal Antibody. Vial x 500 uL. Marca Invitrogen	\$2,125,000.00
Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) Rabbit mAb. Marca Cell Signal	\$2,070,257.00
EZH2 (SP129) PAB	\$856,900.00
ultraView Universal DAB Detection Kit, Marca Roche	\$3,181,200.00
Label, Blank, Flap, 540 Roll	\$183,300.00
LCS	\$80,800.00
BLUING REAGENT	\$86,600.00
Hematoxylin II	\$122,600.00
CELL CONDITIONING SOLUTION, CC1, 2L	\$177,500.00
10X EZ PREP SOLUTION, 2L	\$201,900.00
10X SSC SOLUTION, 2L	\$111,500.00
Reaction Buffer Concentrate (10X)	\$115,400.00
Total	\$11,562,957.00

9. RESULTADOS

Se obtuvieron 1729 registros de estudio de médula ósea correspondientes a 1408 pacientes en un periodo comprendido entre 2017 y 2022. De estos registros, 1428 cuentan con biopsia.

En relación con la calidad de las muestras obtenidas, 966 cilindros (67.64%) tenían una longitud mínima de 1.5cm. Adicionalmente, en 197 (13.79%) casos se anotaron limitaciones para el estudio; estas limitaciones incluyeron escasa representación de médula ósea en la muestra, artificios por aspiración, compresión, fragmentación, pérdida de antigenicidad y artificios en la tinción de marcadores de inmunohistoquímica (ver anexo 1).

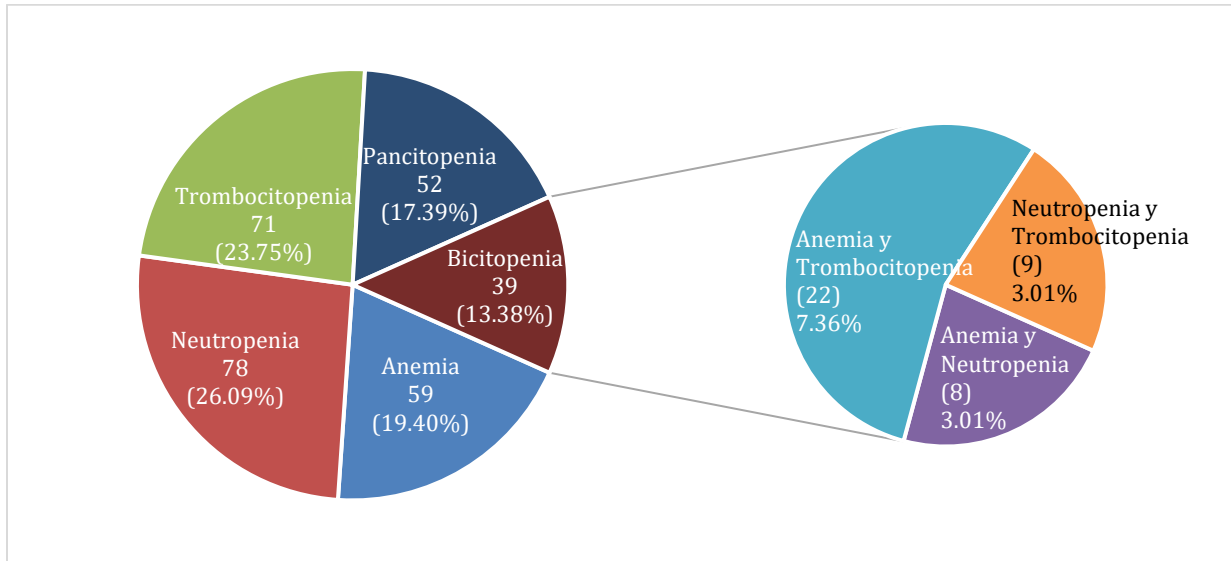
El promedio de edad de los pacientes a los que se les hizo estudio de médula ósea en la institución fue de 56.63 (17-96) años; de los 1406, 760 (54%) correspondieron a mujeres y 647 (46%) a hombres.

Respecto a la distribución de las entidades en el registro, estas se amplían en el anexo 2.

9.1. Características los casos con citopenia de causa no neoplásica

Se encontraron 314 (22.30%) pacientes que fueron estudiados por citopenia de origen no neoplásico. La edad media de estos pacientes fue de 57.69 (18-90) años. Respecto a la distribución por sexos, predominaron las pacientes femeninas con una relación hombre: mujer de 0.5:1.

De los pacientes estudiados por citopenia, en 15 no pudo determinarse la línea comprometida al consultar los registros disponibles en la historia clínica. De los 299 casos restantes, 141 presentaron anemia (47.15%), 148 neutropenia (49.49%) y 154 trombocitopenia (51.50%). Discriminando por el número de líneas comprometidas en cada caso, 208 comprometieron una sola línea (69.23%), 39 se presentaron como bicitopenia (13.37%) y 52 como pancitopenia (17.39%) (Ver gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución de las citopenias en el registro de pacientes con biopsia de médula ósea entre 2017 y 2022.

Los 314 casos estudiados por citopenia de origen no neoplásico contaron con estudio morfológico en aspirado de médula ósea. En 127 se reportaron cambios displásicos (40.44%) que fueron cuantificados solo en 25 casos, siendo significativos en 19 de estos (76%). En relación con el número de líneas comprometidas en los casos que presentaron displasia, 78 fueron unilínea (61.42%) y 49 multilínea (38.58%). Los hallazgos morfológicos específicos y sus frecuencias se resumen en la tabla 9.

Línea Mieloide		Línea Megacariocítica		Línea Eritroide	
Cambios displásicos	No.	Cambios displásicos	No.	Cambios displásicos	No.
<i>Cambios megaloblásticos</i>	30	<i>Hipolobulación</i>	35	<i>Cambios megaloblásticos</i>	58
<i>Hipogranularidad</i>	13	<i>Micromegacariocitos</i>	19	<i>Irregularidad nuclear</i>	2
<i>Pseudo Pelger-Huet</i>	5	<i>Hiperlobulación</i>	1	<i>Puentes de cromatina</i>	1
<i>Hipersegmentación</i>	2	<i>Hipogranularidad</i>	1	<i>Citoplasma deshilachado</i>	1
<i>Irregularidad nuclear</i>	2	<i>Núcleos separados</i>	1	<i>No especificados</i>	25
<i>Núcleo en dona</i>	1				
<i>Proyecciones nucleares</i>	1				
<i>Persistencia gránulos primarios</i>	1				

Tabla 9. Cambios displásicos documentados en los casos de citopenia de origen no neoplásico

Respecto al estudio por biopsia de médula, este estuvo disponible en 290 casos de citopenia de origen no neoplásico (92.35%); 190 de estos casos contaron con un cilindro óseo de longitud superior a 1.5 cm (65.51%). La celularidad documentada fue muy variable, con un rango de 0 a 100% y un promedio de 53.75% con una desviación estándar de 23.81%; en 29 casos se documentó una celularidad menor al 30%.

Las causas fueron determinadas consultando las historias clínicas de los pacientes estudiados y registradas de acuerdo con el concepto emitido por el tratante especialista en hematología, en correlación con la clínica y las otras ayudas diagnósticas. Para efectos del

registro, se clasificaron de acuerdo con el número y línea(s) hematopoyética(s) comprometida(s). Los hallazgos se resumen en las tablas 10 a 12. Los casos en los que se perdió el seguimiento del paciente sin concluir el abordaje diagnóstico fueron excluidos, así como aquellos en los que no se encontró registro clínico disponible.

9.1.1. Anemia

Se encontraron 59 casos de anemia; la edad media de los pacientes 60.39 años, con un rango entre 20 y 89 años. La mayor parte de los pacientes fueron mujeres, con una razón hombre: mujer de 0.2:1.

Se completó el estudio etiológico en 44 de los 59 casos. Las etiologías documentadas en el registro se clasificaron en carenciales, por Enfermedad Renal Crónica (ERC), autoinmunes, hemorragia e hiperesplenismo por hipertensión portal. En los casos asociados con autoinmunidad, se encontraron 14 casos de anemia hemolítica autoinmune, 5 de los cuales ocurrieron en contexto de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y 1 en contexto de Esclerosis Sistémica. Los otros casos asociados con enfermedad autoinmune, atribuidos a anemia de inflamación crónica (conocida previamente como anemia de enfermedad crónica), ocurrieron en 4 pacientes con antecedente de LES, 1 con Artritis Reumatoide (AR), 1 con Vasculitis mediada por ANCA y 1 con Colangitis Biliar Primaria.

De estos 43 casos de anemia, 15 presentaron displasia en el aspirado de médula ósea (34.88%): 5 de los 12 casos de etiología carencial, 9 de los 22 casos de etiología autoinmune, 1 de los 5 casos de ERC y el caso de hiperesplenismo asociado a hipertensión portal. 41 casos contaban con biopsia de médula ósea disponible, cuya celularidad varió entre el 10 y el 100%, con una media de 51.66%.

9.1.2. Neutropenia

Se encontraron casos de 78 de neutropenia; la edad media de los pacientes fue 52.64 años, significativamente menor a la de los pacientes estudiados por anemia ($p=0.011$), con un rango entre 18 y 84 años. La mayor parte de los pacientes fueron mujeres, con una razón hombre: mujer de 0.2:1.

El estudio etiológico se completó en 66 de los 78 casos; estos fueron clasificados de acuerdo con su etiología en medicamentosa, autoinmunidad, carencial, infecciosa y citopenia inexplicada; en esta última categoría se incluyeron los pacientes que en sus registros clínicos fueron diagnosticados con ICUS, Neutropenia Crónica Benigna, Neutropenia Étnica y aquellos con neutropenia transitoria o neutropenia en seguimiento.

De los 4 casos reportados de neutropenia medicamentosa, uno fue asociado a uso de anti-IL17 en un paciente con antecedente de psoriasis, otro fue diagnosticado en un paciente con LES en manejo con cloroquina, Rituximab y ciclosporina, y otro se atribuyó al uso de leflunomida en un paciente con AR. Del cuarto caso no se tiene más información clínica. En relación con los 15 casos asociados con autoinmunidad, la etiología más frecuente fue la AR, con 8 casos; otras causas relacionadas fueron Síndrome de Sjögren (3 casos), LES, Enfermedad Mixta de Tejido Conectivo y Síndrome Antifosfolípidos (1 caso de cada una). Se encontraron 2 casos de etiología infecciosa, uno asociado con sífilis y otro en un paciente con histoplasmosis diseminada en el contexto de infección por VIH.

De estos 66 casos de neutropenia, 62 contaron con biopsia de médula ósea disponible, cuya celularidad reportada varió entre el 10 y el 80%, con una media de 41.35%. De manera interesante, en 14 de los 44 casos clasificados en el grupo de citopenia inexplicada se documentó

algún grado de displasia, incluyendo 5 pacientes diagnosticados con ICUS, 2 pacientes con Neutropenia Crónica Benigna, 2 pacientes con Neutropenia Étnica, 3 pacientes con neutropenia transitoria y 2 pacientes sin diagnóstico específico. Las características de este grupo de pacientes se amplían más adelante.

9.1.3. Trombocitopenia

Se encontraron casos de 71 de trombocitopenia; el rango de edad fue de 19 a 89 años, con una edad media de 58.66 años, similar a la de los pacientes estudiados por anemia, pero significativamente mayor a la de los pacientes estudiados por neutropenia ($p=0.046$). A diferencia de los casos de anemia y trombocitopenia, la distribución por sexos fue igual con una razón hombre: mujer de 1:1.

En 61 de los 71 casos se completó el abordaje etiológico; las causas fueron hiperesplenismo por hipertensión portal, autoinmunidad, infecciosas, carenciales, Púrpura Trombocitopénica Trombótica, pseudotrombocitopenia y con citopenia inexplicada persistente.

La autoinmunidad fue la etiología más frecuentemente documentada (77.1%), principalmente representadas por la Trombocitopenia Inmune Primaria (PTI) (62.29% del total de las causas de trombocitopenia); los casos asociados con autoinmunidad diferentes de PTI incluyeron Síndrome Antifosfolípidos (2 casos), LES (3 casos), AR, Enfermedad de Still, Esclerodermia y trombocitopenia inmune inducida por meropenem (1 caso cada uno).

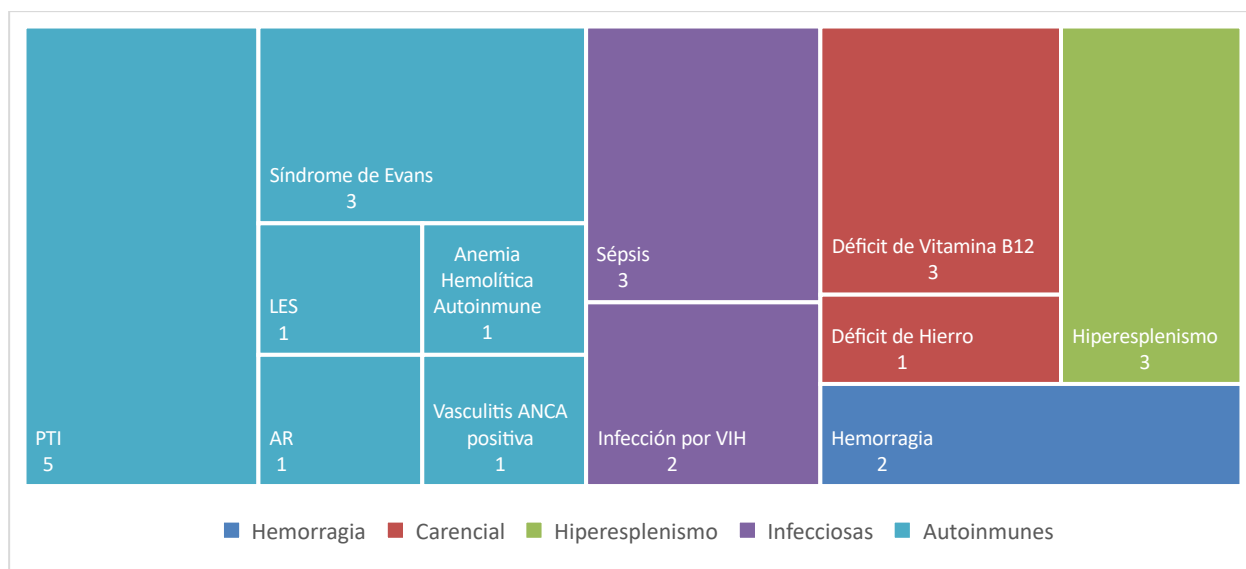
Solo se encontraron 3 casos con citopenia inexplicada persistente, de los cuales 1 fue diagnosticado como ICUS; los otros dos casos no fueron clasificados específicamente en ninguna entidad. Las características de este grupo de pacientes se amplían más adelante.

Se observó algún grado de displasia en el aspirado de médula ósea en 23 de los 61 casos incluidos: 11 de los 39 casos de PTI, 5 de los 9 casos asociados con autoinmunidad diferentes de PTI (incluyendo el caso de trombocitopenia inmune inducida por meropenem), los 3 casos asociados con sépsis, 2 de los 3 casos con citopenia inexplicada persistente (incluyendo el caso de ICUS), 1 de los 4 casos asociados con hiperesplenismo y el caso de Púrpura Trombocitopénica Trombótica. Todos los casos contaron con biopsia de médula ósea; la celularidad varió entre 10-70% con un promedio de 46.82%.

9.1.4. Bicitopenia

Se documentaron 40 casos de bicitopenia, con un rango de edad de 22 a 90 años y una edad promedio de 56.87 años. La distribución por sexos mostró un predominio de pacientes femeninos, con una relación hombre: mujer de 0.6:1. En relación con las líneas comprometidas, la mayor parte de casos fueron de anemia-trombocitopenia (22 casos), seguidos por los casos de anemia-neutropenia y neutropenia-trombocitopenia (9 casos de cada uno).

Se encontraron 18 casos de anemia y trombocitopenia con estudio etiológico completo. La mayor parte de los casos fueron de origen multifactorial (ver tabla 11); sin embargo, si se discriminan los datos por entidades individuales, la mayoría de los casos involucraron enfermedades autoinmunes (11, 61.11%), incluyendo PTI, anemia hemolítica autoinmune, LES, AR y vasculitis ANCA positiva. Siguió en frecuencia las etiologías infecciosas (5) y carenciales (4) (ver gráfica 2); entre las causas infecciosas, se documentaron 3 asociadas con sepsis y 2 ocurridas en contexto de infección por VIH.



Gráfica 2. Contribución de cada entidad a las causas de bicitopenia con anemia y trombocitopenia. PTI: Púrpura Trombocitopénica Inmune. AR: Artritis Reumatoide

Se documentaron 8 casos de anemia y neutropenia, de los cuales fueron excluidos 4 por pérdida. De forma interesante, de los 4 casos restantes, en 1 se atribuyó la anemia a una causa secundaria (ferropenia), mientras que la neutropenia fue clasificada como ICUS; los otros casos fueron atribuidos a autoinmunidad (LES), medicamentos (Adalimumab) y ferropenia.

De los 9 casos de neutropenia y trombocitopenia, se excluyeron 3 casos por pérdida. De los 6 casos restantes, 2 se asociaron a compromiso hematológico por LES, mientras que los casos restantes se asociaron con medicamentos (cloroquina, en un paciente en manejo por AR), sépsis, hiperesplenismo por hipertensión portal e ICUS (1 caso de cada uno).

Anemia (n=44)*			Neutropenia (n=66)**			Trombocitopenia(n=61)***		
Causa	#	%	Causa	#	%	Causa	#	%
Carencial	13	29.6	Medicamentosa	4	6.1	Hiperesplenismo por Hipertensión portal	4	6.6
Hierro	6		Autoinmunidad	15	22.7	Autoinmunidad	47	77.1
Vitamina B12	3		Citopenia Inexplicada	44	66.7	Asociada con autoinmunidad	8	
Hierro y Vitamina B12	2		ICUS	13		Trombocitopenia Inmune Primaria	38	
Ácido Fólico y Vitamina B12	2		Neutropenia Crónica Benigna	12		Trombocitopenia Inmune Inducida por Meropenem	1	
Enfermedad Renal Crónica	5	11.4	Neutropenia Étnica Benigna	5		Infecciosa (sépsis)	3	4.9
Autoinmunidad	22	50.0	Neutropenia Transitoria Sin diagnóstico	6		Citopenia Inexplicada	3	4.9
Anemia Hemolítica Autoinmune	15		Carencial (Vitamina B12)	1	1.5	ICUS Sin diagnóstico	1	
No hemolítica asociada con autoinmunidad	7		Infecciosa	2	3.0	Pseudotrombocitopenia	2	3.3
Hemorragia	3	6.8			Carencial (Vitamina B12)	1	1.6	
Hiperesplenismo por Hipertensión portal	1	2.2			Púrpura Trombocitopénica Trombótica	1	1.6	

Tabla 10. Causas de citopenia de una línea de origen no neoplásico. *Se excluyeron 15 casos de anemia por pérdida o desconocimiento de historia clínica. ** Se excluyeron 12 casos de neutropenia por pérdida o desconocimiento de historia clínica. *** Se excluyeron 10 casos de trombocitopenia por pérdida o desconocimiento de historia clínica

En relación con los hallazgos morfológicos en los casos de bicitopenia, se reportó displasia en 12 de los 29 casos estudiados (41.37%), incluyendo aquellos de etiología autoinmune (6), carencial (2), sépsis (1) y medicamentosa (1). Este último caso fue asociado con uso de Adalimumab en un paciente con colitis ulcerativa; los cambios observados fueron hipogranularidad y cambios megaloblásticos de la serie eritroide.

Los 29 casos incluidos contaron con biopsia de médula ósea, cuya celularidad varió entre el 10 y el 100%, con una celularidad media de 55.8%.

9.1.5. Pancitopenia

Se encontraron 52 casos de pancitopenia, con una edad media de 60.11 (21-81) años y una distribución similar entre sexos, con una relación hombre:mujer fue de 0.9:1. Los pacientes estudiados por pancitopenia presentaron una edad significativamente mayor respecto a los estudiados por neutropenia, pero no respecto a los estudiados por anemia y trombocitopenia.

De los 52 casos de pancitopenia, se excluyeron 17 casos por pérdida en el seguimiento. De los pacientes restantes, las etiologías documentadas fueron clasificadas en autoinmunes, carenciales, infecciosas, hiperesplenismo por hipertensión portal y medicamentosas (Ver tabla 12). Dentro de las causas infecciosas, se documentaron 5 casos de infección por VIH, dos de los cuales presentaron histoplasmosis y tuberculosis asociada, respectivamente. En relación con los hallazgos en el estudio por aspirado de médula ósea, 18 pacientes presentaron cambios displásicos (47.36%), incluyendo los 5 casos de autoinmunidad, 4 casos de etiología infecciosa (2 asociadas con infección por VIH y 2 asociadas con sépsis), 4 casos de hiperesplenismo por hipertensión portal, 2 casos de toxicidad por metrotexate y 3 casos de déficit de vitamina B12.

La biopsia de médula ósea estuvo disponible en 51 casos, con una celularidad media de 58.33% con un rango entre 10% y 90.

Anemia y Trombocitopenia (n=18)*			Anemia y Neutropenia (n=4)**		Neutropenia y Trombocitopenia(n=6)***	
Causa	#	%	Causa	#	Causa	#
Multifactorial	8	44.4	Multifactorial (ICUS y carencial)	1	Autoinmunidad	2
PTI y Hemorragia	2		Medicamentosa (Adalimumab)	1	Medicamentos (Cloroquina)	1
PTI y Carencial	3		Autoinmune (LES)	1	Hiperesplenismo por hipertensión portal	1
Hiperesplenismo por hipertensión portal y carencial	1		Carencial (Hierro)	1	ICUS	1
Anemia hemolítica autoinmune y microangiopatía trombótica	1				Infecciosas (sépsis)	1
Vasculitis ANCA positiva, hiperesplenismo por hipertensión portal y sépsis de origen urinario	1					
Autoinmune	5	27.8				
Síndrome de Evans	3					
Asociada con autoinmunidad	2					
Infecciosa	4	22.2				

Hiperesplenismo por hipertensión portal	1	5.6			
---	---	-----	--	--	--

Tabla 11. Causas de bicitopenia de origen no neoplásico. *Se excluyeron 4 casos de anemia y trombocitopenia por pérdida o desconocimiento de historia clínica. ** Se excluyeron 4 casos de anemia y neutropenia por pérdida o desconocimiento de historia clínica. *** Se excluyeron 3 casos de trombocitopenia por pérdida o desconocimiento de historia clínica

9.2. Características de los casos de citopenia inexplicada persistente

Se estudiaron 34 casos con causas secundarias descartadas. Estos 34 casos incluyeron 30 con neutropenia, 3 con trombocitopenia y 1 caso de neutropenia asociada con trombocitopenia; dentro de los casos de neutropenia, se incluyó un caso asociado a anemia cuya etiología fue hemorragia uterina anormal.

La edad media de estos pacientes fue de 52.97 (23-81 años), la cual no fue significativamente diferente de la media de pacientes valorados por citopenia con causas secundarias ($p=0.38$). La razón hombre: mujer fue 0.36.

Los hallazgos morfológicos en el aspirado de médula ósea incluyeron displasia en 11 de los 34 casos (20.37%). De forma llamativa, en uno de los casos se reportaron casos displásicos mayores al 10% de la línea mieloide. Los hallazgos de displasia documentados y sus frecuencias se resumen en la tabla 13.

Pancitopenia (n=35)*		
Causa	#	%
Autoinmune	5	14.3
Artritis reumatoide	1	
Síndrome de superposición	1	
Lupus Eritematoso Sistémico	2	
Anemia perniciosa	1	
Carencial	5	14.3
Vitamina B12	3	
Ácido fólico	1	
Vitamina B12 y Hierro	1	
Infeciosa	10	28.6
Infección por VIH	5	
Sépsis	3	
Tuberculosis	2	
Hiperesplenismo por hipertensión portal	9	25.7
Medicamentosa	6	17.1
Metrotexate	3	
Azatioprina	3	

Tabla 12. Causas de pancitopenia de origen no neoplásico. *Se excluyeron 17 casos por pérdida o desconocimiento de historia clínica.

Línea Mieloide		Línea Megacariocítica		Línea Eritroide	
Cambios displásicos	No.	Cambios displásicos	No.	Cambios displásicos	No.
Cambios megaloblásticos	1	Hipolobulación	6	Cambios megaloblásticos	4
Hipogranularidad	4	Micromegacariocitos	1	No especificados	1
Hiposegmentación	1				
No especificado	1				

Tabla 13. Cambios displásicos reportados en pacientes con citopenia inexplicable persistente

La biopsia de médula ósea estuvo disponible en 30 de los casos. La celularidad reportada varió entre 20 y 80%, con una media de 39.83, sin diferencia significativa respecto a los casos de citopenias con causas secundarias ($p=0.25$). En 4 de los casos se reportó hiperplasia de la línea eritroide, en 3 se reportó hipoplasia de la línea mieloide; los casos restantes (23, 76.66%), no reportaron alteraciones morfológicas mayores.

De los casos de neutropenia, 12 fueron diagnosticados como ICUS, 11 fueron diagnosticados como Neutropenia Crónica Benigna y 7 no recibieron diagnóstico específico; no se incluyeron casos Neutropenia Étnica Benigna o Neutropenia Transitoria. De los 3 casos de trombocitopenia, 1 fue clasificado como ICUS y los otros 2 no recibieron diagnóstico específico. El caso de neutropenia asociada con trombocitopenia fue diagnosticado como ICUS. Los hallazgos del cuadro hemático al momento de la toma de biopsia de médula ósea fueron documentados; estos datos se resumen en las tablas 14 y 15.

	Hb (g/dL)	WBC (#/ μ L)	Neu (#/ μ L)	Pltas (#/ μ L)
Promedio	14.71	3467.05	1391.44	232970.58
Mediana	14.65	3365	1290	253000
Moda	14.5	3620	1400	253000
Desviación Típica	1.82	879.08	745.75	70703.60
Rango	9.4	4670	4290	300000
Mínimo	8.6	2190	680	38000
Máximo	18	6860	4970	338000

Tabla 14. Hallazgos en el cuadro hemático de los pacientes con citopenia con causas secundarias descartadas. Hb: hemoglobina. WBC: conteo de glóbulos rojos. Neu: conteo de neutrófilos. Pltas: conteo de plaquetas.

Se tuvo acceso al reporte de cariotipo en 17 de los 34 casos, ninguno de los cuales mostró alteraciones citogenéticas.

En relación con la clínica de los pacientes, la mayor parte de los pacientes se presentó asintomático al momento de la primera valoración y la citopenia fue detectada incidentalmente (28 casos, 82.35%). Solo 6 (17.64%) pacientes reportaron antecedentes exposicionales, incluyendo 4 casos de tabaquismo y 2 casos de yodoterapia por carcinoma de tiroides. Por el contrario, la mayor parte de los pacientes informó comorbilidades de importancia (70.58%); estas y sus frecuencias se informan en la tabla 16.

	Hb (g/dL)	WBC (#/ μ L)	Neu (#/ μ L)	Pltas (#/ μ L)
Promedio	14.56	3286.66	1217.3	253266.66
Mediana	14.55	3235	1230	259000
Moda	14.5	3620	1400	253000
Desviación Típica	1.82	602.42	323.12	44392.39
Rango	9.4	2710	1090	184000

Mínimo	8.6	2190	680	154000
Máximo	18	4900	1770	338000

Tabla 15. Hallazgos en el cuadro hemático de los pacientes con citopenia con causas secundarias descartadas excluyendo casos de trombocitopenia y neutropenia asociada con trombocitopenia. Hb: hemoglobina. WBC: conteo de glóbulos rojos. Neu: conteo de neutrófilos. Pltas: conteo de plaquetas.

Comorbilidades	No.	%
Hipertensión arterial	7	20.6
Prediabetes	3	8.8
Hipotiroidismo	6	17.6
Hipertiroidismo	1	2.9
Dislipidemia	2	5.9
EPOC	1	2.9
TAB	1	2.9
HUA	1	2.9
SAHOS	1	2.9
Dermatitis atópica	1	2.9
Carcinoma de tiroides	1	2.9
Parkinson	1	2.9

Tabla 16. Comorbilidades reportadas por los pacientes con citopenia con causas secundarias descartadas. Los porcentajes fueron reportados en relación con la población completa (n=34). EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. TAB: trastorno afectivo bipolar. HUA: hemorragia uterina anormal. SAHOS: síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño.

Se encontró reporte de seguimiento clínico disponible en 24 de los pacientes, en ninguno de los cuales se reportó fallecimiento, requerimiento de transfusiones o tratamiento farmacológico.

9.3. Características de los casos de SMD

Se encontraron 40 casos con SMD. Los diagnósticos más frecuentes fueron las categorías de alto riesgo (Exceso de Blastos Tipo 1 y 2), de las que en total se encontraron 18 casos (45%); de las categorías de bajo riesgo (del(5q), sideroblastos en anillo y displasia de una línea), se encontraron 9 casos (22.5%). La distribución de los diagnósticos de SMD se resumen en la gráfica 3.

La edad de los pacientes con diagnóstico de SMD varió entre 34 y 89 años, con un promedio de 71.62 años. El 62.5% correspondieron a hombres y el 37.5% a mujeres, con una razón hombre: mujer de 1.7:1.

En 31 de los individuos (77.5%) se documentaron antecedentes, los cuales se resumen en la tabla 17. Las comorbilidades más frecuentemente documentadas fueron hipertensión arterial, enfermedad renal crónica, enfermedad cardiovascular aterosclerótica (incluyendo enfermedad arterial periférica y enfermedad coronaria) y cardiopatías (2 casos de cardiopatía isquémica, 2 de cardiopatía valvular y 1 de cardiopatía dilatada). Dos de los pacientes del registro tenían antecedente de autoinmunidad (LES y AR).

De los 40 pacientes con SMD, en 22 se encontró algún antecedente exposicional de importancia (55%): 14 pacientes reportaron tabaquismo, 6 combustión de biomasa y 2 consumo de alcohol.

Comorbilidades	No.	%
Hipertensión arterial	22	55
Diabetes mellitus Tipo 2	2	5
Hipotiroidismo	2	5
Gota	2	2.5
EPOC	4	10
SAHOS	1	2.5
Carcinoma de tiroides	1	2.5
Carcinoma de próstata	2	5
Demencia	2	5
Fibrilación auricular	3	7.5
Cardiopatía	5	12.5
ECV	5	12.5
ERC	6	15
TEV	3	7.5
Autoinmunidad	2	5

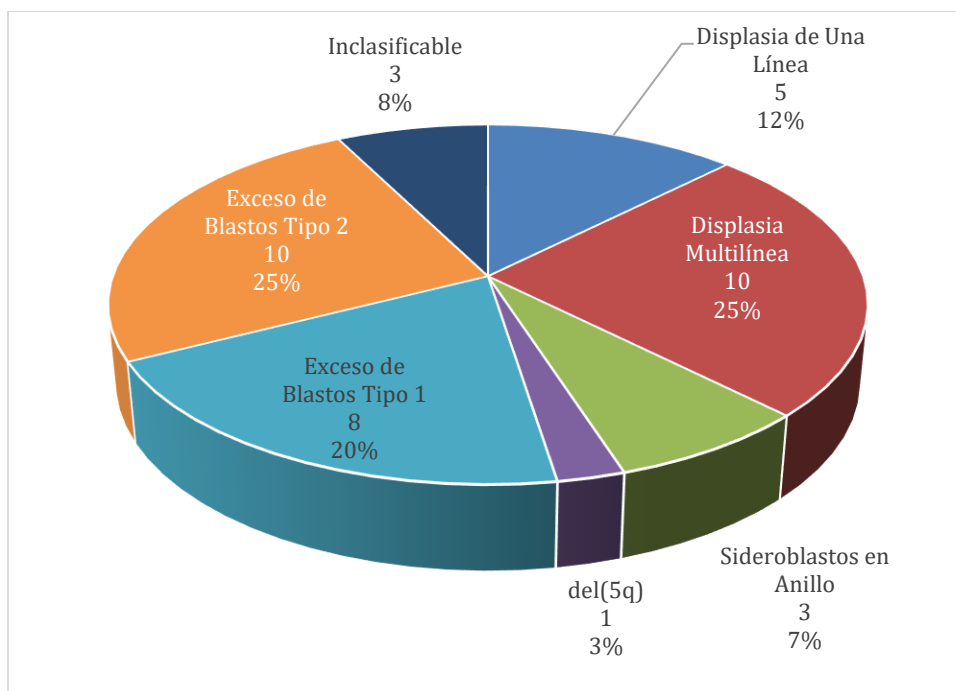
Tabla 17. Comorbilidades reportadas por los pacientes con SMD. Los porcentajes fueron reportados en relación con la población completa (n=40). EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. SAHOS: síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño. ECV: enfermedad cardiovascular aterosclerótica. ERC: enfermedad renal crónica. TEV: tromboembolismo venoso.

En relación con la clínica de los pacientes, 29 reportaron algún síntoma al momento de la primera valoración; los síntomas más frecuentes fueron astenia y adinamia (18, 62.06%), seguidos por pérdida de peso (6, 20.68%) y hemorragia (4, 13.79%).

Los hallazgos en el cuadro hemático de los pacientes se resumen en la tabla 18; 10 individuos (25%) cursaron con citopenia de una sola línea, mientras que 16 (40%) se presentaron con bicitopenia y 14 (35%) con pancitopenia respectivamente. Respecto a las líneas afectadas, la trombocitopenia y anemia fueron las más frecuentes (ver Gráfica 4).

Todos los individuos (40) contaron con registro de aspirado de médula ósea; 33 (82.5%) tuvieron estudio por biopsia de médula ósea disponible y 19 (47.5%) reporte de cariotipo.

En 3 de los casos no se reportaron cambios displásicos en el aspirado de médula ósea. De los 37 casos restantes, la displasia comprometió una línea en 17 (45.94%), dos líneas en 13 (35.14%) y tres líneas en 7 (18.92%). Los cambios displásicos reportados y sus frecuencias se resumen en la tabla 19.



Gráfica 3. Distribución de SMD encontrados en el registro de acuerdo a las categorías de la OMS 2017.

	Hb (g/dL)	VMC (fL)	WBC (#/ μ L)	Neu (#/ μ L)	Pltas (#/ μ L)
Promedio	9.83	94.72	3517.43	1567.71	149564.10
Mediana	9.3	91.6	2480	1270	77000
Moda	7.9	91	24440	1270	63000
Desviación Típica	3.02	9.17	3793.95	1416.92	236597.79
Rango	12.3	38.7	23530	6867	1198000
Mínimo	5.1	73.4	910	220	2000
Máximo	17.4	112.1	24440	7087	1200000

Tabla 18. Hallazgos en el cuadro hemático de los pacientes con SMD. Hb: hemoglobina. WBC: conteo de glóbulos rojos. Neu: conteo de neutrófilos. Pltas: conteo de plaquetas.

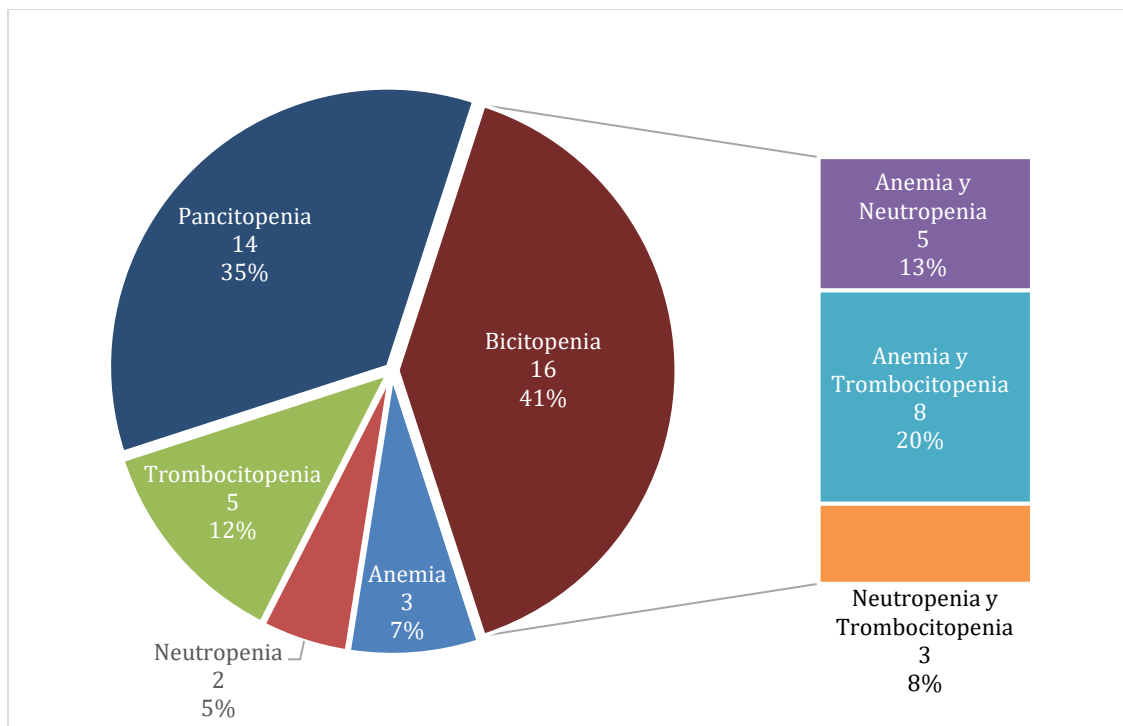
Línea Mieloide		Línea Megacariocítica		Línea Eritroide	
Cambios displásicos	No.	Cambios displásicos	No.	Cambios displásicos	No.
Segmentados hipogranulares	20	Hipolobulación	7	Cambios megaloblásticos	10
Pseudo Pelger-Huet	6	Micromegacariocitos	6	Irregularidad nuclear	4
Hiposegmentados	4	No especificado	2	Sideroblastos en anillo	3
Macropolicitos	2			Puentes de cromatina	1
Cambios megaloblásticos	2			No especificados	12
No especificado	5				

Tabla 19. Cambios displásicos reportados en pacientes con SMD

La celularidad de los casos varió entre el 10% y el 90%, con un promedio de 61.6%; se

observaron 2 casos con hipoplasia (celularidad <30%) en dos pacientes clasificados con SMD con exceso de Blastos tipo 2 y displasia multilínea, respectivamente; ninguno de estos dos pacientes había requerido soporte transfusional ni manejo quimioterapéutico, sin embargo, se desconoce el desenlace del caso con exceso de blastos tipo 2 por pérdida del seguimiento.

Por otro lado, se encontró fibrosis significativa (MF ≥ 2) en 6 casos. Se trató de 1 caso clasificado como displasia multilínea, 3 casos con exceso de blastos y 2 casos inclasificables. El caso con displasia multilínea fue clasificado en riesgo muy bajo (IPSS-R 1) y se encontraba en seguimiento con manejo de sostén, sin embargo, su desenlace se desconoce. De los casos con exceso de blastos, uno fue clasificado como alto riesgo (IPSS-R 5) y falleció; otro, igualmente clasificado en alto riesgo (IPSS-R 6), continuaba vivo, pero en manejo quimioterapéutico y el tercero fue clasificado en riesgo intermedio (IPSS-R 4) pero su desenlace se desconoce. Los dos pacientes con SMD inclasificable estaban en manejo con talidomida y corticoide, uno de estos continuaba vivo al momento del estudio y del otro se desconoce su desenlace.



Gráfica 4. Distribución de las citopenias por línea y número de líneas comprometidas en pacientes con SMD

En ninguno de los pacientes hubo estudios moleculares disponibles; de los pacientes con citogenética disponible (19 casos), el cariotipo normal fue el más frecuente (13 casos, correspondientes al 68.42% de los casos con cariotipo disponible); no se encontraron alteraciones cariotípicas de los subgrupos pronósticos pobre o muy pobre. Los hallazgos citogenéticos encontrados se consolidan en la tabla 20.

del(11)(q14)	Muy Bueno
--------------	-----------

del(11)(q13)	Muy Bueno
del(20)(q11.2)	Bueno
del(5q)	Bueno
del(6p)	Intermedio
-Y	Muy Bueno
+8	Intermedio

Tabla 20. Alteraciones cariotípicas documentadas en los pacientes con SMD.

24 pacientes (60%) estuvieron en tratamiento farmacológico, la mayor parte de estos (18 casos) con algún tipo de agente estimulante de la hematopoyesis (eritropoyetina, filgastrim, pegfilgastrim o eltrompopag); 13 casos recibieron agentes hipometilantes y/o antimetabolitos; 11 de estos pacientes eran parte del grupo de mayor riesgo (categorías IPSS-R intermedio, alto y muy alto); las características de este grupo de pacientes se resumen en la tabla 21.

Otros tratamientos incluyeron danazol (2 individuos) y talidomida (2 individuos).

En lo que respecta al pronóstico, 17 (42.5%) de los casos se clasificaron en el grupo de menor riesgo (IPSS-R Muy Bajo y Bajo), de los cuales 5 sobrevivieron, 2 fallecieron y los restantes se perdieron en el seguimiento. Los 23 (57.5%) casos restantes estaban en el grupo de mayor riesgo (IPSS-R Intermedio, Alto y Muy Alto), de estos 4 fallecieron, 5 sobrevivieron y los restantes se perdieron en el seguimiento.

Las características de cada uno de los individuos incluidos en el estudio se resumen en la Tabla 22.

En comparación con los pacientes con citopenias de causas secundarias descartadas, los pacientes con SMD con mayor frecuencia fueron hombres, con una edad media mayor, una celularidad media mayor, menores valores de hemoglobina, mayores valores de VCM y menores conteos plaquetarios. De la misma forma, estos pacientes se asociaron con la presencia de cariotipo anormal, requerimiento de transfusiones y requerimiento de tratamiento farmacológico, así como mayor sintomatología relacionada con citopenias y antecedentes exposicionales de importancia (Ver tablas 23 y 24).

9.4. Expresión de P53, EZH2 y H3K27me3 en biopsia de médula ósea de pacientes con SMD

Se hicieron estudios de inmunohistoquímica en 18 biopsias de médula ósea, correspondientes a 15 pacientes con diagnóstico de SMD (3 de los pacientes contaban con 2 muestras tomadas en momentos diferentes); se incluyeron igualmente 5 muestras con otros diagnósticos: un caso de LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, un caso de Neoplasia Mielodisplásica/Mieloproliferativa NOS (MDS/MPN-NOS), un caso de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y dos casos en seguimiento por sospecha de SMD. Los marcadores empleados fueron P53 (DO-7), EZH2 (D2C9) y H3K27me3 (C36B11); se excluyó ABCB7 en consideración de que no se encontró material disponible en ninguno de los tres casos de SMD con sideroblastos en anillo. Además del análisis conjunto por parte de dos patólogos, se empleó la herramienta QuPath 0.5.1 para objetivar la positividad e intensidad de tinción.

SMD (OMS 2017)	Citopenia	Transfusiones	IPSS-R	Desenlace	Tratamiento
Displasia Multilínea	Bicitopenia	SÍ	3 (Bajo)	Pérdida	Azacitidina
Displasia Multilínea	Bicitopenia	NO	3.5 (Intermedio)	Vivo	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 1	Pancitopenia	SÍ	4.5 (Intermedio)	Pérdida	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 1	Pancitopenia	SÍ	6 (Alto)	Fallecimiento	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 1	Bicitopenia	SÍ	4.5 (Intermedio)	Vivo	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 2	Bicitopenia	NO	4 (Intermedio)	Pérdida	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia	SÍ	7 (Muy Alto)	Pérdida	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 2	Bicitopenia	SÍ	7.5 (Muy Alto)	Pérdida	Citarabina
Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia	SÍ	7 (Muy Alto)	Pérdida	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia	SÍ	5.5 (Alto)	Pérdida	Citarabina + Idarubicina. Azacitidina. Candidato a trasplante
Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia	SÍ	7 (Muy Alto)	Fallecimiento	Azacitidina
Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia	SÍ	6 (Alto)	Vivo	Azacitidina. Tioguanina
Inclasificable. Displasia de una línea y pancitopenia	Pancitopenia	SÍ	2 (Bajo)	Pérdida	Azacitidina

Tabla 21. Características de los pacientes en manejo con agentes hipometilantes y/o antimetabolitos.

9.4.1. Caracterización de la expresión por inmunohistoquímica de P53

Teniendo en cuenta el punto de corte de 1% con tinción intensa (+3), se encontraron dos casos positivos: uno con diagnóstico de SMD y otro en seguimiento con sospecha, pero sin diagnóstico de SMD. Adicionalmente, en cuatro de los casos interpretados como negativos se observó algún grado de tinción; en dos fue únicamente tenue (+1) y menor al 1%, mientras que en los otros dos superó el 1% sin embargo fue predominantemente tenue/intermedia (<3+). La tinción en todos los casos fue nuclear y en la línea mieoide.

En los demás casos no se observó ningún grado de tinción (ver figuras 11, 12 y 13).

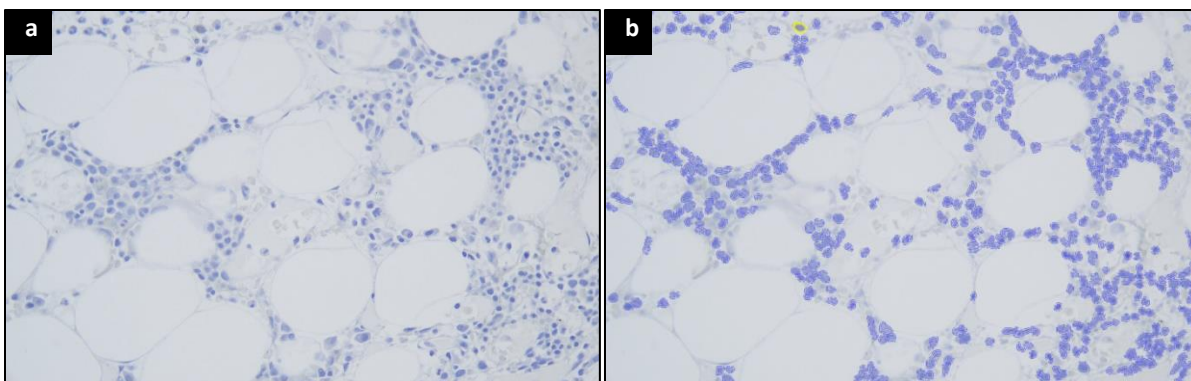


Figura 11. Caso negativo para P53. 0.21% de la celularidad positiva con tinción tenue (+1), resaltada con amarillo en la imagen b.

Como se mencionó previamente, uno de los casos interpretados como positivos contaba con diagnóstico de SMD (Ver Figura 14); se trató de un paciente masculino de 86 años clasificado como SMD con Exceso de Blastos Tipo I, con conteo de blastos de 6% e IPSS-R 4.5 (Intermedio). El paciente estaba en seguimiento por pancitopenia, con hemoglobina de 5.8 g/dL, neutrófilos en 230/ μ L y plaquetas en 21000/ μ L; había requerido múltiples transfusiones, al menos 9 UGRE, 1 CUPS de plaquetas y además estaba en manejo con EPO y azacitidina. De forma interesante, el cariotipo mostró del(11)(q13), del grupo de muy buen pronóstico. Se desconoce el desenlace por pérdida en el seguimiento.

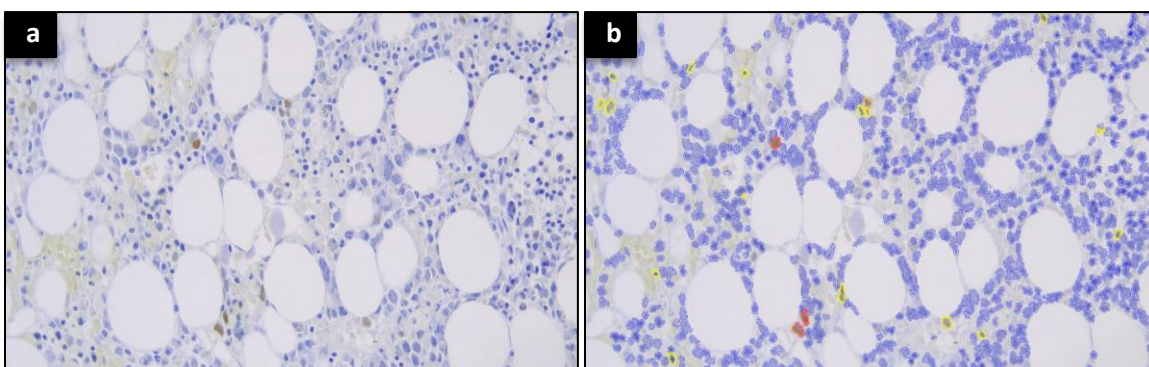


Figura 12. Caso negativo con expresión en 2.5% de las células, pero de predominio tenue (+1) (amarillo en la imagen b). Solo el 0.3% de las células presenta tinción intensa (+3) (rojo en la imagen b).

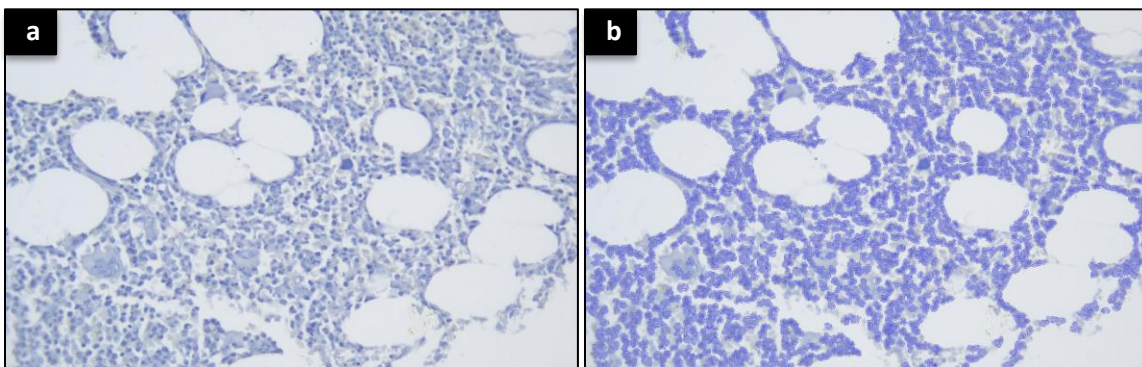


Figura 13. Caso negativo con completa ausencia de tinción.

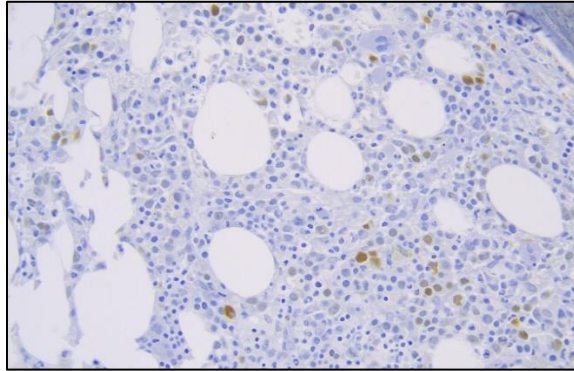


Figura 14. Caso positivo con diagnóstico de SMD. Tinción en 4.7%, predominantemente intensa (+3). Hay abundantes hemosiderófagos acompañantes que dificultan el conteo.

El otro caso interpretado como positivo (ver figura 15), fue el de una paciente femenina de 80 años en seguimiento igualmente por pancitopenia. El mielograma reportó 2% de blastos y 50% de cambios disgranulopoyéticos no especificados. La biopsia de médula ósea mostró hiper celularidad (60%) con cambios displásicos de la línea megacariocítica y áreas con fibrosis significativa (MF:3). La paciente había requerido transfusiones en múltiples ocasiones sin embargo se desconoce su desenlace por pérdida de seguimiento.

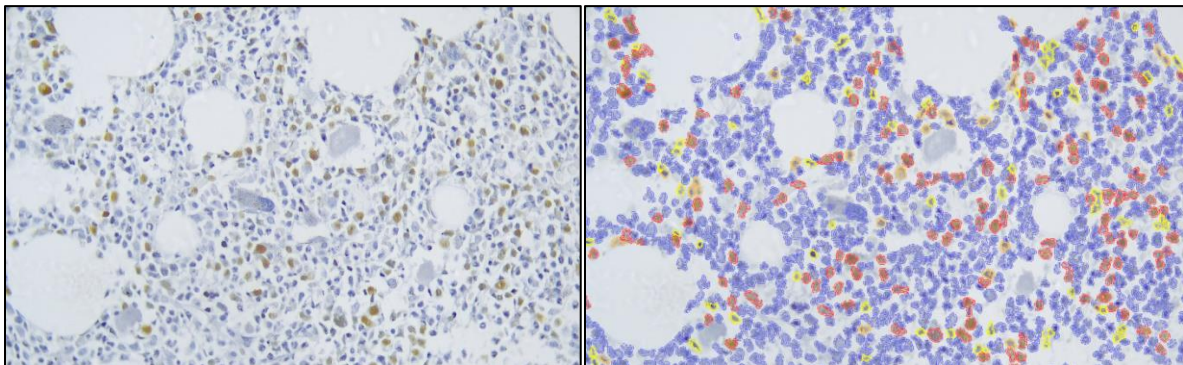


Figura 15. Caso positivo para P53 (20.3%) con predominio de intensidad fuerte (+3)

Sex	Age	Blasts (%)	Displasia (#)	Displasia	Cel. (%)	MF	SMD (OMS 2017)	Citopenia	Carotype	Transf.	IPSS-R	Outcome	Treatment
F	85	0	1	Cambios megaloblásticos	60%		Displasia de Una Línea	Bicitopenia		Sí	3.5 (Intermedio)	Fallecido	Eltrombopag
F	51	0	1	Irregularidad nuclear eritroide	60%	0	Displasia de Una Línea	Bicitopenia		Sí	3 (Bajo)	Fallecido	NO
M	72	0	1	Cambios megaloblásticos	40%	1	Displasia de Una Línea	Bicitopenia	46,XY	NO	1 (Muy Bajo)	Vivo	NO
F	74	4	1	Segmentados hipogranulares	50%	0	Displasia de Una Línea	Bicitopenia		NO	2.5 (Bajo)	Vivo	NO
M	61	0	1	Irregularidad nuclear eritroide	90%	0	Displasia de Una Línea	Pancitopenia		Sí	4.5 (Intermedio)	Pérdida	NO
F	88	3	3	Megacariocitos hipobulados Displasia mieloides no especificada Sideroblastos en anillo (38%)			Sideroblastos en Anillo	Anemia		NO	1 (Muy Bajo)	Pérdida	NO
F	80	0	2	Segmentados Hipogranulares Pseudo Pelger-Huet Cambios megaloblásticos			Sideroblastos en Anillo	Trombocitopenia	46,XX,del(11)(q14),del(20)(q11.2)	Sí	2 (Bajo)	Pérdida	Danazol
F	74	4	2	Displasia mieloides no especificada Displasia eritroide no especificada Sideroblastos en anillo (34%)	95%	1	Sideroblastos en Anillo	Bicitopenia		Sí	3.5 (Intermedio)	Pérdida	NO
F	67	0	2	Micromegacariocitos Megacariocitos hipobulados Segmentados hipogranulares	20-50%	1	Delección de 5q	Bicitopenia	46,XX,del(5q),del(6p)	Sí	3 (Bajo)	Vivo	
M	71	1	3	Micromegacariocitos Cambios megaloblásticos			Displasia Multilínea	Trombocitopenia		NO	1.5 (Muy Bajo)	Pérdida	NO
M	76	3	2	Displasia mieloides no especificada Cambios megaloblásticos			Displasia Multilínea	Bicitopenia	45,X,-Y	Sí	1.5 (Muy Bajo)	Pérdida	EPO. Danazol
F	80	1	2	Displasia megacariocítica no especificada Cambios megaloblásticos			Displasia Multilínea	Anemia	46,XX	Sí	2.5 (Bajo)	Pérdida	NO
F	72	2	1	Micromegacariocitos Megacariocitos hipobulados			Displasia Multilínea	Bicitopenia		Sí	2 (Bajo)	Fallecido	Eltrombopag
F	77	0	2	Segmentados hipogranulares Cambios megaloblásticos	60%	1	Displasia Multilínea	Neutropenia		NO	1 (Muy Bajo)	Pérdida	NO
M	52	4	1	Segmentados Hipogranulares	50%	0	Displasia Multilínea	Bicitopenia	46,XY	NO	1.5 (Muy Bajo)	Pérdida	NO
M	71	2	3	Micromegacariocitos Segmentados Hipogranulares Pseudo Pelger-Huet Irregularidad Nuclear Eritroide	30%	0	Displasia Multilínea	Bicitopenia	46,XY	Sí	3 (Bajo)	Pérdida	EPO. Azacitidina

Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con mutaciones de somáticas de significado pronóstico en Síndrome Mielodisplásico

M	81	0	2	Segmentados Hipogranulares Irregularidad nuclear eritroide Sideroblastos en anillo (15%)	60-90%	3	Displasia Multilínea	Anemia	46,XY	NO	1 (Muy Bajo)	Pérdida	Talidomida (suspendida). Lenalidomida (suspendida). EPO
M	80	0	2	Displasia mieloide y eritroide no especificada	20%		Displasia Multilínea	Bicitopenia	46,XY	NO	1 (Muy Bajo)	Vivo	EPO
M	73	4	3	Megacariocitos hipolobulados Macropolicitos Cambios megaloblásticos	95%	0	Displasia Multilínea	Bicitopenia		NO	3.5 (Intermedio)	Vivo	Azacitidina
F	34	6	2	Segmentados hipogranulares Macropolicitos Displasia eritroide no especificada	80%	0	Exceso de Blastos Tipo 1	Pancitopenia		NO	5.5 (Alto)	Pérdida	NO
M	86	6	2	Segmentados hipogranulares Cambios megaloblásticos	50%	1	Exceso de Blastos Tipo 1	Pancitopenia	46,XY,del(11)(q13)[7]/46,XY[8]	SÍ	4.5 (Intermedio)	Pérdida	EPO. Azacitidina
M	75	0	0		70%	1	Exceso de Blastos Tipo 1	Trombocitopenia	46,XY	SÍ	3.5 (Intermedio)	Vivo	NO
M	75	5	0		30%	1	Exceso de Blastos Tipo 1	Trombocitopenia		NO	3.5 (Intermedio)	Pérdida	NO
M	78	7	1	Segmentados hipogranulares Pseudo Pelger-Huet	30%	0	Exceso de Blastos Tipo 1	Pancitopenia		SÍ	6 (Alto)	Fallecido	Filgastrim. Azacitidina
M	84	7	1	Segmentados hipogranulares Pseudo Pelger-Huet	60%	2	Exceso de Blastos Tipo 1	Pancitopenia		NO	4 (Intermedio)	Pérdida	EPO
M	68	0	1	Segmentados hipogranulares	60%	0	Exceso de Blastos Tipo 1	Bicitopenia	46,XY	SÍ	4.5 (Intermedio)	Vivo	EPO. Azacitidina
M	67	0	2	Micromegacariocitos Megacariocitos hipolobulados Segmentados hipogranulares	40-60%	0	Exceso de Blastos Tipo 1	Trombocitopenia	46,XY	NO	3.5 (Intermedio)	Vivo	Eltrombopag
M	75	17	1	Cambios megaloblásticos			Exceso de Blastos Tipo 2	Bicitopenia	46,XY	NO	4 (Intermedio)	Pérdida	Azacitidina
M	87	17	2	Segmentados hipogranulares Displasia eritroide no especificada	70%	1	Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia		SÍ	6.5 (Muy Alto)	Pérdida	Rechazado por Paciente (azacitidina)
M	77	19	3	No especificada	70%	0	Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia		SÍ	7 (Muy Alto)	Pérdida	Azacitidina
M	83	13	1	Segmentados hipogranulares	95%	0	Exceso de Blastos Tipo 2	Bicitopenia	47,XY,+8[15]/46,XY[5]	SÍ	7.5 (Muy Alto)	Pérdida	Eltrombopag. Citarabina. Prednisolona
M	67	18	3	Segmentados hipogranulares Irregularidad nuclear eritroide	80%	1	Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia	46,X,Yqh+	SÍ	7 (Muy Alto)	Pérdida	EPO. Pegfilgastrim. Azacitidina
M	52	2	1	Segmentados Hipogranulares Pseudo Pelger-Huet	80%	2	Exceso de Blastos Tipo 2	Bicitopenia		NO	5 (Alto)	Fallecido	NO

M	41	10	2	Segmentados hipogranulares Cambios megaloblásticos	70%	1	Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia		Sí	5.5 (Alto)	Pérdida	Citarabina + Idarubicina. Azacitidina. Candidato a trasplante
F	72	18	1	Segmentados hipogranulares	90%	1	Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia		Sí	7 (Muy Alto)	Fallecido	EPO. Eltrombopag. Azacitidina
F	65	7	0		10%	0	Exceso de Blastos Tipo 2	Neutropenia		NO	3.5 (Intermedio)	Pérdida	NO
F	66	4	3	Micromegacariocitos Segmentados hipogranulares Displasia eritroide no especificada	60%	2	Exceso de Blastos Tipo 2	Pancitopenia	46,XX	Sí	6 (Alto)	Vivo	EPO. Azacitidina. Tioguanina
F	72	0	1	Cambios megaloblásticos	NR	3	Inclasificable. Displasia de una línea y pancitopenia	Pancitopenia		Sí	4.5 (Intermedio)	Pérdida	Eltrombopag. Talidomida. Prednisolona
M	89	0	1	Cambios megaloblásticos Displasia mieloide no especificada	70%	3	Inclasificable. Displasia de una línea y pancitopenia	Pancitopenia	46,XY	NO	3 (Bajo)	Vivo	EPO. Talidomida. Prednisolona
M	67	0	1	Megacariocitos hipolobulados	30-40%	0	Inclasificable. Displasia de una línea y pancitopenia	Pancitopenia		Sí	2 (Bajo)	Pérdida	Azacitidina

Tabla 22. Características de los pacientes con SMD del registro

	Citopenia	SMD	p		X ²	p	Cramer's V
Edad (años)	52.97 (±14.98)	71.62 (±12.16)	5.24 x 10 ⁻⁸	Sexo masculino	9.606077	0.001939	0.360294
Celularidad (%)	0.39 (±0.13)	0.61 (±0.22)	1.52 x 10 ⁻⁵	Citogenética anormal	5.509259259	0.018916057	0.396746024
Hb (g/dL)	14.71 (±1.82)	9.83 (±3.02)	1.37 x 10 ⁻¹⁰	Sintomatología	22.183896	2.477 x 10 ⁻⁰⁶	0.5475239
VCM (fL)	88.56 (±7.18)	94.72 (±9.17)	0.0026	Requerimiento transfusional	28.36666667	1.00379 x 10 ⁻⁰⁷	0.619139187
WBC (#/μL)	3467.05 (±879.08)	3517.43 (±3793.95)	0.3491	Tratamiento farmacológico	33.14637	8.55 x 10 ⁻⁰⁹	0.67384
Neu (#/μL)	1391.44 (±745.75)	1567.71 (±1416.92)	0.064811	Antecedentes Expositivos	12.08167	0.000509	0.434484
Pltas (#/μL)	232970.58 (±70703.6)	149564.1 (±236597.79)	0.004017	Comorbilidades	0.8844071	0.34699745	0.10932267

Tabla 23. Comparación de las características de los pacientes con citopenia secundaria con causas secundarias descartadas y pacientes con SMD.

Tabla 24. Análisis de variables clínicas de importancia asociadas con SMD.

9.4.2. Caracterización de la expresión de EZH2 y H3K27me3 por inmunohistoquímica

Con EZH2, se observó algún grado de tinción en 22 de los 23 casos (ver figura 16); el porcentaje de positividad fue muy variable con un rango de 0.00 a 0.9164, una media de 0.3893 con 0.2539 de desviación típica. En todos los casos positivos, el patrón fue nuclear y en las líneas mieloide y/o megacariocítica, con cierta tendencia a predominar en los elementos más inmaduros; de hecho, en uno de los casos se observó una clara distribución paratrabecular (Ver Figura 17).

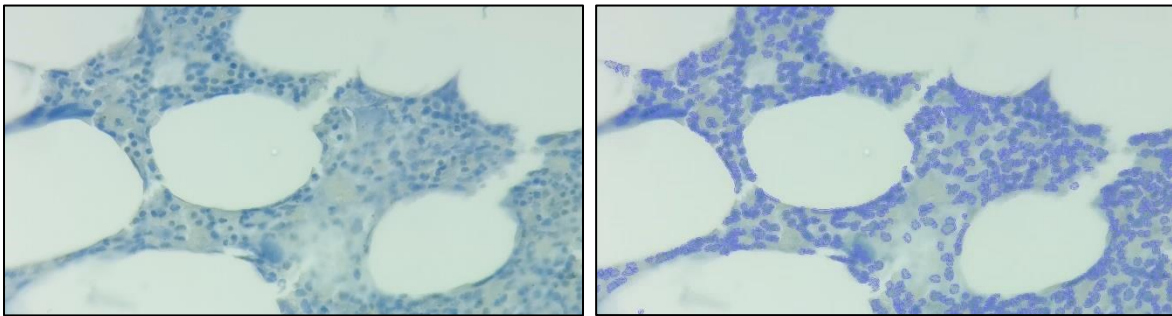


Figura 16. Negativo por ausencia completa de reactividad.

La intensidad de tinción fue heterogénea entre las células hematopoyéticas de cada caso (ver Figura 18). Aunque en algunas de estas se observó el predominio de una intensidad de tinción (ver Figuras 19 a 21), se aplicó un abordaje semicuantitativo previamente reportado (74) para determinar la contribución de cada una de las intensidades a la expresión de la proteína (puntaje de inmunohistoquímica <<IHQ Score>>), el cual es resultado de la sumatoria de los productos de la intensidad de la tinción (1, 2 o 3) y la proporción de células positivas para cada una de estas intensidades:

$$\text{IHQ Score} = (1 \times \text{proporción células positivas tenues}) + (2 \times \text{proporción de células positivas intermedias}) + (3 \times \text{proporción células positivas intensas})$$

En el anexo 3 se relacionan los porcentajes de positividad con diferentes intensidades de tinción, el resultado del IHQ score para cada uno de los casos y se muestran otras imágenes representativas.

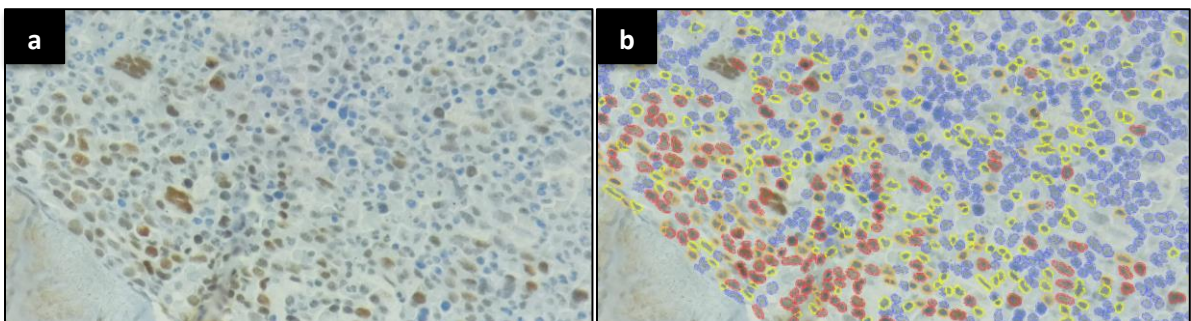


Figura 17. Se observa positividad cuantificada en 33.14% de predominio paratrabecular en una médula ósea

con hiperplasia de la línea mieloide; no solo se observa una mayor positividad numérica, sino también una mayor intensidad, resaltada en la imagen b (rojo: 3+, naranja: 2+, amarillo: 1+). Los neutrófilos son negativos.

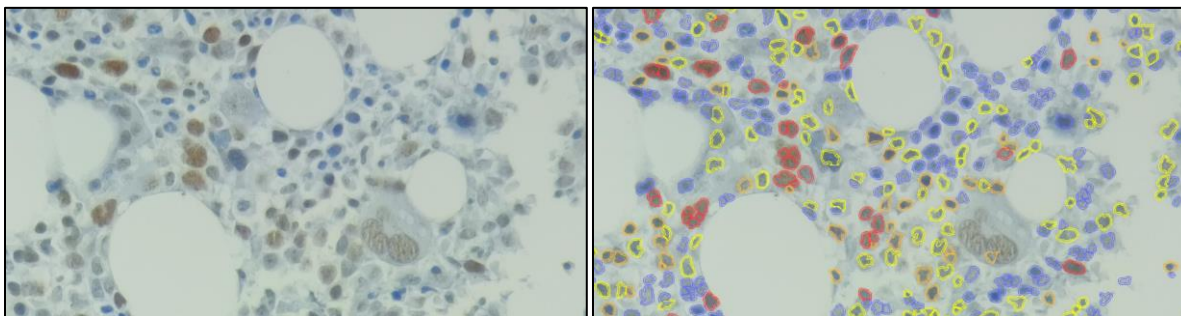


Figura 18. Positividad en el 51.63% de la celularidad, de intensidades heterogéneas (1+: 27.54%, 2+: 12.63%, 3+: 11.46%).

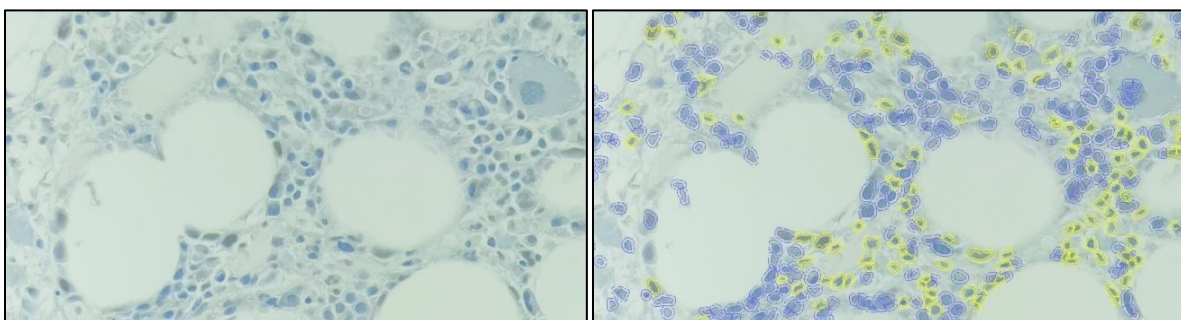


Figura 19. Positividad únicamente tenue (+1) en el 24.46% de la celularidad.

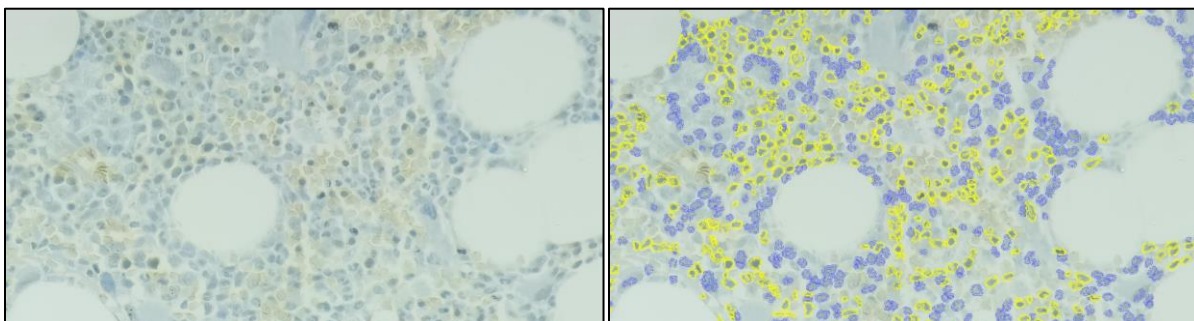


Figura 20. Positividad únicamente tenue (+1) en el 53.52% de la celularidad. En este caso, se observó abundante hemorragia y tinción de fondo que dificultan la valoración.

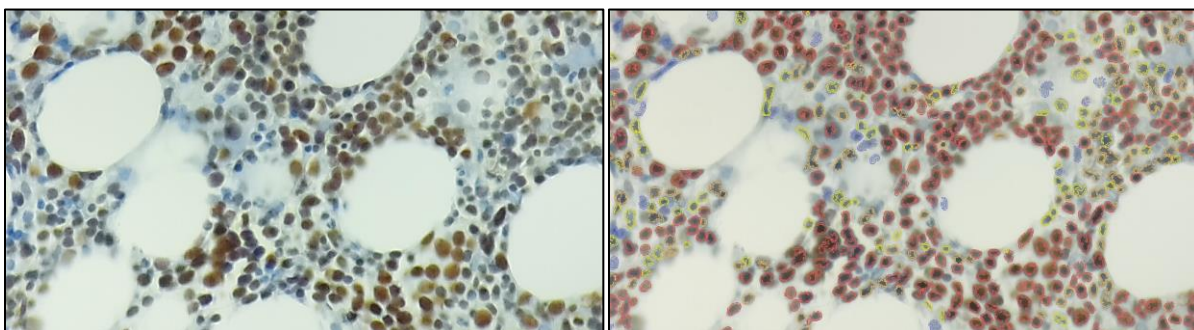


Figura 21. Positividad predominantemente intensa (+3) en el 91.64% de la celularidad.

Empleando un punto de corte de IHQ score de 0.5 (redondeando la media de expresión en casos con *EZH2* mutado previamente reportada (74)), se obtuvieron en total 11 casos con una baja expresión de *EZH2*. De estos casos, 7 tenían diagnóstico de SMD (5 con Exceso de Blastos Tipo 2, 1 con Diplasia Multilínea y 1 con Displasia de Una Línea), 4 de los cuales presentaron un IPSS-R de riesgo Alto o Muy Alto y 5 necesidad de tratamiento farmacológico y requerimiento transfusional; a pesar de esto, no se logró comprobar la asociación entre un IHQ score menor de 0.5 y la presencia de cariotipo anormal, tratamiento farmacológico o requerimiento transfusional; tampoco se encontró asociación del IHQ score con el valor de hemoglobina, el conteo de neutrófilos, el conteo de plaquetas o el IPSS-R (ver Tablas 25 y 26). Los 4 casos restantes con baja expresión de *EZH2* fueron 2 con sospecha de SMD (1 de los cuales mostró además positividad para P53 y cuyas características fueron resumidas en el apartado anterior), uno con diagnóstico de LMA con cambios relacionados con mielodisplasia y uno con diagnóstico de MDS/MPN-NOS.

Con H3K27me3 se observó algún grado de positividad en todos los casos. El porcentaje de positividad fue muy variable con un rango de 0.07 a 0.9259, una media de 0.5218 con 0.2344 de desviación típica. Al igual que con *EZH2*, el patrón fue nuclear y en las líneas mieloide y/o megacariocítica, con cierta tendencia a predominar en los elementos más inmaduros (Figuras 22 y 23). De forma interesante, se observó en algunos casos una tinción no homogénea del/los núcleos(s) de los megacariocitos (Figura 24).

	X ²	p	Cramer's V
Citogenética anormal	0.476190476	0.49015296	0.21821789
Requerimiento transfusional	0.003596404	0.95217951	0.01413507
Tratamiento farmacológico	2.917524034	0.087622219	0.402597403
Antecedentes Exposicionales	0.513071344	0.473812309	0.168831169

Tabla 25. Análisis de asociación de variables cualitativas de importancia con la expresión baja de *EZH2* por inmunohistoquímica (excluyendo los casos sin diagnóstico de SMD).

	r	R ²	p
Hb (g/dL)	0.214997588	0.046223963	0.391579028
Neu (#/μL)	0.206926008	0.042818373	0.410019365
Pltas (#/μL)	0.189233169	0.035809192	0.452023552
IPSS-R	0.031578316	0.00099719	0.901008548

Tabla 26. Análisis de correlación del IHQ score con los valores de hemoglobina (Hb), neutrófilos (Neu), plaquetas (Pltas) e IPSS-R (excluyendo los casos sin diagnóstico de SMD).

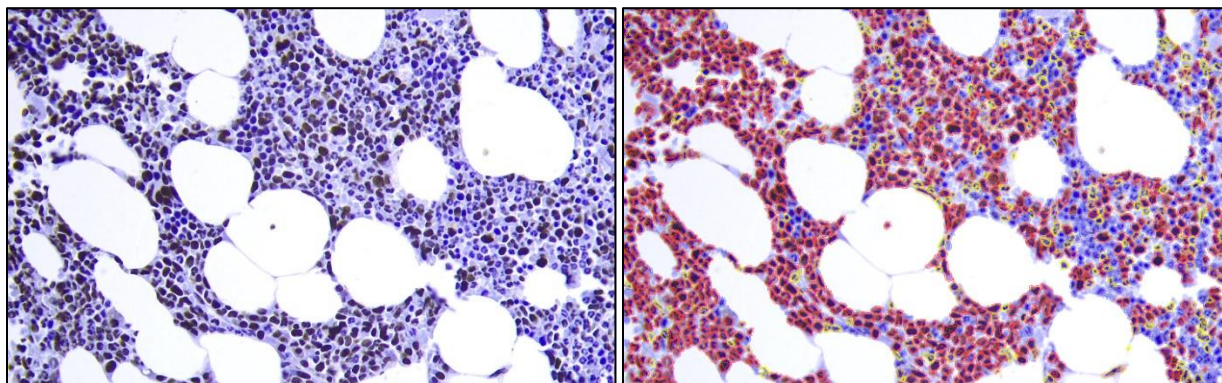


Figura 22. Positividad nuclear en las líneas mieloide y megacariocítica (73.9%), mayormente intensa (3+, rojo, 58.41%). La positividad predomina en los elementos mieloides más inmaduros; los neutrófilos tienen a ser negativos o presentar una positividad tenue (+1, amarillo, 8.23%)

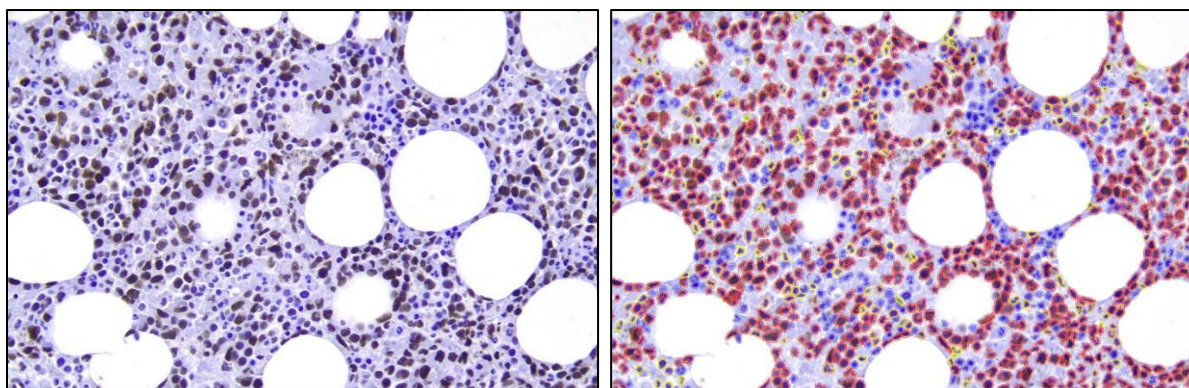


Figura 23. Positividad nuclear en la línea mieloide (77.9%). La positividad predomina en los elementos mieloides más inmaduros; los neutrófilos son negativos

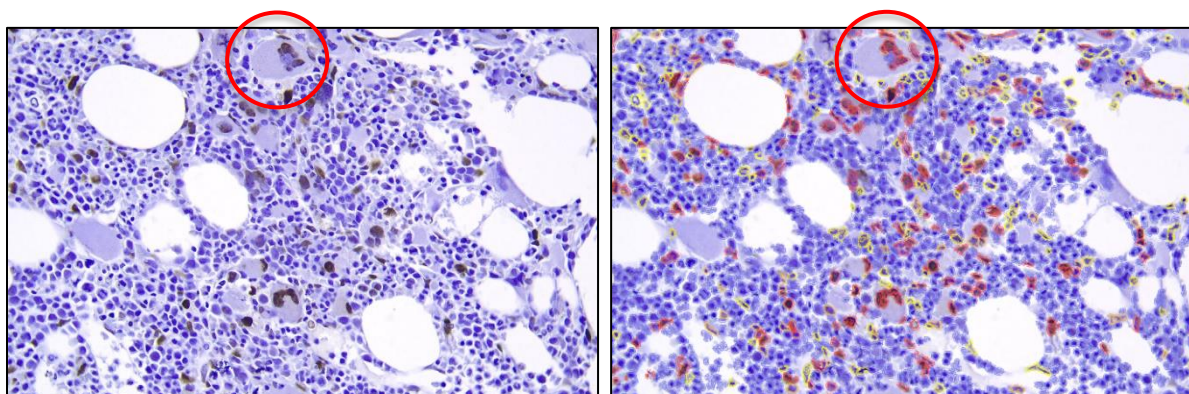


Figura 24. Positividad nuclear en las líneas megacariocítica y mieloide predominantemente intensa. Se observa tinción heterogénea (con un área positiva y otra negativa) en el núcleo de un megacariocito ubicado en la parte superior de la imagen.

La intensidad de tinción fue igualmente heterogénea entre las células hematopoyéticas

de cada caso (ver Figura 25). Aunque en muchas de estas se observó el predominio claro de una intensidad de tinción (ver Figuras 26 y 27). En el anexo 4 se relacionan los porcentajes de positividad con diferentes intensidades de tinción para cada caso y se muestran otras imágenes representativas.

Dada la relación descrita de EZH2 con la trimetilación de H3K27, se estudió la correlación de la expresión de ambas proteínas en los casos mediante un análisis de regresión lineal, encontrándose una asociación positiva entre ambos marcadores, comparando por expresión total de EZH2 y H3K27me3 ($R^2= 0.26$, $p=0.011$) (ver gráfica 5) y por IHQ Score de EZH2 vs expresión total de H3K27me3 ($R^2= 0.31$, $p=0.005$) (ver gráfica 6).

A pesar de esto, la expresión de H2K27me3 fue heterogénea en los casos con baja expresión de EZH2; discriminando los casos que tuvieron IHQ score menor de 0.5, la expresión de H3K27me3 varió entre 17.48% y 55.02%, aunque la media de positividad fue significativamente menor respecto a la totalidad de los casos (37.56% vs 54.49%, $p=0.03$).

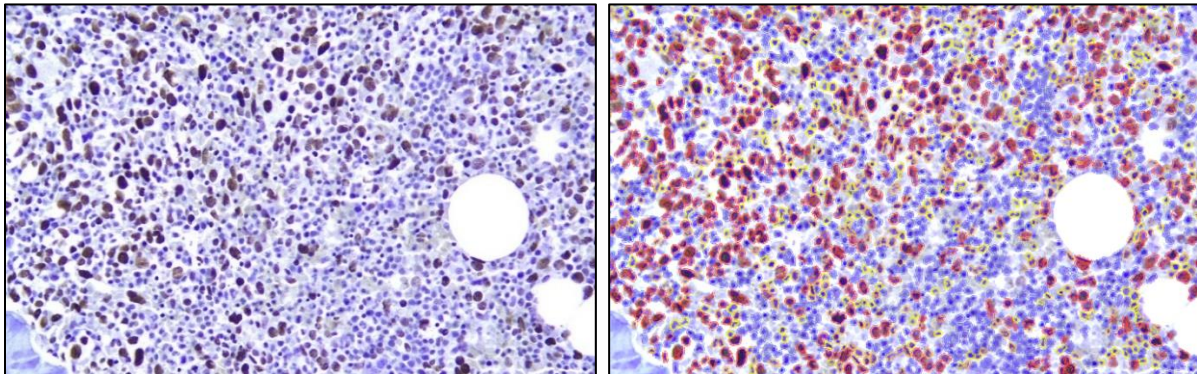


Figura 25. Positividad nuclear en las líneas mieloide y megacariocítica (52.1%). La intensidad de la tinción fue heterogénea (1+, amarillo: 10.41%. 2+, naranja: 14.84. 3+, rojo: 26.92%).

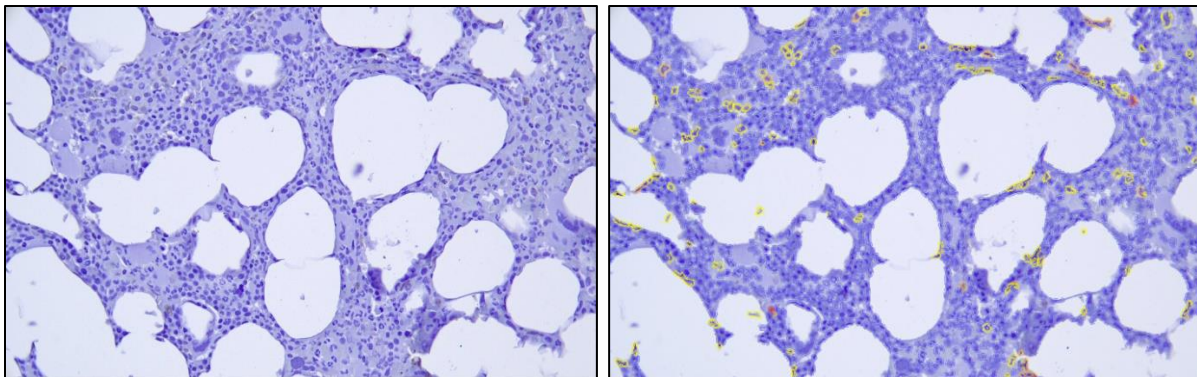


Figura 26. Positividad de predominio tenue (1+) en el 7.2% de la población mieloide, en el caso de MDS/MPN NOS incluido en el estudio.

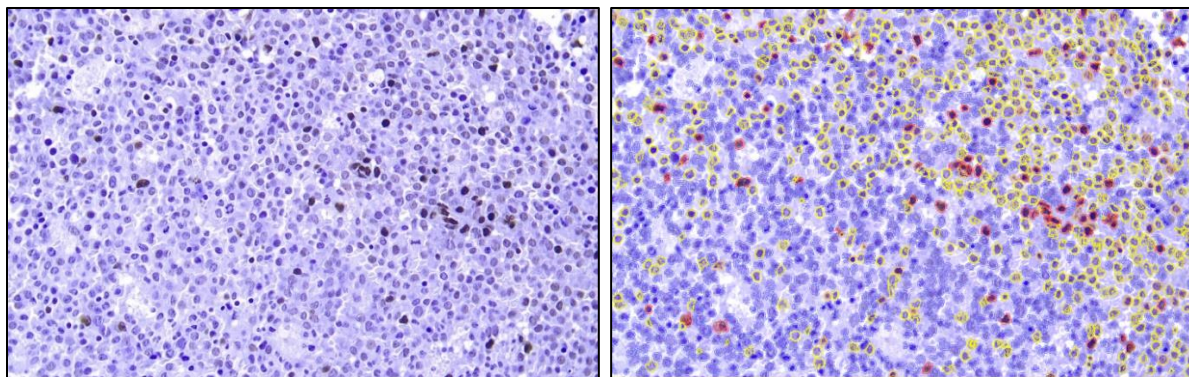
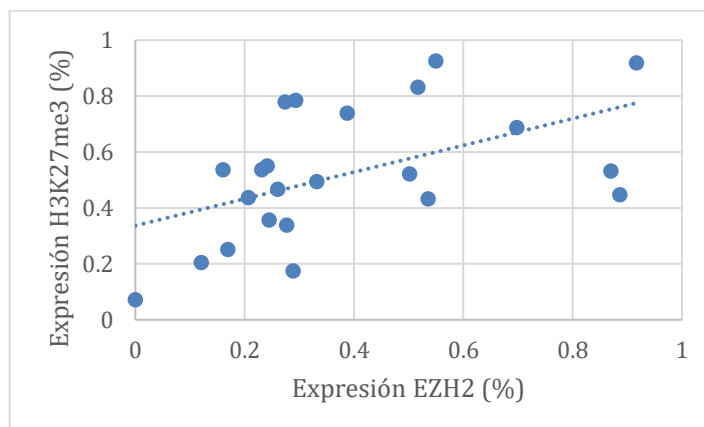
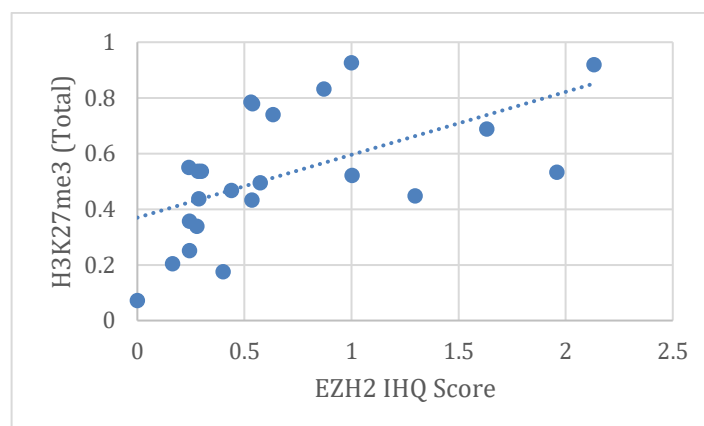


Figura 27. Positividad nuclear de intensidad heterogénea pero de predominio tenue; la positividad total fue del 33.9%. (1+, amarillo: 26.13%. 2+, naranja: 3.61. 3+, rojo: 4.15%).

Para el marcador H3K27me3 tampoco se comprobó la asociación entre el porcentaje de expresión con el valor de hemoglobina, el conteo de neutrófilos, el conteo de plaquetas o el IPSS-R (ver Tablas 27).



Gráfica 5. Análisis de regresión lineal de la expresión de EZH2 y H3K27me3 en términos de % de expresión (sin tener en cuenta la intensidad)



Gráfica 6. Análisis de regresión lineal de la expresión de EZH2 por IHQ Score y la expresión de H3K27me3.

	r	R ²	p
<i>Hb (g/dL)</i>	0.214997588	0.046223963	0.391579028
<i>Neu (#/μL)</i>	0.206926008	0.042818373	0.410019365
<i>Pltas (#/μL)</i>	0.189233169	0.035809192	0.452023552
<i>IPSS-R</i>	0.031578316	0.00099719	0.901008548

Tabla 27. Análisis de correlación de la proporción de expresión de H3K27me3 con los valores de hemoglobina (Hb), neutrófilos (Neu), plaquetas (Pltas) e IPSS-R (excluyendo los casos sin diagnóstico de SMD).

10. DISCUSIÓN

La citopenia persistente es un indicio de SMD y es uno de los criterios diagnósticos de esta entidad; sin embargo, las citopenias son una entidad prevalente que puede verse en una gran variedad de patologías, por lo que es pertinente su caracterización. En nuestra serie, la citopenia corresponde a la mayoría de los pacientes estudiados en el laboratorio de patología (22.3%), incluso después de excluir las causas neoplásicas (incluyendo SMD) y sin tener en cuenta los casos en los que no se indica estudio de biopsia de médula ósea. Esto es esperable teniendo en cuenta las características de nuestra población de estudio, mayormente individuos en edad madura (la media de los pacientes estudiados por citopenia fue de 57.69 años), en concordancia con reportes anteriores, en los que, por ejemplo, la frecuencia de anemia en adultos varía entre 13.8% y 71.6%, con mayor prevalencia en adultos hospitalizados (92,93)

La neutropenia fue la citopenia más frecuentemente documentada en nuestro estudio, a pesar de que su prevalencia en la población general no es la mayor (1.24%) (94). A diferencia de lo reportado en otras poblaciones (94,95), la mayor parte de los pacientes del registro fueron mujeres. Cabe resaltar que un estudio realizado con población árabe encontró una mayor prevalencia de neutropenia (10%) y también una menor razón hombre: mujer, sin embargo, los autores atribuyeron estos hallazgos a la constitución étnica del grupo y una mayor prevalencia de ferropenia en las mujeres, inferencia que hicieron a partir de otros parámetros del cuadro hemático (96). Respecto a este último punto, en nuestra serie solo se documentó un caso de anemia asociada con neutropenia atribuido a ferropenia y ningún caso en el grupo con solo neutropenia. Cabe resaltar que nuestra población no es representativa de la población general, dado que se trata de individuos que están en manejo en un centro de alta complejidad, muchos de ellos hospitalizados, con cierta carga de morbilidad y que además fueron seleccionados por contar con estudio por aspirado/biopsia de médula ósea.

En cuanto a las etiologías atribuidas a la neutropenia, excluyendo los casos de citopenia inexplicada, las causas más comunes fueron autoinmunidad y reacciones medicamentosas; esto es interesante, dado que estudios previos que han estudiado la relación de la aparición de neutropenia con diversas patologías no han encontrado asociación de neutropenia con el diagnóstico de autoinmunidad (97,98). Lo más probable es que esto se deba a dos factores: por un lado, estos estudios son longitudinales y pretenden asociar el hallazgo de neutropenia con el

diagnóstico posterior de enfermedad y por otro lado, están también las características ya mencionadas de la población incluida en nuestro registro.

En nuestra serie, la anemia fue la citopenia menos frecuente, en contraste con lo que indica la literatura; esto probablemente se debe a las características propias de nuestro estudio, en el que la población estuvo conformada por individuos estudiados en el laboratorio de patología con aspirado/biopsia de médula ósea: muchos casos pueden ser diagnosticados y tratados sin requerimiento de estudio de médula ósea, siendo este reservado para casos más complejos y en consideración de la reserva funcional del paciente. Esto también explica la distribución de las etiologías, en la que predominan las anemias hemolíticas inmunes sobre la anemia asociada a inflamación crónica (previamente llamada anemia de enfermedad crónica) o la anemia de causa carencial, que suelen citarse como las más frecuentes en adultos mayores (92,99,100). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que particularmente en este segmento de la población el abordaje etiológico es complejo y en una proporción grande de los sujetos la anemia ocurre en concurso con múltiples factores simultáneos que pueden explicarla (92,93).

De forma interesante, en nuestra serie ningún paciente con anemia fue clasificado con citopenia inexplicada persistente o alguna categoría afín (ICUS, anemia inexplicada del envejecimiento), a pesar de que en adultos mayores se ha reportado que esta representa entre el 28.4% y el 33.6% de los casos (101,102). Esta aparente discrepancia puede deberse también a las características de nuestra población; las estimaciones de la prevalencia de anemia inexplicada se han hecho en estudios poblacionales, cuyo abordaje se limita a excluir mediante exámenes paraclínicos las etiologías más frecuentes. Otro punto para tener en cuenta es lo previamente mencionado sobre la reserva funcional, dado que en uno de estos estudios, realizado en pacientes valorados en atención primaria, la mayoría de los pacientes clasificados con anemia inexplicada tendían a ser mayores, con más comorbilidades, con puntajes más bajos en la escala de Barthel, con más frecuencia de demencia y con grados más leves de anemia; todos estos factores podrían disuadir a los profesionales tratantes de completar el diagnóstico de estos pacientes con metodologías más invasivas (102).

Otro hallazgo llamativo, fue la distribución por sexos, más frecuente en mujeres que en hombres, también contrastando con lo observado previamente en distintas poblaciones, en las que para este grupo etario la razón hombre: mujer suele alta (93,99,100,103).

Los pacientes con bicitopenia y pancitopenia de origen no neoplásico también fueron caracterizados; en la literatura consultada, solo encontramos un estudio que reportara las características clinicopatológicas de los pacientes con bicitopenia (104). En nuestro estudio, la bicitopenia más frecuente fue anemia con trombocitopenia, y en lo que respecta a las etiologías, predominaron aquellas clasificadas como multifactoriales, pero discriminando por causas individuales, la mayor contribución fue de entidades autoinmunes, seguidas por las infecciosas y las carenciales; este perfil difiere con lo reportado para la población adulta en el estudio previamente citado, dado que la frecuencia fue diferente (más frecuentemente carencial, seguida por hepatopatía crónica y después por autoinmunidad).

La etiología más frecuente de pancitopenia no neoplásica fue infecciosa, seguida por hiperesplenismo, enfermedades autoinmunes y causas carenciales, estas dos últimas con la misma frecuencia. En la literatura consultada, el perfil demográfico y etiológico es muy variable entre diferentes poblaciones, sin embargo las causas más frecuentes varían entre carenciales e infecciosas, con relativa baja representación de las causas autoinmunes (105–109).

En la totalidad de los pacientes con citopenia se detectó un grupo de individuos en los que no se determinó causa a pesar de un estudio exhaustivo; estos individuos fueron clasificados como citopenias inexplicables; como se mencionó previamente, no se registraron casos de anemia y la gran mayoría de los casos cursaron con neutropenia (salvo 3, que cursaron

únicamente con trombocitopenia). Los pacientes incluidos en esta categoría incluyeron casos diagnosticados con neutropenia crónica benigna, ICUS, neutropenia étnica benigna y casos sin diagnóstico específico.

Los pacientes diagnosticados con neutropenia étnica benigna fueron excluidos del análisis en consideración de que a pesar de ser un diagnóstico de exclusión es una entidad clínica definida, con agregación familiar, un patrón específico de herencia autosómico dominante y un grupo poblacional de riesgo. Por su parte, los casos de neutropenia crónica benigna no fueron excluidos dado que la distinción conceptual con ICUS es difusa, y es probable que pertenezcan al espectro de una misma entidad.

La neutropenia crónica benigna es un diagnóstico de descarte, de buen pronóstico, caracterizado por una neutropenia persistente durante al menos tres meses, en ausencia de enfermedad alguna que la explique o de algún antecedente exposicional relevante (110); sin embargo, posteriormente fue introducido el término ICUS, cuya definición, como se revisó previamente, se superpone. Incluso, estudios recientes han demostrado que una proporción de los pacientes diagnosticados con neutropenia crónica benigna tienen mutaciones somáticas en genes relacionados con neoplasias mieloides con una VAF que los clasificaría como CCUS (111).

Teniendo las consideraciones previas presentes, en nuestra serie de pacientes con citopenia inexplicada persistente, la mayoría fueron mujeres, con una edad media cercana a los 53 años. La media de conteo de neutrófilos se ubicó en el rango de neutropenia leve y no se encontraron otros hallazgos de importancia en otros parámetros hematológicos. Estos datos son concordantes para los reportados en la literatura (111).

El SMD correspondió al 2.8% de los casos estudiados en el laboratorio de patología; como era esperado, la mayor parte de estos pacientes fueron hombres con edad avanzada. En comparación con los datos previamente reportados, se encontró mayor frecuencia de neutropenia y trombocitopenia. La mayor parte de los pacientes presentaron sintomatología relacionada con la presencia de citopenia, lo cual sí es consistente con estudios previos (21). La mayor parte de los pacientes presentó comorbilidades, sin embargo, esto más probablemente se relaciona con otros factores, como la edad; en este aspecto vale la pena resaltar que no hubo diferencias significativas con los pacientes con citopenia inexplicada.

La macrocitosis y la presencia de trombocitopenia o neutropenia se han considerado claves para sospechar SMD en el contexto clínico adecuado (103,111); respecto a esto, los conteos de plaquetas y neutrófilos fueron significativamente menores en los pacientes con SMD y el VCM fue significativamente mayor respecto a los pacientes con citopenia inexplicada. Los valores medios de hemoglobina, conteo de neutrófilos y plaquetas son concordantes con los reportados en poblaciones occidentales y son mayores a los encontrados en el subcontinente de la india (21,61).

Desafortunadamente no se encontró registro de cariotipo para la mayoría de los pacientes y en los que sí contaron con este, fue anormal en aproximadamente el 32%, lo cual contrasta con las estimaciones reportadas en la literatura que ubican su frecuencia entre el 40-50% (1,2). Las anomalías citogenéticas encontradas pertenecieron a las categorías intermedio, bueno y muy bueno, lo cual concuerda con las estimaciones del CCSS. Es llamativo que en nuestra serie solo se haya encontrado un caso con del(5q), teniendo en cuenta que en series previas se ha reportado entre las primeras anomalías citogenéticas en frecuencia. Esta observación podría atribuirse al no uso de FISH para la detección de esta alteración cromosómica, dada su mayor sensibilidad que el cariotipo (21); sin embargo, es difícil establecer alguna conclusión en este punto teniendo en cuenta que la proporción de pacientes clasificados como SMD con del(5q) fue la esperada de acuerdo con la literatura y que cariotipo fue desconocido en la mayor parte de los

individuos.

En cuanto al diagnóstico específico de SMD y a la clasificación IPSS-R, nuestra serie no difiere de la distribución en las categorías reportada en otras poblaciones (1,21,22,30–32,34).

En ninguno de los casos se encontró reporte de estudio molecular para neoplasias mieloides; múltiples estudios han demostrado el impacto en el diagnóstico y pronóstico de estas entidades, por lo que su utilización en el abordaje de los pacientes con SMD adquiere cada vez mayor trascendencia. En el presente estudio se hizo una caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con algunos de estos genes (P53, EZH2 y H3K27me3).

El uso de inmunohistoquímica para P53 como un marcador de su mutación ya ha sido reportado y puede incluirse en el abordaje diagnóstico de los pacientes con SMD (1,9,10,13,73). Desafortunadamente no se contó con el tejido de médula ósea del único paciente con diagnóstico de SMD con del(5q), entidad en la que la mutación de *TP53* tiene impacto terapéutico. Se encontraron 2 casos (5%) con tinción superior al umbral de positividad, lo que es concordante con la frecuencia estimada la mutación del gen en SMD (15). Los demás casos mostraron en su mayoría ausencia completa de tinción y en algunos casos solamente una tinción tenue y en un porcentaje muy bajo de la celularidad. En nuestra opinión, este perfil de marcación fue de interpretación sencilla y con las herramientas de análisis de imagen disponibles, se puede simplificar aún más. Dada la no disponibilidad del estudio de FISH para p53/17p13.1 y/o secuenciación, no fue posible realizar la correlación de la inmunomarcación con la alteración de este gen en cada caso.

La expresión de EZH2 y H3K27me3 fue heterogénea; en todos los casos se observó algún grado de tinción en el tejido (exceptuando un caso completamente negativo para EZH2), con diferentes porcentajes e intensidades de tinción; en estudios previos se han empleado puntajes de inmunohistoquímica para ponderar esta heterogeneidad (74,75), abordaje que también empleamos. En nuestra opinión, a pesar de que el marcador es fácil de observar, esta variabilidad dificulta establecer alguna alteración de la inmunomarcación, por lo que el uso de ayudas para análisis de imagen es importante para objetivar el resultado.

La positividad fue observada en todos los casos en las líneas mieloides y/o megacariocítica, con una tendencia a predominar en los elementos más inmaduros. Un hallazgo interesante es que el H3K27me3 en los megacariocitos de algunos casos fue variable, siendo negativo o mostrando diferentes intensidades de tinción dentro de un mismo núcleo. Se encontró una correlación positiva entre la marcación de EZH2 y H3K27me3; conociendo el papel del EZH2 en la regulación de la metilación de H3K27, era esperado encontrarse esta asociación como ya se ha reportado en estudios previos (74,75).

Dada la no disponibilidad de los estudios moleculares, no fue posible establecer la correlación entre la pérdida de la tinción en alguno de estos dos marcadores y la mutación de *EZH2*. Sin embargo, teniendo en cuenta el impacto pronóstico de esta mutación, se intentó encontrar alguna asociación con variables clínicas de interés; no logramos encontrar una correlación entre la expresión de EZH2 o H3K27me3 con los valores de hemoglobina, el conteo de neutrófilos o de plaquetas y el IPSS-R. Tampoco se encontró correlación de la pérdida de tinción de EZH2 con la presencia de cariotipo anormal, requerimiento transfusional o necesidad de tratamiento farmacológico; estudios previos tampoco habían logrado encontrar estas asociaciones.

Es importante tener en cuenta que es probable que no todas las mutaciones en *EZH2* se traduzcan en pérdida de su expresión; por ejemplo, es esperable que las mutaciones de tipo *nonsense* alteren significativamente la expresión de la proteína, sin embargo, no necesariamente las mutaciones de tipo *missence* o *frameshift* generan una alteración en la antigenicidad de la

proteína que modifique significativamente la expresión del marcador en el tejido (75); además de esto, debe valorarse si cada una de estas mutaciones tienen el mismo valor pronóstico. Otro factor para tener en cuenta es la influencia de la carga alélica en la expresión de esta proteína; queda por determinar si mayores VAF generan mayores pérdidas de expresión o si menores VAF no la alteran considerablemente. En consideración de todos estos factores, la realización de otros estudios con muestras más grandes y con evaluación de las alteraciones moleculares son de importancia para la adecuada caracterización de la expresión de la proteína en esta entidad.

Ninguno de los cariotipos documentados en los pacientes analizados presentó aberraciones en el cromosoma 7, las cuales son de pobre pronóstico y se relacionan con alteraciones en EZH2 (74,75).

11. LIMITACIONES

A pesar de que se obtuvo un número considerable de registros de la totalidad de pacientes valorados en el laboratorio de patología en el periodo de estudio, el número de pacientes con SMD y con citopenias inexplicadas fue más bien reducido y no se logró completar el tamaño de muestra calculado para el estudio, lo que limita la interpretación de los resultados obtenidos.

Ninguno de los pacientes con citopenia inexplicada o SMD contaron con estudio molecular por secuenciación para neoplasias mieloides; de hecho, más de la mitad de los pacientes no tenían resultado de cariotipo disponible y ninguno tenía estudio de FISH. Estas dificultades impactaron en la interpretación de la expresión por inmunohistoquímica de las proteínas de interés, además de limitar la caracterización clínica de los pacientes, dado que en los casos sin cariotipo disponible el IPSS-R fue calculado sin tenerlo en cuenta (el cálculo se hizo asumiendo pertenencia al grupo pronóstico bueno de CCSS). Adicionalmente, como se mencionó previamente, el uso de FISH puede impactar en la detección de del(5q), al ser más sensible.

Dada la segmentación del sistema de salud, en muchos pacientes se pierde el seguimiento dado que la garantía de este está sujeto a las dinámicas propias del asegurador, esto es, muchos pacientes continúan su manejo en otras instituciones o pueden no continuarlo en absoluto, por lo que el desenlace de muchos de los pacientes incluidos se desconoce, lo que limita la caracterización clínica y el establecimiento de asociaciones con la expresión de las proteínas estudiadas. Esto mismo también impacta en la disponibilidad del tejido para estudio, dado que muchos de los pacientes retiran su material al continuar el seguimiento en otro centro médico.

Finalmente, el relativo pequeño tamaño de la muestra y la no disponibilidad del material estudiado limitó la posibilidad de completar el estudio con el marcador ABCB7, dado que al no contar con tejido de ninguno de los casos de SMD con Sideroblastos en Anillo, la interpretación de los resultados iba a verse más comprometida.

12. CONCLUSIONES

- La citopenia de causas no neoplásicas es una entidad prevalente en los pacientes estudiados con biopsia de médula ósea, en concordancia con lo reportado en otras poblaciones. Sin embargo, a diferencia de lo reportado en otras series, hay una mayor frecuencia de neutropenia y trombocitopenia, mayor representación de causas relacionadas con autoinmunidad y menos enfermedades infecciosas o etiologías carenciales.
- Las características de los pacientes con SMD en esta serie son concordantes con lo

reportado en otros estudios, sin embargo, difieren por una mayor frecuencia de trombocitopenia y neutropenia, además de una menor frecuencia de del(5q). Esta última observación está limitada por la no disponibilidad de cariotipo en la totalidad de los pacientes descritos.

- En comparación con los pacientes estudiados en Asia meridional, los pacientes con SMD de esta serie tuvieron una media mayor en los valores de hemoglobina y los conteos de neutrófilos y plaquetas, aproximándose más a las reportadas para poblaciones occidentales.
- En comparación con los pacientes con citopenia inexplicada, en los pacientes con SMD predominan los hombres de edad avanzada, con una mayor relación hombre: mujer y una media de edad mayor. Ninguno de los pacientes en seguimiento por citopenia inexplicada tuvo requerimiento transfusional o necesidad de tratamiento y los parámetros del cuadro hemático estuvieron significativamente menos alterados que los de los paicentes con SMD.
- La interpretación de la expresión de P53 en biopsia de médula ósea en el contexto de SMD es sencilla y estudios previos la han correlacionado con el estado del gen, sin embargo, esta correlación en esta serie de pacientes está por establecer.
- La expresión de EZH2 y de H3K27me3 se correlacionan positivamente, sin embargo, no se observó correlación significativa entre la expresión de alguna de estas proteínas y los hallazgos del cuadro hemático, el IPSS-R, el requerimiento de transfusiones, la presencia de anomalías citogenéticas o necesidad de tratamiento quimioterapéutico. El comportamiento de la expresión de estas proteínas en relación con el estado de *EZH2* (mutado vs no mutado, VAF de la mutación y tipo de mutación) en esta serie de pacientes está por establecer.

13. PRODUCTOS ESPERADOS

Se espera contribuir al conocimiento de las citopenias y el SMD en nuestra población, así como del abordaje diagnóstico de esta última entidad, en la cual la patología puede impactar en el pronóstico e incluso el tratamiento de los pacientes. De la misma forma, la construcción del registro de pacientes evaluados con biopsia de médula ósea en el laboratorio de patología constituye un insumo para el estudio de otras entidades de interés en hematología en nuestra población. Se realizará un manuscrito consolidando los hallazgos del estudio para su publicación y socialización en revistas y/o eventos académicos del medio.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Chan JKC, Jaffe ES KY-H. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition) IARC. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition) IARC. 2017. 353–4 p.
2. Hasserjian RP. Myelodysplastic Syndrome Updated. *Pathobiology*. 2019;86(1):53–61.
3. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008;93(11):1712–7.
4. Valent P, Orazi A, Steensma DP, Ebert BL, Haase D, Malcovati L, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget*. 2017;8(43):73483–500.
5. Chokr N, Pine AB, Bewersdorf JP, Shallis RM, Stahl M, Zeidan AM. Getting personal with myelodysplastic syndromes: is now the right time? *Expert Rev Hematol [Internet]*. 2019;12(4):215–24. Available from: <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1592673>
6. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496–506.
7. Gondek LP, DeZern AE. Assessing clonal haematopoiesis: clinical burdens and benefits of diagnosing myelodysplastic syndrome precursor states. *Lancet Haematol [Internet]*. 2020;7(1):e73–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30211-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30211-X)
8. Nazha A, Narkhede M, Radivoyevitch T, Seastone DJ, Patel BJ, Gerds AT, et al. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016;30(11):2214–20.
9. McGraw KL, Nguyen J, Komrokji RS, Sallman D, Al Ali NH, Padron E, et al. Immunohistochemical pattern of p53 is a measure of TP53 mutation burden and adverse clinical outcome in myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2016; 101:e320.
10. Ruzinova MB, Lee YS, Duncavage EJ, Welch JS. TP53 immunohistochemistry correlates with TP53 mutation status and clearance in decitabine-treated patients with myeloid malignancies. *Haematologica* 2019; 104:e345
11. Carlos RE. Transición epidemiológica en Colombia: de las enfermedades infecciosas a las no transmisibles. *Rev Ciencias Biomédicas*. 2012;3(2).
12. Kawata E, Lazo-Langner A, Xenocostas A, Hsia CC, Howson-Jan K, Deotare U, et al. Clinical value of next-generation sequencing compared to cytogenetics in patients with suspected myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2021;192(4):729–36.
13. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971–9.
14. Saft L, Karimi M, Ghaderi M, Matolcsy A, Mufti GJ, Kulasekararaj A, et al. P53 Protein

- Expression Independently Predicts Outcome in Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes With Del(5Q). *Haematologica*. 2014;99(6):1041–9.
15. Cleven AHG, Nardi V, Ok CY, Goswami M, Dal Cin P, Zheng Z, et al. High p53 protein expression in therapy-related myeloid neoplasms is associated with adverse karyotype and poor outcome. *Mod Pathol* [Internet]. 2015;28(4):552–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2014.153>
 16. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079–88.
 17. Fernandez-Pol S, Ma L, Ohgami RS, Arber DA. Significance of myelodysplastic syndrome-associated somatic variants in the evaluation of patients with pancytopenia and idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Mod Pathol*. 2016;29(9):996–1003.
 18. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, Wilmazal F, Sperr WR, Mufti G, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res* [Internet]. 2012;36(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.08.016>
 19. Jain M, Tripathi A. ICUS/CCUS/CHIP: basics & beyond. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2017;10(10):915–20. Available from: <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1371588>
 20. Steensma DP. The Clinical Challenge of Idiopathic Cytopenias of Undetermined Significance (ICUS) and Clonal Cytopenias of Undetermined Significance (CCUS). *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(6):536–42.
 21. Mahmood R, Altaf C, Ahmed P, Khan SA, Malik HS. Myelodysplastic syndrome in Pakistan: Clinicohematological characteristics, cytogenetic profile, and risk stratification. *Turkish J Hematol*. 2018;35(2):109–15.
 22. Zeidan AM, Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Rev*. 2019;34:1–15.
 23. Rodger EJ, Morison IM. Myelodysplastic syndrome in New Zealand and Australia. *Intern Med J*. 2012;42(11):1235–42.
 24. Cogle CR, Craig BM, Rollison DE, List AF. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: High number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood*. 2011;117(26):7121–5.
 25. Sweeney MR, Applebaum KM, Arem H, Braffett BH, Poynter JN, Robien K. Medical conditions and modifiable risk factors for myelodysplastic syndrome: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(9):1502–17.
 26. Schnatter AR, Glass DC, Tang G, Irons RD, Rushton L. Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: An international pooled analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(22):1724–37.
 27. Link DC. Mechanisms of leukemic transformation in congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2019;26(1):34–40.
 28. Farrugia H, Wei A. Therapy-Related Acute Myeloid Leukaemia and Myelodysplastic Syndrome in Victoria, Australia 2003-2014. *Intern Med J*. 2018;48(7):822-829.

29. Candelaria M, Dueñas-Gonzalez A. Therapy-related myelodysplastic syndrome. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(5):655–65.
30. Nagata Y, Maciejewski JP. The functional mechanisms of mutations in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* [Internet]. 2019;33(12):2779–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0617-3>
31. Malcovati L, Cazzola M. Recent advances in the understanding of myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Br J Haematol.* 2016;174(6):847–58.
32. Dan C, Chi J, Wang L. Molecular mechanisms of the progression of myelodysplastic syndrome to secondary acute myeloid leukaemia and implication for therapy. *Ann Med* [Internet]. 2015;47(3):209–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/07853890.2015.1009156>
33. Shallis RM, Ahmad R, Zeidan AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2018;101(3):260–71.
34. Meggendorfer M, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Molecular analysis of myelodysplastic syndrome with isolated deletion of the long arm of chromosome 5 reveals a specific spectrum of molecular mutations with prognostic impact: A study on 123 patients and 27 genes. *Haematologica.* 2017;102(9):1502–10.
35. Epling-Burnette PK, List AF. Advancements in the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(2):70–6.
36. Sundaravel S, Duggan R, Bhagat T, Ebenezer DL, Liu H, Yu Y, et al. Reduced DOCK4 expression leads to erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(46):E6359–68.
37. Freedman MH, Alter BP. Risk of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in congenital neutropenias. *Semin Hematol.* 2002;39(2):128–33.
38. Frietsch JJ, Dornaus S, Neumann T, Scholl S, Schmidt V, Kunert C, et al. Paraneoplastic inflammation in myelodysplastic syndrome or bone marrow failure: Case series with focus on 5-azacytidine and literature review. *Eur J Haematol.* 2014;93(3):247–59.
39. Montoro J, Gallur L, Merchán B, Molero A, Roldán E, Martínez-Valle F, et al. Autoimmune disorders are common in myelodysplastic syndrome patients and confer an adverse impact on outcomes. *Ann Hematol.* 2018;97(8):1349–56.
40. Esatoglu SN, Hatemi G, Salihoglu A, Hatemi I, Soysal T, Celik AF, et al. A reappraisal of the association between Behçet's disease, myelodysplastic syndrome and the presence of trisomy 8: a systematic literature review. *Clin Exp Rheumatol.* 2015 Nov-Dec;33(6 Suppl 94): S145-51.
41. Vijenthira A, Premkumar D, Callum J, Lin Y, Wells RA, Chodirker L, et al. The management and outcomes of patients with myelodysplastic syndrome with persistent severe thrombocytopenia: An observational single centre registry study. *Leuk Res* [Internet]. 2019;76(September 2018):76–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.12.002>
42. Li W, Morrone K, Kambhampati S, Will B, Steidl U, Verma A. Thrombocytopenia in MDS: Epidemiology, mechanisms, clinical consequences and novel therapeutic strategies. *Leukemia.* 2016;30(3):536–44.

43. Farah C, Bulai Livideanu C, Jegu J, Paul C, Viraben R, Lamant L, et al. Prevalence and prognostic value of cutaneous manifestations in patients with myelodysplastic syndrome. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2010;24(10):1171–5.
44. Amin HM, Yang Y, Shen Y, Estey EH, Giles FJ, Pierce SA, et al. Having a higher blast percentage in circulation than bone marrow: Clinical implications in myelodysplastic syndrome and acute lymphoid and myeloid leukemias. *Leukemia*. 2005;19(9):1567–72.
45. Kayano H. Histopathology in the diagnosis of high-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Exp Hematop*. 2018;58(2):51–60.
46. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Dyserythropoiesis in the diagnosis of the myelodysplastic syndromes and other myeloid neoplasms: problem areas. *Br J Haematol*. 2018;182(4):526–33.
47. Liang C, Li J, Cheng J, Chen S, Ye Z, Zhang F, et al. Characteristics of bone marrow cell dysplasia and its effectiveness in diagnosing myelodysplastic syndrome. *Hematology [Internet]*. 2018;23(2):65–76. Available from: <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1347247>
48. Schemenau J, Baldus S, Anlauf M, Reinecke P, Braunstein S, Blum S, et al. Cellularity, characteristics of hematopoietic parameters and prognosis in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015;95(3):181–9.
49. Matsushima T, Handa H, Yokohama A, Nagasaki J, Koiso H, Kin Y, et al. Prevalence and clinical characteristics of myelodysplastic syndrome with bone marrow eosinophilia or basophilia. *Blood*. 2003;101(9):3386–90.
50. Durrani J, Maciejewski JP. Idiopathic aplastic anemia vs hypocellular myelodysplastic syndrome. *Hematol (United States)*. 2019;2019(1):97–104.
51. Nakanishi R, Ishida M, Hodohara K, Yoshida T, Yoshii M, Okuno H, et al. Prominent gelatinous bone marrow transformation presenting prior to myelodysplastic syndrome: A case report with review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(8):1677–82.
52. Takahashi M, Koike T, Nagayama R, Fujiwara M, Koyama S, Ohnishi M, et al. Myelodysplastic syndrome with myelofibrosis: myelodysplastic syndrome as a major primary disorder for acute myelofibrosis. *Clin Lab Haematol*. 1991;13(1):17–23.
53. Malcovati L, Della Porta MG, Lunghi M, Pascutto C, Vanelli L, Travaglino E, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2005;19(5):776–83.
54. Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2006;20(4):549–55.
55. Porwit A, Van De Loosdrecht AA, Bettelheim P, Eidenschink Brodersen L, Burbury K, Cremers E, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes - Proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014;28(9):1793–8.
56. Goardon N, Nikolousis E, Sternberg A, Chu WK, Craddock C, Richardson P, et al. Reduced CD38 expression on CD34 + cells as a diagnostic test in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1160–3.

57. Alayed K, Meyerson JB, Osei ES, Blidaru G, Schlegelmilch J, Johnson M, et al. CD177 Enhances the Detection of Myelodysplastic Syndrome by Flow Cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2020;153(4):554–65.
58. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol.* 2012;30(8):820–9.
59. De Witte T, Bowen D, Robin M, Malcovati L, Niederwieser D, Yakoub-Agha I, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: Recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(13):1753–62.
60. Baidoun F, Chen D, Patnaik M, Gangat N, Begna K, Elliott M, et al. Clinical outcome of patients diagnosed with myelodysplastic syndrome-unclassifiable (MDS-U): single center experience. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(10):2483–7.
61. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454–65.
62. Scalzulli E, Pepe S, Colafigli G, Breccia M. Therapeutic strategies in low and high-risk MDS: What does the future have to offer? *Blood Rev.* 2021;45.
63. Steensma DP. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J [Internet].* 2018;8(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0085-4>
64. Kröger N, Brand R, Van Biezen A, Zander A, Dierlamm J, Niederwieser D, et al. Risk factors for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia treated with allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2009;94(4):542–9.
65. Marisavljevic D, Savic A, Zeremski V, Stanisavljevic N, Jelic S. Myelodysplastic syndromes in adults aged less than 50 years: Incidence and clinicopathological data. *J BUON.* 2014;19(4):999–1005.
66. Wang F, Ni J, Wu L, Wang Y, He B, Yu D. Gender disparity in the survival of patients with primary myelodysplastic syndrome. *J Cancer.* 2019;10(5):1325–32.
67. Breccia M, Federico V, Latagliata R, Mercanti C, D'Elia GM, Cannella L, et al. Evaluation of comorbidities at diagnosis predicts outcome in myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res.* 2011;35(2):159–62.
68. Falantes JF, Márquez-Malaver FJ, Knight T, Calderón-Cabrera C, Martino ML, González J, et al. The incorporation of comorbidities in the prognostication of patients with lower-risk myelodysplastic syndrome*. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(8):1893–902.
69. Sevindik OG, Guc Z, Kahraman S, Medeni Solmaz S, Katgi A, Acar C, et al. Hypoalbuminemia is a surrogate biomarker of poor prognosis in myelodysplastic syndrome even when adjusting for comorbidities. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(9):2552–5.
70. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol.* 2013;160(5):660–72.

71. Hou HA, Tsai CH, Lin CC, Chou WC, Kuo YY, Liu CY, et al. Incorporation of mutations in five genes in the revised International Prognostic Scoring System can improve risk stratification in the patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer J* [Internet]. 2018;8(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0074-7>
72. Gu S, Xia J, Tian Y, Zi J, Ge Z. A novel scoring system integrating molecular abnormalities with IPSS-R can improve the risk stratification in patients with MDS. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1–9.
73. Kitagawa M, Yoshida S, Kuwata T, Tanizawa T, Kamiyama R. p53 Expression in myeloid cells of myelodysplastic syndromes: Association with evolution of overt leukemia. *Am J Pathol*. 1994;145(2):338–44.
74. McGraw KL, Nguyen J, Al Ali NH, Komrokji RS, Sallman D, Zhang X, et al. Association of EZH2 protein expression by immunohistochemistry in myelodysplasia related neoplasms with mutation status, cytogenetics and clinical outcomes. *Br J Haematol*. 2019;184(3):450–5.
75. Stomper J, Meier R, Ma T, Pfeifer D, Ihorst G, Blagitko-Dorfs N, et al. Integrative study of EZH2 mutational status, copy number, protein expression and H3K27 trimethylation in AML/MDS patients. *Clin Epigenetics*. 2021;13(1):1–14.
76. Sashida G, Oshima M, Iwama A. Deregulated Polycomb functions in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* [Internet]. 2019;110(2):170–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-019-02600-6>
77. Pekmezci M, Cuevas-Ocampo AK, Perry A, Horvai AE. Significance of H3K27me3 loss in the diagnosis of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Mod Pathol* [Internet]. 2017;30(12):1710–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.97>
78. Kazley JM, Dicaprio MR. Soft tissue and bone tumors. *Pocket Foot and Ankle Medicine and Surgery*. 2018.
79. Wei Y, Xia W, Zhang Z, Liu J, Wang H, Adsay N V., et al. Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Mol Carcinog*. 2008;47(9):701–6.
80. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239–46.
81. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jädersten M, Jansson M, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015;126(2):233–41.
82. Kubasch AS, Fenaux P, Platzbecker U. Development of luspatercept to treat ineffective erythropoiesis. *Blood Adv*. 2021;5(5):1565–75.
83. Martín I, Navarro B, Serrano A, Villamón E, Calabuig M, Solano C, et al. Impact of clinical features, cytogenetics, genetic mutations, and methylation dynamics of CDKN2B and DLC-1 promoters on treatment response to azacitidine. *Ann Hematol*. 2020;99(3):527–37.
84. Zhang Q, Haider M, Al Ali NH, Lancet JE, Epling-Burnette PK, List AF, et al. SF3B1 Mutations Negatively Predict for Response to Immunosuppressive Therapy in Myelodysplastic Syndromes. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2020;20(6):400-406.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.12.023>

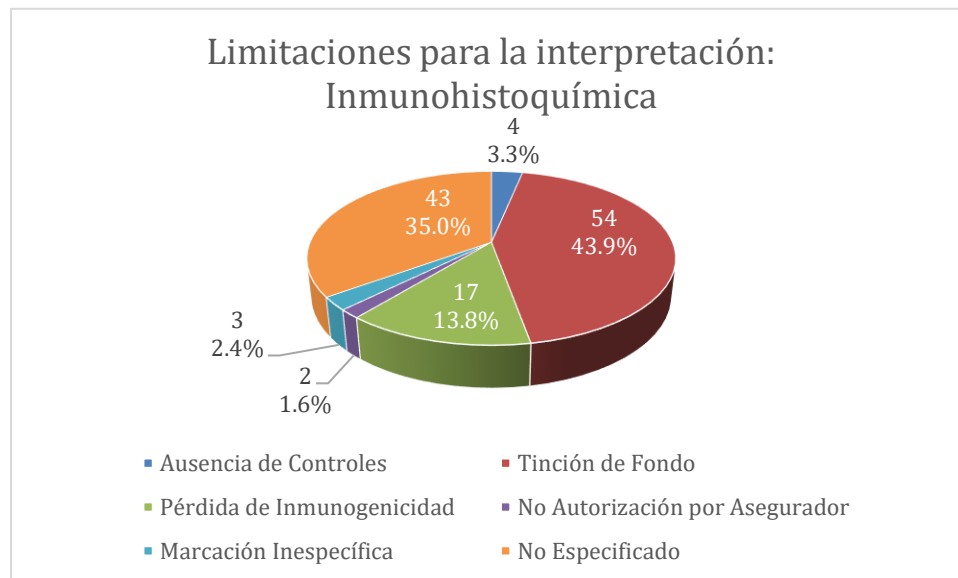
85. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts . *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384–95.
86. Dolatshad H, Pellagatti A, Liberante FG, Llorian M, Repapi E, Steeples V, et al. Cryptic splicing events in the iron transporter ABCB7 and other key target genes in SF3B1-mutant myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016;30(12):2322–31.
87. Nikpour M, Scharenberg C, Liu A, Conte S, Karimi M, Mortera-Blanco T, et al. The transporter ABCB7 is a mediator of the phenotype of acquired refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2013;27(4):889–96.
88. Thol F, Kade S, Schlarman C, Löffeld P, Morgan M, Krauter J, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(15):3578–84.
89. Zheng X, Zhan Z, Naren D, Li J, Yan T, Gong Y. Prognostic value of SRSF2 mutations in patients with de novo myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(9):1–12.
90. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SCW, Ramakrishnan A, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell* [Internet]. 2015;27(5):617–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.006>
91. Procedure E. Immunohistochemical staining of formalin-fixed paraffin embedded tissues. *Immunohistochemical staining of formalin-fixed paraffin embedded tissues*. 2010;13:4–6.
92. Geisel T, Martin J, Schulze B, Schaefer R, Bach M, Virgin G, et al. An etiologic profile of anemia in 405 geriatric patients. *Anemia*. 2014;2014.
93. Bach V, Schruckmayer G, Sam I, Kemmler G, Stauder R. Prevalence and possible causes of anemia in the elderly: A cross-sectional analysis of a large European university hospital cohort. *Clin Interv Aging*. 2014;9:1187–96.
94. Zhou J, Zhou N, Liu Q, Xie ZP, Xu Y, Dai SC, et al. Prevalence of neutropenia in US residents: a population based analysis of NHANES 2011–2018. *BMC Public Health*. 2023;23(1):1–9.
95. Matthew M. Hsieh, James E. Everhart, Danita D. Byrd-Holt, et al. Prevalence of Neutropenia in the U.S. Population: Age, Sex, Smoking Status, and Ethnic Differences. *Ann Intern Med*. 2004;146(19):486–92.
96. Yassin MA, Soliman AT, Hmissi SM, Abdulla MAJ, Itani M, Alamami AA, et al. Prevalence of neutropenia among adult Arabs in Qatar: Relation to other hematological parameters and anthropometric data. *Med (United States)*. 2022;101(36):E30431.
97. Palmblad J, Siersma V, Lind B, Bjerrum OW, Hasselbalch H, Andersen CL. Age-related prevalence and clinical significance of neutropenia - isolated or combined with other cytopenias: Real world data from 373 820 primary care individuals. *Am J Hematol*. 2020;95(5):521–8.
98. Andersen CL, Tesfa D, Siersma VD, Sandholdt H, Hasselbalch H, Bjerrum OW, et al. Prevalence and clinical significance of neutropenia discovered in routine complete blood cell counts: A longitudinal study. *J Intern Med*. 2016;279(6):566–75.

99. Agravat AH, Pujara K, Kothari RK, Dhruva GA. A clinico-pathological study of geriatric anemias. *Aging Med.* 2021;4(2):128–34.
100. Orces CH. Prevalence of Anemia among Older Adults Residing in the Coastal and Andes Mountains in Ecuador: Results of the SABE Survey. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2017;2017.
101. Guralnik JM, Eisenstaedt RS, Ferrucci L, Klein HG, Woodman RC. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: Evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood* [Internet]. 2004;104(8):2263–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-05-1812>
102. Michalak SS, Rupa-Matysek J, Hus I, Gil L. Unexplained anemia in the elderly - A real life analysis of 981 patients. *Arch Med Sci.* 2020;16(4):834–41.
103. Alsaeed M, Ahmed SS, Seyadi K, Ahmed AJ, Alawi AS, Abulsaad K. The prevalence and impact of anemia in hospitalized older adults: A single center experience from Bahrain. *J Taibah Univ Med Sci* [Internet]. 2022;17(4):587–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2022.02.003>
104. Singh A, Hungund B, Kumar L, Pattanshetti M. Clinico-haematological profile of patients with bicytopenia. *Pathology.* 2018;50(5):540–8.
105. Nell EM, Chapanduka ZC. Aetiology of pancytopenia: Experience of a South African tertiary academic centre. *Afr J Lab Med.* 2022;11(1):1–8.
106. N. GB, Rao KS. Pancytopenia: A Clinico Hematological Study. *J Lab Physicians.* 2011;3(01):015–20.
107. Jain A, Garg R, Kaur R, Nibhoria S, Chawla SPS, Kaur S. Clinico-hematological profile of pancytopenic adult patients in a tertiary care teaching hospital. *Tzu Chi Med J.* 2022;34(1):95–101.
108. Vargas-Carretero CJ, Fernandez-Vargas OE, Ron-Magaña AL, Padilla-Ortega JA, Ron-Guerrero CS, Barrera-Chairez E. Etiology and clinico-hematological profile of pancytopenia: experience of a Mexican Tertiary Care Center and review of the literature. *Hematol (United Kingdom).* 2019;24(1):399–404.
109. Doshi D, Shah AN, Somani S, Jain A, Jivarajani H, Kothari P. Study of clinical and aetiological profile of 100 patients of pancytopenia at a tertiary care centre in India. *Hematology.* 2012;17(2):100–5.
110. Papadaki HA, Palmblad J, Eliopoulos GD. Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: An overview. *Eur J Haematol.* 2001;67(1):35–44.
111. Tsaknakis G, Gallì A, Papadakis S, Kanellou P, Elena C, Todisco G, et al. Incidence and prognosis of clonal hematopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Blood.* 2021;138(14):1249–57.

15. ANEXOS

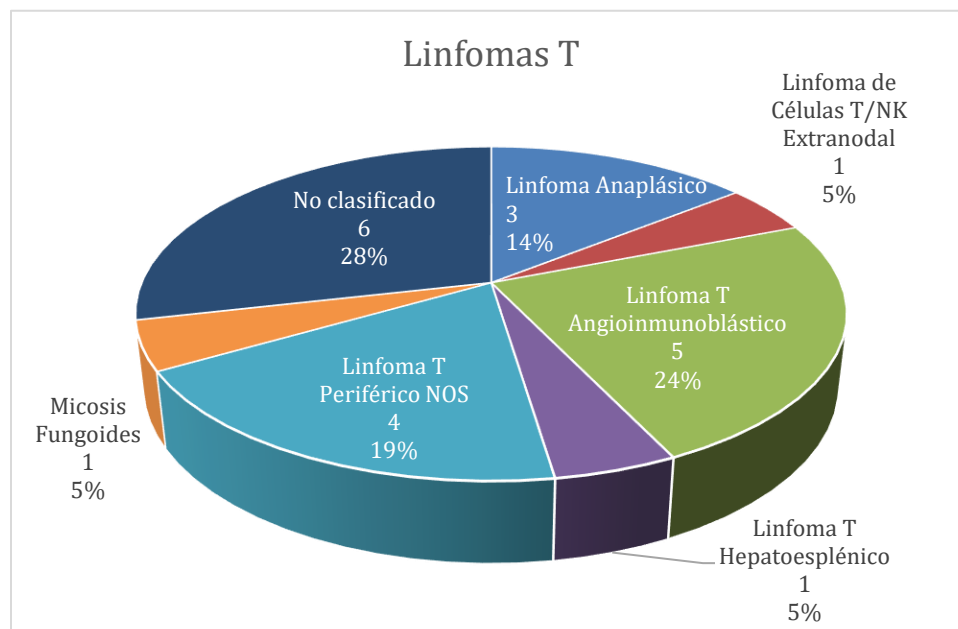
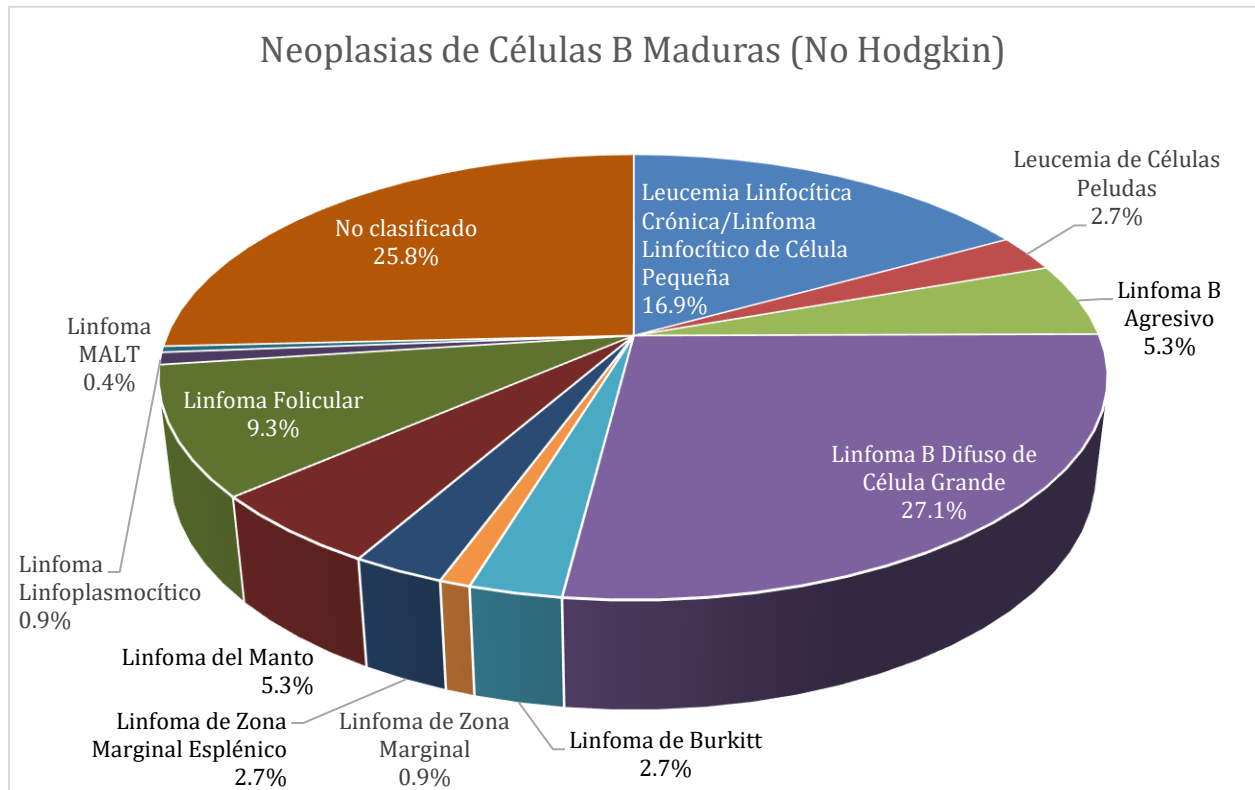
ANEXO 1. Limitaciones reportadas para la interpretación de las biopsias de médula ósea valoradas en el laboratorio de patología entre 2017 y 2022.

Aspiración, Colapso, Fragmentación y/o Hemorragia	20	10.2%
Fijación/Decalcificación Prolongada	1	0.5%
Histoquímica	17	8.6%
Inmunohistoquímica	123	62.4%
Representación escasa	33	16.8%
No Especificado	3	1.5%
Total	197	



ANEXO 2. Distribución de las entidades documentadas en el registro de médulas óseas valoradas en el laboratorio de patología de 2017-2022

Aplasia	21	1.5%
Hemoglobinuria Paroxística Nocturna	3	0.2%
Leucemia Linfoblástica Aguda	39	2.8%
Leucemia Mieloide Aguda	67	4.8%
Leucemia No Clasificada	2	0.1%
Leucemia de Células T Maduras	9	0.6%
Leucemia/Linfoma No Clasificado	25	1.8%
Linfoma Hodgkin	33	2.3%
Linfoma No Hodgkin y Otras Neoplasias de Células B Maduras	225	16.0%
Linfoma T	21	1.5%
Mastocitosis	9	0.6%
Neoplasia de células plasmáticas	203	14.4%
Neoplasia Mielodisplásica	40	2.8%
Neoplasia Mieloproliferativa Crónica	117	8.3%
Neoplasia No Hematolinfoide	35	2.5%
Neoplasias de Células Dendríticas	1	0.1%
Neoplasias Mielodisplásicas/Mieloproliferativas	18	1.2%
Neoplasias Mieloides Secundarias	1	0.1%
Síndrome Hemofagocítico	2	0.1%
Timoma	1	0.1%
Citopenias	314	22.3%
Citosis	48	3.4%
Otros	173	12.4%
Insuficiente para diagnóstico	1	0.1%
Total	1408	

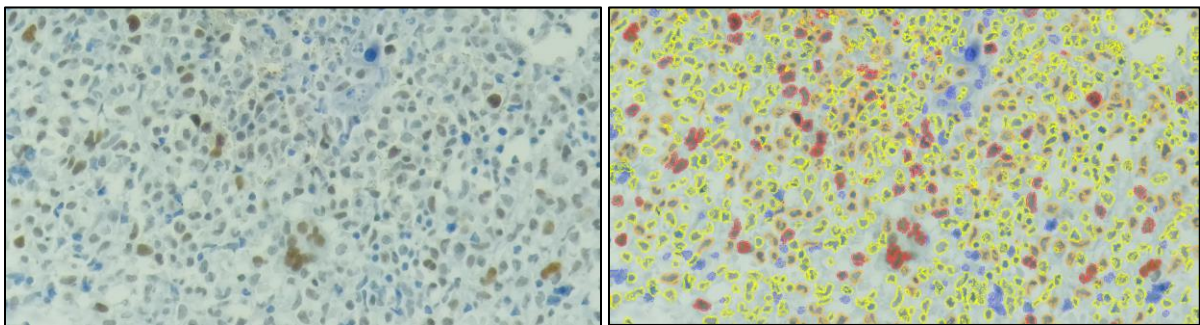


Casos de Leucemias T Maduras (No.)

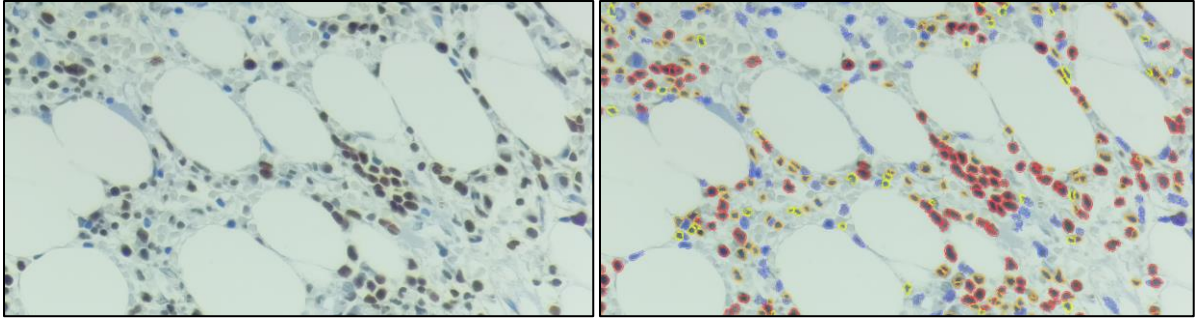
Leucemia de Linfocitos Grandes Granulares	4
Leucemia/Linfoma de Células T del Adulto	1
Síndrome de Sézary	1
No Clasificado	3

ANEXO 3. Resultados del estudio de inmunohistoquímica para EZH2 en los 23 casos.

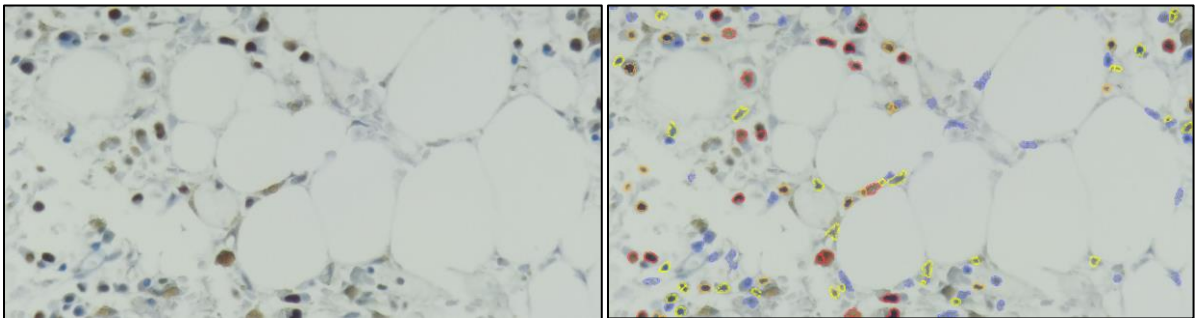
Caso	Celularidad Total (#)	Positividad total (#)	Positivo (%)	Total	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	IHQ score
1	1206	295	0.244610282	0.244610282	0	0	0	0.2
2	2677	0	0	0	0	0	0	0
3	2670	885	0.331460674	0.175655431	0.06928839	0.086516854	0.6	
4	3169	2808	0.886083938	0.557273588	0.24581887	0.08299148	1.3	
5	2121	612	0.28854314	0.205091938	0.055162659	0.028288543	0.4	
6	3203	660	0.206056822	0.148610677	0.034030596	0.023415548	0.3	
7	1922	308	0.16024974	0.081685744	0.033818939	0.044745057	0.3	
8	1977	1058	0.535154274	0.535154274	0	0	0.5	
9	1393	235	0.168700646	0.113424264	0.035893754	0.019382627	0.2	
10	1615	194	0.120123839	0.086687307	0.022910217	0.010526316	0.2	
11	1388	361	0.260086455	0.126080692	0.087896254	0.04610951	0.4	
12	1517	1058	0.697429136	0.085036256	0.290046144	0.322346737	1.6	
13	1831	709	0.387220098	0.21572911	0.096668487	0.074822501	0.6	
14	373	205	0.549597855	0.225201072	0.198391421	0.126005362	1	
15	1639	1502	0.916412447	0.183648566	0.248932276	0.483831605	2.1	
16	1800	493	0.273888889	0.115	0.053888889	0.105	0.5	
17	2419	1213	0.501446879	0.186027284	0.128978917	0.186440678	1	
18	3357	776	0.231158773	0.163836759	0.067322014	0	0.3	
19	2353	567	0.240968976	0.240968976	0	0	0.2	
20	868	755	0.869815668	0.184331797	0.282258065	0.403225806	2	
21	2644	732	0.276853253	0.274962179	0.001891074	0	0.3	
22	2570	753	0.292996109	0.140077821	0.067315175	0.085603113	0.5	
23	1623	838	0.516327788	0.275415896	0.126309304	0.114602588	0.9	



Positividad en el 88.61% de la celularidad, predominantemente tenue (+1, 55.72%) e intermedia (+2, 24.58%). El IHQ score fue de 1.3.



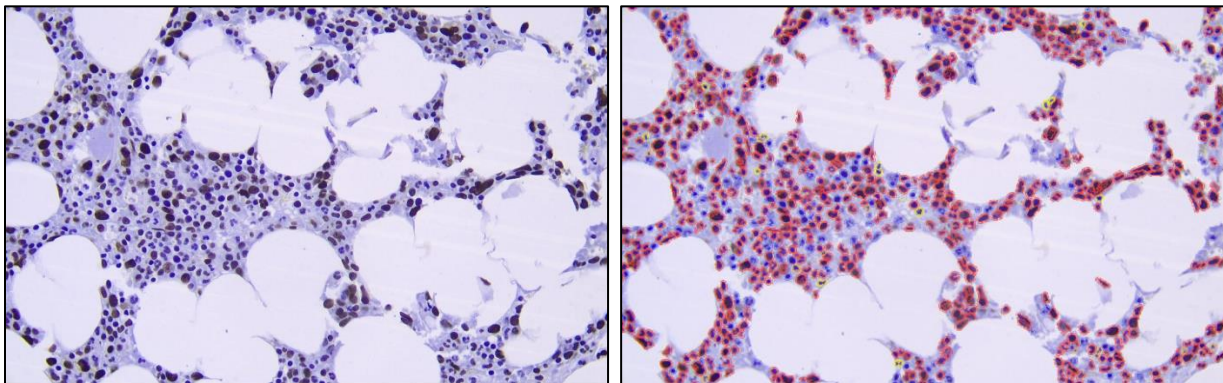
Positividad en el 69.74% de la celularidad, predominantemente intermedia (+2, 29%) e intensa (+3, 32.23%). El IHQ score fue de 1.6.



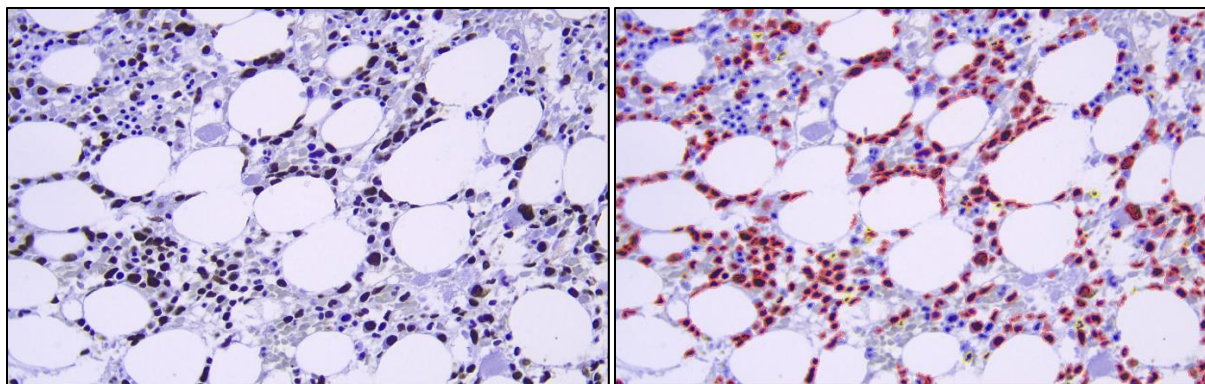
Positividad en el 54.98% de las células. El IHQ score fue de 1. Abundantes histiocitos, algunos cargados de hemosiderina que dificultan la valoración

ANEXO 4. Resultados del estudio de inmunohistoquímica para H3K27me3 en los 23 casos.

Caso	Celularidad Total (#)	Positividad total (#)	Positivo Total (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)
1	524	187	0.356870229	0.072519084	0.06870229	0.215648855
2	1429	103	0.072078376	0.058782365	0.011896431	0.00139958
3	2516	1244	0.494435612	0.080683625	0.069554849	0.344197138
4	1364	611	0.447947214	0.153225806	0.08431085	0.210410557
5	995	174	0.174874372	0.042211055	0.015075377	0.11758794
6	1055	461	0.436966825	0.075829384	0.071090047	0.290047393
7	1304	700	0.536809816	0.075153374	0.060582822	0.40107362
8	947	410	0.432946146	0.165786695	0.026399155	0.240760296
9	1005	253	0.251741294	0.053731343	0.060696517	0.137313433
10	1779	364	0.204609331	0.056211355	0.048903879	0.099494098
11	924	432	0.467532468	0.072510823	0.05952381	0.335497835
12	670	461	0.688059701	0.020895522	0.040298507	0.626865672
13	1688	1248	0.739336493	0.082345972	0.072867299	0.584123223
14	378	350	0.925925926	0.047619048	0.113756614	0.764550265
15	1279	1175	0.918686474	0.068021892	0.081313526	0.769351056
16	1204	938	0.779069767	0.079734219	0.074750831	0.624584718
17	1853	967	0.521856449	0.104155424	0.148407987	0.269293038
18	1587	851	0.536231884	0.095778198	0.086956522	0.353497164
19	1205	663	0.550207469	0.100414938	0.097095436	0.352697095
20	642	342	0.53271028	0.208722741	0.185358255	0.138629283
21	1879	637	0.339010112	0.261309207	0.036189462	0.041511442
22	795	624	0.78490566	0.01509434	0.013836478	0.755974843
23	1205	1002	0.83153527	0.009128631	0.010788382	0.811618257



Positividad nuclear en el 78.4% de la celularidad predominantemente intensa (+3)



Positividad nuclear en el 68.7% de la celularidad predominantemente intensa (3+)