



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

**Estudi mutacional i de patrons de metilació en  
pacients amb síndromes mielodisplàstiques d'alt  
risc i leucèmia aguda mieloide secundària tractats  
amb fàrmacs hipometilants.**

**Doctoranda:** Marta Cabezón Marco

**Directors:** Evarist Feliu Frasnado

Lurdes Zamora Plana

**Tutor:** Evarist Feliu Frasnado

Barcelona, 2020

## **1.AGRAÏMENTS**

Bé, ja ens trobem aquí, en l'última fase abans de dipositar la tesi... els agraïments. Per alguns, la part més senzilla, per altres, la més complicada. Ara toca asseure's, respirar fons, fer un cop d'ull al passat i donar les gràcies a tota la gent que ha fet possible que avui estigués jo aquí, davant de l'ordinador, escrivint els agraïments. Hi ha tanta gent a la qui li vull donar les gràcies, que espero no deixar-me ningú en aquest procés que al final ha durat.... més de set anys! Com passa el temps!

Però no puc començar a donar les gràcies a tots els que m'heu acompanyat en aquest procés d'escriure la tesi doctoral, sense fer un esment molt gran a aquelles persones que em van donar l'oportunitat d'entrar a treballar a l'Hospital Germans Trias i Pujol quan jo era una recent llicenciada de només 22 anys. La Dra **Fuensanta Millá** i el **Miquel Tarón**, van fer possible que entrés al mercat laboral, primer com una becària de la "Fundació per a la investigació clínica i molecular del càncer de pulmó" i després com a tècnic especialista de la Unitat de Biologia Molecular del Laboratori d'Hematologia de l'Institut Català d'Oncologia. Els hi estic plenament agraïda de que em donessin aquella oportunitat i que, 17 anys més tard, encara estigui per aquí aprenent dels meus companys i gaudint de la meva feina. Però com vaig arribar a Can Ruti? Li tinc que donar les gràcies a la **Neus**, companya de facultat, bona amiga i badalonina fins la medul·la! Per aquell llavors, ella estava de pràctiques a la Unitat de Citogenètica i un dia, quan estàvem a classe, em va dir que buscaven gent per obrir una Unitat de Biologia Molecular. Jo pensava que era impossible que m'agafessin, ja que no tenia cap tipus de noció pràctica (teòrica si, és clar!), però resulta que la sort estava de la meva part... Crec que del que em va passar s'anomena "estar en el lloc oportú en el moment precís". D'aquella època recordo amb afecte tota la gent que em va ajudar a entendre millor l'hematologia: les explicacions de la **Isabel**, el **Javier**, la **Marisol** i la **Neus** sobre la citogenètica (sempre m'ha semblat difícilíssima i alguns dels seus "trucs" per diferenciar els cromosomes no hi havia qui les entengués... què és això que "la X porta biquini"?), la citologia amb el **Tomàs**, la citometria amb el **Jordi Juncà**, etc... I òbviament no em puc oblidar dels clínics: el **Dr Ribera**, la **Blanca**, el **Juanma**, la **Christelle**, l'**Alonso**, la **Montse**, l'**Albert**, etc... Però no només els facultatius van ser mestres pacients, també en aquella època em van acompanyar en aquest viatge pel laboratori: la **Rosa**, la **Nani**, l'**Alicia**, la **Tere**, l'**Àngels**, la **Manoli**, la **Nuria**, la **Mari**, i un llarg etcètera!

Una mica més tard, amb l'arribada de la **Lurdes**, la Unitat de Biologia Molecular va començar a ser una realitat, i és que hi ha poca gent tant treballadora i alhora tan pròxima com ella. Sempre amb ganes d'aprendre i amb una paciència infinita per a ensenyar als demés, sempre li he dit que ella és una "ment inquieta" i no sempre fàcil de seguir! Està clar que sense ella

aquesta tesi no hagués vist mai la llum. El temps va passant i les tècniques moleculars agafen importància en quant al diagnòstic, pronòstic i seguiment de les neoplàsies hematològiques. Cada vegada tenim més feina i es necessita més gent. Arriben al laboratori la **Diana** i la **Sílvia**, dues persones importantíssimes dins el grup molecular i òbviament imprescindibles per la realització d'aquesta tesi. El laboratori sense les seves històries, la seva energia i els seus somriures no seria el mateix! Pel laboratori de molecular també han passat estudiants de doctorat, com la **Laura** i el **Jordi** (ara ja doctors tots dos). Ha estat un plaer compartir dies de feina amb ells, tots dos amb un caràcter encantador, sempre disposats a ajudar i a aprendre! Ara no compartim laboratori, però sí edifici! I encara podem passar bones estones al passadís, al *coffee corner* o a la cafeteria (bé, això era abans que la pandèmia del coronavirus capgirés tota la nostra vida). I de manera més recent, van arribar la **Itzi** i el **Pepe**, que tot i que ja ens coneixíem de feia temps (de la meua època de becària del grup de càncer de pulmó) ara ja no m'imagino la unitat de biologia molecular sense les seves bromes i les seves cançons de "gramola". Finalment, per consolidar el grup tal i com el coneixem actualment, va arribar el **Lluís**, la persona més esportista del laboratori! Tant fa maratons, com triatlons... no hi ha qui el pari! I tot i que no pertany específicament al grup de molecular, no puc oblidar-me de la **Natàlia**! Sort que la tenim a ella, que al ser la "pipiola" del grup, ens posa al dia de quina és la música que sona actualment o d'aplicacions útils per la vida!

Com he dit, aquest és un viatge d'anys i pel laboratori passa moltíssima gent, que d'una manera o d'una altra han influenciat en la meua manera de treballar i de veure i viure la vida: a citogenètica tenim l'**Adela**, l'**Aleix** i la **Carmen**. Els nostres dies al laboratori no serien el mateix sense les seves trucades: "quan podrem punxar? Ens espereu? A les 12h se m'acaba la PCR..." I les seves visites per analitzar les QFs. L'**Elisa**, una hematòloga multidisciplinària, que tant et fa la coagulació, com et mira una citologia o t'informa una citometria, i sempre amb un somriure a la cara. El **Marc**, ara responsable de citometria, però que ens vam conèixer quan encara era estudiant de medicina i va voler fer unes pràctiques al laboratori de molecular. Ja llavors demostrava una gran passió per la feina i és una altra "ment inquieta" del laboratori... Si mai trobeu junts a la Lurdes, la Blanca i el Marc, tremoleu. Segur que estan maquinant algun projecte nou! La **Inés**, que amb l'estudi de les talassèmies ha fet la seva introducció al món de la molecular! La pràctica fa mestres, i ara cada vegada ens ocupa menys temps la campana! Després de tants anys, han estat molts els residents amb els quals hem compartit estones de laboratori: l'**Esther**, la **Natàlia**, la **Susanna**, la **Sònia**, el **Ferran**, l'**Alfons**, la **Laia**, l'**Esther**, la **Inés**, la **Míriam**, la **Cristina**, el **Marc**, el **Jesús**, l'**Alberto**, la **Susanna**, l'**Anna**, la **Marta**, la **Clara**, la **Mònica**, la **Mireia**, la **Gigi**, la **Maria**, etc..

De tota la gent de l'àtic haig de fer una menció especial a la **Blanca**, la **Maria José** i l'**Olga**. Moltes gràcies noies, m'heu ajudat tant... reclutant pacients, buscant informació en les bases de dades, amb l'estadística... sense la vostra ajuda cap dels estudis que he presentat hagués estat possible!!! Us he incordiat infinitat de vegades, sobretot a tu Olga... i sempre has respost a les meves preguntes amb un somriure a la cara! Moltes gràcies!

Als promotors de l'estudi CETLAM SMD-09, en **Joan Bargay** i la **Lurdes**! Està clar que sense la seva empenta i iniciativa en voler saber més, no s'hagués creat aquest protocol! I sense aquest protocol... no hi hauria aquesta tesi! Moltes gràcies! Tampoc em puc oblidar de totes les persones que formen part del **grup CETLAM**, ja que sense el seu esforç i constància no hi hauria els pacients inclosos i les mostres no haguessin arribat al laboratori per a que les estudiéssim. I òbviament agrair als **pacients** la seva generositat en voler participar a l'estudi. El fruit d'aquesta tesi és gràcies a tots ells!

Al grup de genòmica i bioinformàtica del IMPPC: el **Lauro**, la **Raquel**, el **Xavi**, el **Guerau** i el **Gabriel**. I al grup de Genòmica reguladora liderat per la **Tanya Vavouri** i amb la col·laboració de la **Yulia Medvedeva**. Tots ells ens van ajudar a l'inici dels estudis de metilació. Uns inicis que no van ser fàcils, ja que són completament diferents als que estàvem acostumats amb les tècniques assistencials!

La creació de l'Institut de Recerca contra la leucèmia Josep Carreras, campus Can Ruti ha fet que estiguéssim en contacte amb grups de recerca i que d'aquesta relació aprenguéssim tots. Els primers en arribar, el grup de SMD del **Francesc Solé**, al principi format per la **Mar**, la **Vera** i la **Laura**, amb les quals vaig passar moltes hores i molts nervis amb els inicis dels panells de NGS. Quin neguit quan els bioanàlitzers no donaven el perfil que tocava i s'havia de tornar a fragmentar! El Covaris tenia els seus "trucs"... I òbviament agrair a la **M<sup>a</sup> Pilar** i l'**Anna**, de la Plataforma de Genòmica del IGTP, la seva inestimable ajuda amb l'inici dels estudis de NGS. La vostra experiència i suggeriments van ser claus per agilitzar els anàlisis dels panells de NGS. Amb el temps, el grup de SMD va créixer i van arribar el **Francisco**, la **Pame**, la **Nuri**, la **Rocio**, la **Jessica**... Amb molts d'ells no he compartit laboratori, però sí cursos i congressos de SMD. Sempre un plaer! El grup del **Marcus Buschbeck**, sobretot la relació amb la **Raquel** i el **Roberto**. La Raquel, i els seus Ficolls, les teves visites al laboratori sempre són benvingudes... sempre i quan no ens "acaparís" la centrifuga! ;) I què puc dir del Roberto? Sense tu l'estudi de metilació no hagués vist mai la llum! Jo encara estaria intentant obrir l'arxiu amb un excel! Moltes gràcies per tot, perquè després de tota la feina que t'he donat, els meus mails (la

majoria d'ells quilomètrics!) i els "petits" problemes amb les versions de les bases de dades... encara em dirigeixes la paraula! ☺

Als meus directors de tesi, el **Dr Feliu** i la **Lurdes**. Què puc dir d'ells que no sapiguen ja? Són dues persones amb un coneixement infinit, una manera de ser excepcionals i sempre amb un somriure a la cara. Moltes gràcies per les vostres correccions, sempre enriquidores, per la vostra paciència i la vostra mà esquerra. Les vostres observacions sempre han estat en positiu i això és d'agrair!

I per anar acabant, entrarem a la part més personal. Gràcies a tots els amics. La **Júlia** i la **Cristina**, companyes de l'escola Pia Balmes i que tot i que actualment vivim lluny i ens veiem poc, sabem que ens tenim a una trucada de telèfon. Als pares de l'escola que s'han convertit ens amics, las **Marta**, el **Juan**, l'**Elisabeth** i l'**Àxel**, quan ens les nostres trobades m'aneu preguntant per l'evolució de la tesi... Sé que no és el tema més emocionant del món, però tot i així m'escolteu i em doneu suport. A la meva família i la família política. Els millors que hauria pogut imaginar! Gràcies als meus **sogres**, la **Quimeta** i el **Blas**, que m'ajuden en tot el que poden i més! I gràcies als meus **pares**, l'**Ana** i el **Pablo**, que ens han ensenyat al **Pau**, l'**Ignasi** i a mi, que les coses importants a la vida requereixen esforç, i que la feina ben feta no té preu! Gràcies per escoltar-me, tot i que la majoria de vegades no sabeu de què us estic parlant... però tot i així, em deixeu fer... Gràcies papes, sou un gran exemple a seguir! Us estimo! No sabeu lo molt que us he enyorat aquestes setmanes que no ens hem pogut veure ni abraçar! I tot i que fa molt de temps que no estan amb nosaltres, aquesta tesi també és en part de les meves **iaies**... Recordo quan els hi deia que treballava a la unitat de biologia molecular i em contestaven: "nena, això no serà perillós?". O lo orgulloses que estaven de tenir una neta treballant en un hospital... i em repetien: "qui anava a dir que amb una carrera tan "rara" com Biologia, acabaries treballant a un hospital com Can Ruti!". I finalment, dono les gràcies al meu marit, l'**Albert**, i a la família que he creat amb ell. Gràcies per ser el meu suport emocional! Quan m'escoltes i deixes que ho tregui tot... em dones pau i em fas veure les coses amb perspectiva. Sense tu estaria perduda! Ets el meu marit, però també el meu amic, psicòleg, fisioterapeuta, informàtic... i el més important... el que m'ha "regalat" les dues persones més importants de la meva vida! Els nostres fills, l'**Alba** i l'**Arnau**, les joies de casa nostra. Sé que aquesta tesi m'ha "robat" hores d'estar amb ells, però també espero que els hi hagi ensenyat que les coses que volem, necessiten el seu temps i més si es volen fer bé!

Així que a tots vosaltres.... gràcies, gràcies i mil vegades... **GRÀCIES!!!!**

## **2. GLOSSARI**



**5hmC:** 5-hidroximetilcitosina

**5mC:** 5 metil-citosina

**ADN:** àcid desoxiribonucleic

**ADNdc:** ADN de doble cadena

**AEE:** agents estimulants de l'eritropoesi

**AHM:** agents hipometilants

**AIR:** acondicionament d'intensitat reduïda

**Alo-TPH:** trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics

**AMO:** aspirat de moll d'os

**AR:** àcid retinoic

**AR:** Anèmia refractària

**AREB:** Anèmia refractària amb excés de blasts

**AREB-1:** Anèmia refractària amb excés de blasts tipus 1

**AREB-2:** Anèmia refractària amb excés de blasts tipus 2

**AREB-t:** Anèmia refractària amb excés de blasts en transformació

**ARN:** àcid ribonucleic

**ARNm:** àcid ribonucleic missatger

**ARSA:** Anèmia refractària amb sideroblasts en anell

**AZA:** 5-azacitidina

**CC:** citogenètica convencional

**CCUS:** citopènia clonal de significat incert (*clonal cytopenia of undetermined significance*)

**CFC-G:** cèl·lules formadores de colònies de granulòcits neutròfils

**CFC-GM:** cèl·lules formadores de colònies de granulòcits i monòcits

**CFC-M:** cèl·lules formadores de colònies de macròfags

**CFU-Ba:** unitat formadora de colònies de basòfils

**CFU-E:** unitat formadora de colònies eritroides

**CFU-Eos:** unitat formadora de colònies d'eosinòfils

**CFU-L:** unitat formadora de colònies limfoide

**CFU-LM:** unitat formadora de colònies limfoide mieloide

**CFU-M:** unitat formadora de colònies mieloide

**CFU-Meg:** unitat formadora de colònies de megacariòcits

**CH:** concentrat d'hematies

**CHIP:** hematopoesi clonal de potencial indeterminat (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*)

**CRDM:** Citopènia refractària amb displàsia multilínia

**CRDU:** Citopènia refractària amb displàsia unilínia

**CRT:** terminació cíclica reversible (*cyclic reversible termination*)

**DEC:** decitabina

**EPO:** eritropoetina

**ERV:** retrovirus endògens (*endogenous retroviruses*)

**FAB:** Grup Franc-Americà-Britànic

**FISH:** Fluorescence in-situ hybridization

**G-CSF:** factor estimulator de colònies de granulòcits

**GESMD:** Grup Espanyol de Síndromes Mielodisplàstiques

**GO:** *Gene Ontology*

**GST:** gen supressor de tumors

**GTPasa:** proteïna guanosina trifosfatasa

**Hb:** Hemoglobina

**HDAC:** Histona deacetilasa

**HDACi:** inhibidors d'histones deacetilases

**HMT:** histona metiltransferasa

**ICE:** Idarrubicina, citarabina i etopòsid

**ICUS:** citopènia idiopàtica de significat incert (*idiopathic cytopenia of undetermined significance*)

**IPSS:** Índex Pronòstic Internacional (*International Prognostic Scoring System*)

**IPSS-R:** Índex Pronòstic Internacional revisat (*Revised International Prognostic Scoring System*)

**ISCN:** Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenètica Humana (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*)

**LAM:** leucèmia aguda mieloide

**LAMs:** leucèmia aguda mieloide secundària

**LEC:** Leucèmia eosinofílica crònica

**LMC:** Leucèmia mieloide crònica

**LMCa:** Leucèmia mieloide crònica atípica, *BCR-ABL1* negativa

**LMMC:** leucèmia mielomonocítica crònica

**LMMJ:** Leucèmia mielomonocítica juvenil

**LM-PCR:** lligació mitjançada per PCR (*ligation mediated PCR*)

**LNC:** Leucèmia neutrofílica crònica

**ME:** malaltia estable

**MFP:** Mielofibrosi primària

**miRNAs:** micro àcid ribonucleic

**MO:** medul·la òssia

**NGS:** seqüenciació de nova generació (*Next Generation Sequencing*)

**NMP:** Neoplàsia mieloproliferativa

**OMS:** Organització Mundial de la Salut

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

**PRC2:** complex repressiu del polycomb (*Polycomb repressive complex*)

**Pre-ARNm:** pre-ARN missatger

**PV:** Policitemia vera

**RAR:** receptor d'àcid retinoic

**RARE:** element de resposta a àcid retinoic (*retinoic acid-response element*)

**RC:** resposta completa

**RCM:** Remissió completa medul·lar

**RH:** resposta hematològica

**RP:** resposta parcial

**RXR:** receptor X de l'àcid retinoic

**SG:** supervivència global

**SLP:** supervivència lliure de progressió

**SMD del(5q):** síndrome mielodisplàstica amb deleció del cromosoma 5

**SMD/NMP:** Neoplàsies Mielodisplàstiques/Mieloproliferatives

**SMD/NMP-I:** Neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa inclassificable

**SMD:** síndrome mielodisplàstica

**SMD-EB:** síndrome mielodisplàstica amb excés de blasts

**SMD-SA:** síndrome mielodisplàstica amb sideroblasts en anell

**SNP:** polimorfisme d'un únic nucleòtid (*single nucleotide polymorphism*)

**SNP-A:** arrays de SNPs (*single nucleotide polymorphism arrays*)

**snRNP:** petites ribonucleoproteïnes nuclears (*small nuclear ribonucleoproteins*)

**SP:** sang perifèrica

**TE:** Trombocitèmia essencial

**TID:** tractament immunodepressor

**TNF:** factor de necrosi tumoral (*tumoral necrosis factor*)

**TPH:** trasplant de progenitors hematopoètics

**TSS:** lloc d'inici de la transcripció (*transcription start sites*)

### **3. ÍNDEX**

<b>1.AGRAÏMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>2.GLOSSARI.....</b>	<b>7</b>
<b>3.INDEX.....</b>	<b>13</b>
<b>4.RESUM.....</b>	<b>18</b>
<b>5.INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1. L'hematopoesi.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2. Neoplàsies mieloides.....</b>	<b>27</b>
<b>5.3. Les síndromes mielodislàstiques.....</b>	<b>30</b>
5.3.1 Etiologia de les síndromes mielodislàstiques.....	31
5.3.2 Característiques clíniques.....	31
5.3.2.1. Anèmia.....	31
5.3.2.2. Trombocitopènia.....	31
5.3.2.3. Leucopènia i infeccions.....	31
5.3.3 Diagnòstic.....	32
5.3.3.1. Diagnòstic i classificació.....	32
5.3.3.2. Morfologia i histologia.....	33
5.3.3.3. Classificació de les SMD.....	34
5.3.3.4. Diagnòstic diferencial.....	39
5.3.4 Característiques immunofenotípiques.....	40
5.3.5 Característiques genètiques.....	41
5.3.5.1. Perfil citogenètic.....	41
5.3.5.2. Perfil mutacional.....	43
5.3.5.3. Perfils epigenètics.....	52
5.3.5.3.1. Metilació.....	55
5.3.6 Índexs pronòstics de les síndromes mielodislàstiques.....	58
5.3.6.1 IPSS.....	58
5.3.6. WPSS.....	59
5.3.7. IPSS-R.....	59

5.3.7	Tractament.....	61
5.3.7.1	Tractament de les SMD d'alt risc.....	61
<b>6.</b>	<b>HIPÒTESI.....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>OBJECTIUS.....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>MATERIAL I MÈTODES.....</b>	<b>70</b>
<b>8.1.</b>	<b>Tractament.....</b>	<b>73</b>
<b>8.2.</b>	<b>Criteris de resposta.....</b>	<b>75</b>
<b>8.3.</b>	<b>Primer estudi: Anàlisi mutacional d'un panell de 83 gens relacionats amb patologia mieloide.....</b>	<b>79</b>
8.3.1.	Pacients.....	79
8.3.2.	Processament de les mostres.....	80
8.3.3.	Extracció d'ADN.....	82
8.3.4.	Estudi de NGS mitjançant un panell dirigit de 83 gens relacionats amb patologia mieloide.....	84
8.3.4.1-	Fragmentació de l'ADN mitjançant Covaris.....	85
8.3.4.2-	Generació de les llibreries.....	88
8.3.4.3-	Bioquímica de la seqüenciació en el MiSeq.....	90
8.3.4.4-	Interpretació dels resultats.....	92
8.3.4.5-	Anàlisi estadístic.....	93
<b>8.4.</b>	<b>Segon estudi: metilació global de l'ADN.....</b>	<b>94</b>
8.4.1.	Pacients.....	94
8.4.2	Processament de les mostres.....	94
8.4.3	Extracció d'ADN.....	94
8.4.4	Conversió amb bisulfit.....	95
8.4.5	Arrays de metilació.....	98
8.4.6	Anàlisi dels arrays de metilació.....	101



<b>9.RESULTATS.....</b>	<b>102</b>
<b>9.1 Primer estudi: Anàlisi mutacional d'un panell de 83 gens associats a patologia mieloide en pacients tractats segons el protocol CETLAM SMD-09.....</b>	<b>103</b>
9.1.1. Característiques dels pacients i tractament administrat.....	103
9.1.2. Citogenètica convencional.....	105
9.1.3. Seqüenciació de gens diana.....	105
9.1.4. Anàlisi mutacional al diagnòstic.....	105
9.1.5. Relacions entre mutacions gèniques i variables clíniques.....	101
9.1.6. Anàlisis de supervivència global i supervivència lliure de progressió.....	112
9.1.7. Factors predictius de resposta a teràpia amb agents hipometilants.....	116
9.1.8. Seguiment mutacional durant la resposta, recaiguda o progressió a LAM.....	118
<b>9.2 Segons estudi: metilació global de l'ADN.....</b>	<b>123</b>
9.2.1 Característiques dels pacients.....	123
9.2.2 Anàlisi de metilació global al diagnòstic.....	124
9.2.3 Diferència entre els perfils de metilació de les mostres al diagnòstic i els controls sans.....	125
9.2.4 Diferent signatura de metilació al diagnòstic segons el tipus de resposta a AZA.....	126
9.2.5 Valor pronòstic de la metilació de l'ADN en gens específics.....	129
9.2.6 Impacte de les mutacions en gens que afecten a la metilació de l'ADN al diagnòstic de la malaltia.....	131
2.7 Estudis de metilació global en les mostres de seguiment.....	134
<b>10.DISCUSSIÓ.....</b>	<b>138</b>

10.1.	Utilització de tècniques moleculars en l'estudi de les SMD.....	140
10.2.	Seqüenciació massiva dirigida.....	140
10.2.1.	Incidència i caracterització del tipus de mutacions.....	141
10.2.2.	Impacte de les mutacions en el pronòstic de la malaltia.....	141
10.2.3.	Impacte de les mutacions durant l'evolució de la malaltia.....	143
10.2.4.	Impacte de les mutacions en la resposta al tractament.....	144
10.3.	Metilació global de l'ADN.....	145
10.3.1.	Alteracions en la metilació de l'ADN en les SMD i LAMs respecte donants sans.....	145
10.3.2.	Perfil de metilació al diagnòstic predictor de resposta a AZA.....	145
10.3.3.	Diferències en la metilació en pacients amb diferents característiques moleculars.....	147
10.3.4.	Perfils de metilació durant el tractament.....	149
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>150</b>
<b>12.</b>	<b>LINIES DE FUTUR.....</b>	<b>153</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>155</b>

## **4. RESUM**

## **RESUM**

Les síndromes mielodisplàstiques (SMD) són un conjunt heterogeni de neoplàsies hematopoètiques clonals caracteritzades per citopènies, displàsia en una o més línies cel·lulars, hematopoesi inefectiva, alteracions genètiques recurrents i un augment del risc de desenvolupar una leucèmia aguda mieloide (LAM). Durant molt de temps, s'ha considerat que les neoplàsies eren resultat d'alteracions cromosòmiques, numèriques i/o estructurals, que induïen mutacions en gens que permetien tant l'activació d'oncogens com la inactivació de gens supressors de tumors. Però noves evidències han demostrat que almenys en part, el fenotip tumoral i el comportament biològic diferenciat que tenen les cèl·lules tumorals, es deu també a la presència de canvis heretables en les formes d'expressió gènica que succeeixen sense que es donin canvis en la seqüència primària dels nucleòtids. Aquesta regulació de l'activitat transcripcional és el resultat d'una reorganització de l'estructura tridimensional de la cromatina, que modula la seva accessibilitat a factors de transcripció i proteïnes implicats en els processos d'expressió gènica, i és el que es coneix com epigenètica. La teràpia epigenètica, amb l'ús d'agents hipometilants (AHM), és eficaç en el tractament dels pacients amb SMD d'alt risc i LAM que no són candidats a quimioteràpia intensiva o trasplantament al·logènic. Tanmateix, les taxes de resposta al tractament amb AHM són baixes i és necessari trobar biomarcadors pronòstics i predictius de la resposta al tractament.

La caracterització genètica i epigenètica de les SMD i les LAM secundàries (LAMs) és important no només per a entendre la biologia d'aquestes entitats sinó també des d'un punt de vista clínic per a definir millor el diagnòstic, pronòstic i seleccionar el tractament de la forma més personalitzada possible.

En aquesta tesi s'aborda l'estudi de les SMD d'alt risc i les LAMs tant des del punt de vista genètic com epigenètic. En la primera part del treball es caracteritza genèticament 39 pacients diagnosticats de SMD d'alt risc o LAMs inclosos en el protocol CETLAM SMD-2009 tractats homogèniament amb azacitidina (AZA). Aquesta caracterització genètica es va fer mitjançant seqüenciació massiva de nova generació (NGS) utilitzant un panell costumitzat de 83 gens relacionats amb patologia mieloide. El 95% dels pacients presentaven almenys una mutació i els gens més freqüentment alterats van ser: *TP53* (49%), *DNMT3A* (21%) i *SRSF2* (18%); seguits de *TET2* (15%) i *U2AF1* (15%). Tot i que la cohort analitzada en aquesta tesi està formada per pacients d'alt risc (segons IPSS o IPSS-R), vam poder observar que determinats marcadors moleculars, com ara mutacions en *TP53* i *SRSF2*, eren capaços de subclassificar els pacients en diferents grups pronòstics. La taxa de resposta va ser del 55%, però no vam poder

correlacionar la presència de mutacions en *TET2* i *TP53* amb la resposta a AZA. Els pacients amb LAMs presentaven més mutacions que els pacients amb SMD d'alt risc i la mitjana de mutacions va augmentar a la recaiguda, donant suport a la idea que en estadis avançats de la malaltia hi ha una major complexitat genòmica. Per tant, els nostres resultats indicarien que la detecció d'anomalies genètiques en aquest grup de pacients, amb un comportament clínic heterogeni, pot ser d'utilitat tant a l'hora de perfilar el pronòstic com pel seguiment de la malaltia.

En la segona part del treball s'aborda l'estudi de pacients amb SMD d'alt risc i LAMs tractats també amb el protocol CETLAM SMD-2009 però des del punt de vista epigenètic. Per aquest motiu es va estudiar els perfils de metilació global de l'ADN de 75 pacients al diagnòstic i durant el tractament. En aquest protocol, els pacients rebien AZA o tractament intensiu segons l'edat, les comorbiditats i la citogenètica. Al diagnòstic, l'anàlisi no supervisat, no va detectar cap patró de metilació global que permetés diferenciar els pacients segons subtipus citològic, citogenètic o de resposta al tractament. Però aplicant la tècnica del *combined rank* vam ser capaços de determinar un perfil de metilació al diagnòstic definit per 200 sondes capaç de separar els pacients responedors dels pacients no responedors al tractament amb AZA. Estudiant les mostres al seguiment vam confirmar que AZA disminueix la metilació global de l'ADN, però a la nostra cohort el grau de desmetilació no es va correlacionar amb el tipus de resposta. La signatura de metilació definida al diagnòstic no va ser d'utilitat en les mostres tractades per determinar un patró de metilació predictiu de progressió o recaiguda. En conclusió, l'alteració dels patrons de metilació de l'ADN al diagnòstic, en un subconjunt d'illes CpG determinat, pot servir de biomarcador per predir la resposta a AZA, i per tant, creiem que l'estudi d'aquest mecanisme epigenètic pot contribuir a la detecció de gens i vies de senyalització implicats en la malaltia, així com ajudar a identificar nous marcadors pronòstics i de resposta al tractament.

Així doncs, queda palès que les SMD d'alt risc i les LAMs són malalties generades tan per alteracions genètiques com per variacions epigenètiques, i serà l'estudi d'ambdues que ens portarà a un millor coneixement sobre les conseqüències biològiques d'aquestes alteracions i la seva importància en l'hematopoesi humana.

## **SUMMARY**

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of clonal haematopoietic stem cell diseases characterized by cytopenias, dysplasia in one or more myeloid lineages, ineffective haematopoiesis, recurrent genetic abnormalities and increased risk of developing acute myeloid leukaemia (AML). For a long time, neoplasms had been considered as the result of chromosomal alterations, numerical and/or structural, that induce mutations in genes, allowing both the activation of oncogenes and the inactivation of tumour suppressor genes. But new evidence showed that at least in part, the tumour phenotype and the differentiated biological behaviour of tumour cells is also due to the presence of heritable changes in the forms of gene expression that occur without changes in nucleotide's primary sequence. This regulation of transcriptional activity is the result of a reorganization of the three-dimensional structure of chromatin, which modulates its accessibility to transcription factors and proteins involved in gene expression processes, fact that is known as epigenetics. Epigenetic therapy, using hypomethylating agents (HMA), is known to be effective in the treatment of high-risk MDS and AML patients who are not suitable for intensive chemotherapy or allogeneic transplantation. However, treatment response rates to HMA are low and it is an urgent need to find prognostic and predictive biomarkers of treatment response.

The genetic and epigenetic characterization of MDS and secondary AML (sAML) is important not only to understand the biology of these diseases but also from a clinical point of view to better define the diagnosis, prognosis and select the treatment in the most possible personalized way.

This thesis addresses the study of high-risk MDS and sAML from both, genetic and epigenetic point of view. The first part of the work is focused on genetically characterizing a group of 39 patients with MDS and sAML included in the CETLAM SMD-2009 protocol, who have been homogeneously treated with azacitidine (AZA). This characterization has been done by next generation sequencing (NGS) using a custom panel of 83 genes related to myeloid pathology. It was observed that 95% of patients presented at least one mutation, that the most frequently altered genes were *TP53* (49%), *DNMT3A* (21%) and *SRSF2* (18%); followed by *TET2* (15%) and *U2AF1* (15%). Although the entire cohort analysed in this thesis consists of high-risk patients (according to IPSS or IPSS-R), we were able to observe that certain molecular markers, such as mutations in *TP53* and *SRSF2*, were able to subclassify patients in different prognostic groups. Response rate was 55% but we could not correlate the presence of *TET2* and *TP53* mutations with AZA response. Patients with sAML presented more variants than patients with high-risk

MDS, and the average of mutations increased at relapse, supporting the idea that in advanced stages of the disease there is a greater genomic complexity. These results confirm that mutation analysis can add prognostic value to high-risk MDS and sAML patients, not only at diagnosis but also at follow-up.

The second part of the work addresses the disease from an epigenetic point of view, performing global methylation analysis of 75 patients with high risk MDS and sAML, at diagnosis and during treatment, who were included in CETLAM MDS 2009 protocol. In this protocol, patients received AZA or intensive treatment according to age, comorbidities and cytogenetics. At diagnosis, the unsupervised analysis showed that global methylation pattern didn't allowed us to differentiate patients according to the cytological or cytogenetic subtype, or treatment response. But when the *combined rank* analysis was used, we were able to determine a methylation profile at diagnosis defined by 200 probes capable to differentiate patients who responded to AZA treatment from those who did not. Studying follow-up samples, allowed us to confirm that AZA decreases global DNA methylation, but in our cohort the degree of methylation decrease did not correlate with the type of response. The methylation signature detected at diagnosis was not useful in treated samples to determine a methylation pattern predictive of progression or relapse. In conclusion, altered DNA methylation patterns at diagnosis, in a subset of determined CpGs, may serve as a biomarker to predict AZA response, and therefore, we believe that the study of this epigenetic mechanism may contribute to the detection of genes and signalling pathways involved in the disease, as well as may help to identify new prognostic and treatment response markers.

So, it's clear that high risk MDS and sAML are diseases caused by genetic and epigenetic alterations, and it will be the study of both that will lead us to better understand the biological consequences of these alterations and its relevance to human hematopoiesis.

## **5. INTRODUCCIÓ**



## 1. L'hematopoesi

L'hematopoesi o hemopoesi és el procés de formació, desenvolupament i maduració de les cèl·lules sanguínies presents a la sang a partir d'un precursor cel·lular comú i indiferenciat conegut com a cèl·lula mare hematopoètica pluripotencial.

Durant l'etapa embrionària i fetal, l'hematopoesi constitueix primer un fenomen extraembrionari per acabar després ubicant-se en l'embrió, en el fetge i la melsa inicialment i en la medul·la òssia (MO) definitivament. Durant els primers anys de vida la MO vermella es localitza en tots els ossos, però amb el pas dels anys, es converteix en MO groga que es compon majoritàriament de greix i no participa en la formació de la sang. En els adults, la MO vermella es troba ubicada en els ossos plans, com ara les costelles, l'estèrnum, les vèrtebres, el crani, l'escàpula i la pelvis. La MO permet el creixement i diferenciació de les cèl·lules hematopoètiques, i aquest procés està regulat per mecanismes molt complexes que inclouen interaccions de les cèl·lules entre si, amb el microambient, amb factors de creixement i la matriu extracel·lular.

El procés de renovació de les cèl·lules sanguínies i del sistema immune es manté gràcies a una petita població de cèl·lules mare hematopoètiques, pluripotents, localitzades en la MO. Aquestes cèl·lules tenen la capacitat d'autorenovar-se per a mantenir el subministrament de les progènies a llarg termini i, a la vegada, tenen la capacitat de diferenciar-se per a donar lloc a diferents llinatges hematopoètics o línies hematopoètiques. La majoria de les cèl·lules es troben en fase quiescent del cicle cel·lular i només unes poques cèl·lules estan actives, donant lloc a la renovació de les diferents cèl·lules del sistema hematopoètic. La cèl·lula mare hematopoètica es coneix també com "unitat formadora de colònies limfoide mieloide" (*lymphoid myeloid colony forming unit*, CFU-LM), per la seva capacitat de formar in vitro colònies de cèl·lules dels llinatges mieloide i limfoide. La CFU-LM dona lloc a cèl·lules progenitores mieloide (CFU-M) i limfoide (CFU-L). A la seva vegada aquestes cèl·lules progenitores pluripotents donen lloc a altres poblacions compromeses irreversiblement cap a la diferenciació de les diferents línies. Cada tipus cel·lular es desenvolupa en un ambient concret de la MO anomenat nínxol, format per diferents elements del microambient medul·lar que intervenen en el procés de diferenciació cel·lular i que, a més a més, ofereixen a la cèl·lula un suport físic (1).

La **mielopoesi** és el mecanisme de generació i desenvolupament dels elements del llinatge mieloide, poblacions estudiades en aquesta tesi, constituït per les series eritroblàstica,

megacariocítica, granulopoètica i monocítica, així com per les cèl·lules de la matriu òssia. La cèl·lula progenitora mieloide, estimulada pel microambient, dona lloc a diferents tipus de cèl·lules progenitores mono o bipotents, compromeses cap a un dels llinatges mieloides: CFU-E (eritròcits), CFU-Meg (megacariòcits), CFC-GM (granulòcits i monòcits), CFC-G (granulòcit neutròfil), CFC-M (macròfags), CFU-Ba (basòfils) i CFU-Eos (eosinòfils). El compartiment de les cèl·lules progenitores és el responsable de reconstruir el sistema hematopoètic quan aquest pateix un dany o agressió. Sota la influència de diversos estímuls, les cèl·lules progenitores donen lloc a cèl·lules cada vegada més diferenciades denominades precursors hematopoètics (1). A la seva vegada aquestes seran l'origen dels diferents tipus de cèl·lules sanguínies (Figura 1):

- Els **hematies**, eritròcits o glòbuls vermells són les cèl·lules més nombroses de la sang. L'hemoglobina és un dels principals components i la seva funció és transportar l'oxigen als diferents teixits del cos.
- Els **leucòcits** o glòbuls blancs són un conjunt heterogeni de cèl·lules sanguínies que són responsables de la resposta immune, implicades en la defensa de l'organisme davant de les infeccions. Hi ha cinc tipus diferents:
  - Els **neutròfils** són els glòbuls blancs més nombrosos i defensen l'organisme contra infeccions bacterianes i fongs.
  - Els **eosinòfils** són els encarregats de respondre a les infeccions per paràsits, i alhora modulen la resposta al·lèrgica inflamatòria.
  - Els **basòfils** principalment intervenen en les reaccions al·lèrgiques, alliberant histamina, produint vasodilatació. També alliberen heparina, una substància que evitarà la formació de coàguls.
  - Els **limfòcits** es generen a la MO i després emigren a ganglis limfàtics, melsa, amígdals, timus, etc.. Són els encarregats de la immunitat específica o adquirida.
  - Els **monòcits** constitueixen el 5% del total dels glòbuls blancs i la seva funció és arribar a la zona d'infecció per eliminar les cèl·lules mortes i els detritus per mitjà de la fagocitosi. Una vegada els monòcits deixen el torrent sanguini i entren al teixit, es converteixen en **macròfags**.
- Les **plaquetes** són les cèl·lules que prevenen l'hemorràgia amb la formació de coàguls. Es produeixen a la MO a partir dels megacariòcits, que provenen de la cèl·lula mare hematopoètica.

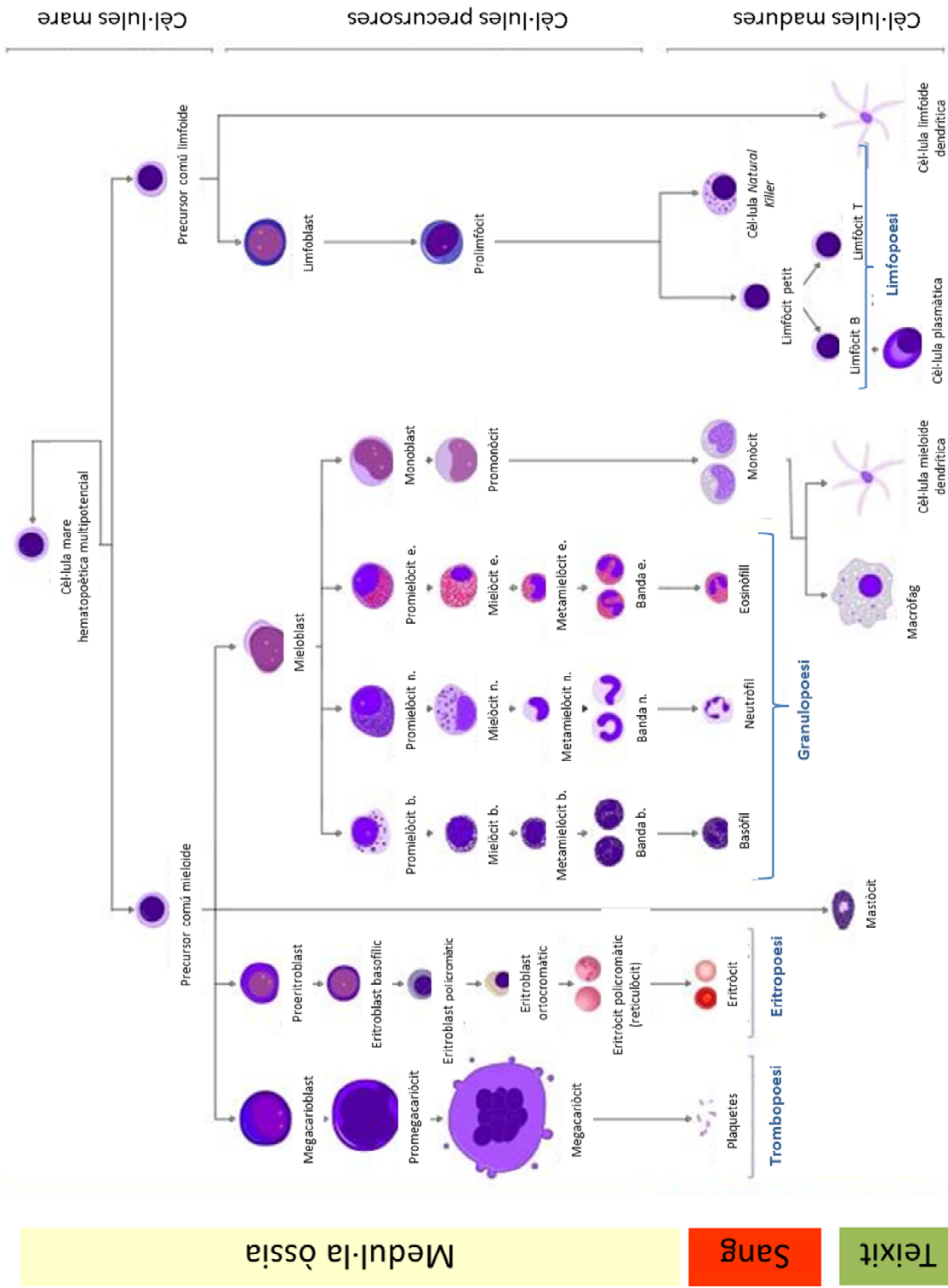


Figura 1. Esquema de l'hematopoesi. Imatge adaptada de <https://en.wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis>

## 2. Neoplàsies mieloides

Les neoplàsies mieloides inclouen tots aquells desordres clonals que afecten a les cèl·lules involucrades en el procés de la mielopoiesi. Les neoplàsies mieloides es classifiquen segons els criteris de classificació de tumors hematopoètics i teixits limfoides de la Organització Mundial de la Salut (OMS), publicada per primera vegada l'any 2001 (OMS 2001) i actualitzada posteriorment al 2008 (OMS 2008) i al 2017 (OMS 2017). Aquesta classificació de les neoplàsies hematològiques es basa en la morfologia de la MO i la SP i en alguns casos, en alguna característica genètica específica.

D'acord amb la classificació de la OMS 2008, utilitzada en aquesta tesi, les neoplàsies mieloides es divideixen en aquestes categories principals (2):

A) **Neoplàsies mieloproliferatives (NMP)**: són malalties clonals de la cèl·lula mare hematopoètica caracteritzada per la proliferació, en MO o SP, d'una o més línies mieloides (granulocítica, eritroide, megacariocítica i mastocítica). Les NMP es caracteritzen per presentar hipercel·lularitat en la MO amb una maduració hematopoètica efectiva i un nombre elevat de granulòcits, eritròcits i/o plaquetes en SP. L'esplenomegàlia i l'hepatomegàlia són símptomes comuns, degut a la proliferació alterada de les cèl·lules hematopoètiques. Poden cursar amb un grau variable de mielofibrosi i en la seva evolució tenen el potencial de patir una progressió de la malaltia i un fallo medul·lar degut a la mielofibrosi, l'hematopoiesi inefectiva o la transformació a una fase blàstica aguda, caracteritzada per la presència de  $\geq 20\%$  de blasts en MO o SP. Les NMP es subdivideixen en vuit categories:

- Leucèmia mioide crònica, *BCR-ABL1* positiva (LMC)
- Leucèmia neutrofílica crònica (LNC)
- Policitemia vera (PV)
- Mielofibrosi primària (MFP)
- Trombocitèmia essencial (TE)
- Leucèmia eosinofílica crònica (LEC)
- Mastocitosi
- Neoplàsia mieloproliferativa inclassificable

**B) Neoplàsies mieloides/limfoides amb eosinofília i alteracions dels gens PDGFRa, PDGFRb o FGFR1:** dins aquesta categoria totes les neoplàsies comparteixen la presència de trànscrips de fusió, o de forma poc freqüent la presència d'una mutació, que comporta l'expressió aberrant de tirosina cinases. L'eosinofília és característica d'aquesta entitat, però no és invariable. Aquestes malalties es poden presentar com NMP, però és possible que es manifestin com neoplàsies limfoides o leucèmies agudes mieloides. Reconèixer aquestes entitats és important, ja que l'activitat aberrant de la tirosina cinasa pot fer que la malaltia sigui sensible a fàrmacs inhibidors de tirosina cinasa.

**C) Neoplàsies Mielodisplàstiques/Mieloproliferatives (SMD/NMP):** són desordres clonals que comparteixen característiques clíniques, morfològiques i de laboratori, que són tant típics de les síndromes mielodisplàstiques (SMD) com de les NMP. Es caracteritzen, generalment, per presentar una MO hipercel·lular degut a la proliferació d'una o més línies mieloides. Aquesta proliferació pot ser efectiva en algunes línies i pot produir un nombre elevat de cèl·lules circulants que poden ser morfològicament i/o funcionalment displàstiques. Alhora, una o més línies diferents poden presentar una hematopoesi ineficient, donant lloc a més a més, a l'aparició de citopènies (reducció del nombre de cèl·lules en SP per sota de la normalitat). Les SMD/NMP inclouen quatre categories:

- Leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC)
- Leucèmia mioide crònica atípica, *BCR-ABL1* negativa (LMCa)
- Leucèmia mielomonocítica juvenil (LMMJ)
- Neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa inclassificable (SMD/NMP-I)

**D) Síndromes mielodisplàstiques (SMD):** són un grup heterogeni de malalties clonals que afecten a les cèl·lules mare hematopoètiques i que es caracteritzen per la presència d'una o més citopènies en SP, displàsia en una o més línies mieloides, hematopoesi ineficaç i un risc augmentat d'evolució de leucèmia aguda mioide (LAM). Es caracteritzen, en la majoria dels casos, per una simultània proliferació i una apoptosi augmentada de les cèl·lules hematopoètiques, que donen lloc a una MO normo o hipercel·lular i que contribueix al desenvolupament de les citopènies. La displàsia pot anar acompanyada per un augment de mieloblasts en SP i/o MO, sempre per sota del 20%. És un grup d'hemopaties molt heterogeni, tant a nivell clínic, com morfològic i genètic. El curs biològic d'algun subtipus de SMD pot ser perllongat, indolent i amb una baixa incidència a la progressió a LAM. Tot i així, la majoria de les SMD es caracteritzen per patir una disminució progressiva de l'activitat cel·lular en la MO i

un elevat risc d'evolució a LAM (presència de  $\geq 20\%$  de blasts en MO o SP). Les SMD es divideixen en:

- Citopènia refractària amb displàsia unilínia (CRDU)
- Anèmia refractària amb sideroblasts en anell (ARSA)
- Citopènia refractària amb displàsia multilínia (CRDM)
- Anèmia refractària amb excés de blasts (AREB)
- SMD amb deleció del cromosoma 5 [del(5q)] aïllada
- SMD inclassificable
- SMD infantil

E) **Leucèmia aguda mieloide (LAM):** és una hemopatia que resulta de l'expansió clonal dels blasts mieloides en SP, MO o altres teixits, i en la que una o més línies mieloides poden estar afectades. És una malaltia heterogènia a nivell clínic, morfològic i genètic. El requisit per al diagnòstic de LAM és la presència de  $\geq 20\%$  de blasts i/o monoblats/promonòcits i/o megacarioblasts en SP o MO. Es pot diagnosticar una LAM encara que tingui  $< 20\%$  de blasts sempre i quan hi hagi una de les següents anomalies cromosòmiques associades: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22) o t(15;17)(q22;q12). Dins aquesta categoria distingim les següents entitats:

- LAM amb alteracions genètiques recurrents
- LAM amb canvis relacionats amb la mielodislàsia
- Neoplàsies mieloides relacionades amb la teràpia
- LAM no categoritzable
- Sarcoma mieloide
- Proliferacions mieloides associades a la Síndrome de Down

### 3. Les síndromes mielodisplàstiques

Les síndromes mielodisplàstiques (SMD) són un conjunt heterogeni de malalties clonals de les cèl·lules progenitores hematopoètiques caracteritzades per la presència de citopènies, displàsia en una o més línies, tenir una hematopoesi ineficaç en una MO normo o hipercl·lular, i tenir un augment del risc de desenvolupar una leucèmia aguda mieloide secundària (LAMs) (3). La presència de mielodisplàsia no és sinònim de SMD i és precís excloure altres malalties que poden presentar característiques comuns.

En les SMD hi ha un increment de l'apoptosi dels progenitors hematopoètics de la MO que contribueix a l'aparició de les citopènies, tot i que la característica morfològica típica de les SMD és la presència de displàsia en una o més línies. La displàsia pot anar acompanyada per un increment dels mieloblasts en la SP i/o MO, però el percentatge s'ha de trobar sempre per sota del 20%, el qual és el llindar utilitzat per definir la LAM. Les SMD engloben diversos subtipus, els quals estan definits per el nombre de citopènies al diagnòstic, el nombre de línies mieloides que presenten displàsia, la presència de sideroblasts en anell, la presència d'una alteració citogenètica concreta, i el percentatge de blasts en SP i/o MO. Tot i que la progressió a LAM és el curs natural de la majoria de les SMD, el percentatge de pacients que progressen varien substancialment entre els diversos subtipus, amb una alta probabilitat de progressió en els subtipus que presenten un major nombre de mieloblasts (4,5).

Les SMD es donen principalment en adults grans, amb una mediana d'edat pròxima als 70 anys, i una predominança del sexe masculí. La incidència anual és d'entre 3 i 5 casos per cada 100.000 habitants, però si es fa una correcció per l'edat, el percentatge augmenta a 20 casos per cada 100.000 persones d'edat superior a 70 anys. Tot i que es creu que aquesta incidència podria ser més elevada, ja que hi ha molts casos de SMD que no es reporten als registres (6).

### **3.1. Etiologia de les síndromes mielodisplàstiques**

Les SMD primàries o de novo succeeixen sense una història prèvia d'exposició a quimioteràpia o radioteràpia. Possibles etiologies per les SMD de novo podrien ser l'exposició a benzè, el fet de ser fumador, l'exposició a productes químics o solvents agrícoles, i tenir antecedents familiars de neoplàsies hematològiques. Algunes malalties hematològiques hereditàries, com l'anèmia de Fanconi, la disqueratosis congènita, el síndrome de Shwachman-Diamond i l'anèmia de Blackfan-Diamond estan també associades a l'augment del risc de patir una SMD (6).

### **3.2. Característiques clíniques**

Les característiques clíniques predominants en les SMD són les citopènies (anèmia, trombocitopènia i neutropènia), que són conseqüència del fracàs hematopoètic que té lloc a la MO. Alguns pacients no presenten simptomatologia i són diagnosticats després d'una analítica de rutina. A continuació es descriu breument les principals característiques de cada una d'aquestes citopènies.

#### **3.2.1. Anèmia**

Al diagnòstic, més del 80% dels pacients amb SMD presenten anèmia (la majoria tenen nivells d'hemoglobina per sota dels 10g/dL) i és deguda a una activa, però ineficaç eritropoesi. En molts casos, l'anèmia al diagnòstic és asimptomàtica, però s'agreuja amb el temps (7). L'anèmia simptomàtica pot ser donada per la concentració baixa d'hemoglobina, o degut a la combinació d'una lleu anèmia i una comorbiditat com problemes cardíacs o respiratoris. Els símptomes més importants que afecten a la qualitat de vida dels pacients amb SMD són la dispnea i la fatiga, totes dues conseqüència de l'anèmia (8). Això fa que una tercera part dels pacients siguin dependents de transfusions sanguínies al moment del diagnòstic, i degut a aquestes transfusions, s'ha de vigilar amb l'hemosiderosi ja que juntament amb la possibilitat que tinguin el metabolisme del ferro alterat, pot provocar una acumulació descontrolada de ferro que finalment desencadeni en dany hepàtic, cardíac i fracàs endocrí.

#### **3.2.2. Trombocitopènia**

La trombocitopènia (plaquetes per sota de  $100 \times 10^9/L$ ) al diagnòstic es sol donar en el 40-65% dels pacients amb SMD, i les hemorràgies, normalment a les mucoses, són relativament freqüents com a conseqüència d'aquesta trombocitopènia. Per altra banda, trombocitopènies



severes (plaquetes per sota de  $20 \times 10^9/L$ ) s'han descrit aproximadament en el 18% dels pacients. En aquests casos les transfusions de plaquetes també són habituals.

### **3.2.3. Leucopènia i infeccions**

La neutropènia (recompte de neutròfils per sota  $2.5 \times 10^9/L$ ) succeeix en la majoria de casos de SMD. A més a més de la disminució de la seva xifra, també hi ha un defecte en l'adhesió, fagocitosi i activitat bactericida en els neutròfils d'aquests pacients (9). Per tots dos motius, les infeccions són la major causa de mort de les SMD, i succeeixen en el 20-40% dels pacients (5,10,11).

Així doncs, les citopènies són un factor independent de pronòstic advers en els pacients amb SMD, sobretot en aquells amb dany cardíac relacionat amb l'anèmia greu, infeccions secundàries degudes a les neutropènia i episodis de sagnats associats a la trombocitopènia (12). El nombre de línies implicades i la gravetat de les citopènies s'han associat al pronòstic dels pacients amb SMD; l'afectació multilínia i una citopènia més severa estan associades a grups de SMD d'alt risc, augment de la probabilitat de progressar a LAM i una supervivència global més curta (13).

## **3.3. Diagnòstic**

### **3.3.1. Diagnòstic i classificació**

El procés diagnòstic de les SMD inclou una revisió citomorfològica de la SP i de l'aspirat de MO, acompanyat d'un estudi citogenètic en MO. El resultat d'aquests estudis s'integra a les dades clíniques (anamnesi i exploració física) i addicionalment poden suplementar-se amb estudis immunofenotípics i/o moleculars.

Malgrat això, la diferència categòrica de l'anèmia refractària d'altres causes de citopènia pot ser difícil. La displàsia no és una evidència de clonalitat i es pot observar després de teràpia citotòxica, exposició a metalls pesats, o en l'anèmia megaloblàstica. A més a més, l'anèmia diseritropoètica congènita i l'anèmia de Fanconi poden imitar les SMD i han de ser excloses en pacients joves. Per tant, els estudis inicials haurien d'incloure els nivells de vitamina B12, la concentració de folats, la funció tiroidea, nivells d'anticossos del virus VIH, la viscositat del plasma i la funció hepàtica entre d'altres (14).

### 3.3.1.1. Morfologia i histologia

La classificació morfològica de les SMD està principalment basada en el percentatge dels blasts en MO i SP, el tipus i grau de displàsia, i el percentatge de sideroblasts en anell. Les línies mieloides afectades no han de ser necessàriament les mateixes que presentin displàsia.

La **sang perifèrica** de les SMD es caracteritza per presentar anèmia, a vegades discreta, amb neutropènia i/o trombopènia. L'estudi morfològic dels hematies suggereix, sovint, un dèficit de vitamina B12 o d'àcid fòlic, encara que els nivells en SP d'aquests principis madurats solen trobar-se dins dels límits de la normalitat. L'anisocitosi, poiquilocitosi, macrocitosi i anisocromia són les dismorfies eritrocitàries més rellevants. Juntament amb l'eritroblastèmia, alguns pacients poden presentar un cert grau de leucocitosi amb mielèmia i la presència aïllada d'algun element blàstic. En la fórmula leucocitària pot destacar una monocitosi amb alguns elements d'aspecte més immadur (promonòcits). Els neutròfils presenten alteracions deficitàries de la segmentació nuclear, amb nucli únicament bisegmentat o sense segmentar. També són freqüents les alteracions numèriques, habitualment descendos, de la granulació i/o alteració en la tinció dels grànuls, cosa que comporta un aspecte de granulòcits hipogranulats o agranulats. La vacuolització i la presència d'hemofagocitosi completen la dismorfia. La trombopènia apareix en dues tercers parts dels casos i s'acompanya de trets distrombopoètics.

L'aspirat de **moll d'os** (AMO) sol ser hipercel·lular, tot i que a vegades pot ser normo o hipocel·lular, fet que succeeix especialment en malalts que han estat prèviament exposats a agents químics com el benzè o altres drogues o radiacions ionitzants (15). Els pacients amb MO hipercel·lular tenen una major evolució a leucèmia aguda (30-50%) que els pacients que cursen amb MO hipocel·lular. Fa anys que es coneix la discordança entre la presència de citopènies en SP i l'augment de cel·lularitat en la MO, fet que s'explica degut a l'hematopoesi ineficaç que es dona en les SMD.

El valor de la biòpsia de moll d'os (BMO) en les SMD està ben establert, ja que afina el diagnòstic si ho comparem amb un únic examen d'aspirat de MO. Proporciona informació addicional sobre el percentatge de blasts i la distribució dins l'espai de la MO. La cel·lularitat, la morfologia dels megacariòcits i la fibrosi són aspectes importants que es poden valorar amb la biòpsia de MO. Els estudis d'immunohistoquímica amb marcadors de CD34 són especialment útils per fer un bon recompte de blasts en els casos que les SMD tinguin fibrosi o una MO hipocel·lular, en els quals el percentatge de blasts es troba normalment menystingut.

### **3.3.1.2. Classificació de les SMD**

El primer sistema de classificació de les SMD es va establir l'any 1982 per un grup d'experts de França, Amèrica i Regne Unit, d'aquí el seu nom **FAB** (Grup Franc-Americà-Britànic). Segons l'anèmia, el nombre de monòcits i el percentatge de blasts en SP i/o MO, la presència de bastons d'Auer, la dismielopoesi i els sideroblastes en anell a MO es van generar cinc subgrups (16):

- Anèmia refractària (AR)
- Anèmia refractària amb sideroblasts en anell (ARSA)
- Anèmia refractària amb excés de blasts (AREB)
- Anèmia refractària amb excés de blasts en transformació (AREB-t)
- Leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC)

Aquest sistema de classificació es va trobar fàcil d'utilitzar, i alhora permetia distingir diferents pronòstics entre els diferents subgrups, amb una mitja de supervivència de 50 mesos en els subgrups més favorables (AR i ARSA) en comparació amb supervivències menors als 12 mesos en els altres subtipus de la FAB. Aquesta classificació va resultar molt útil durant aproximadament 20 anys, però amb el temps, es va detectar l'evidència que els pacients amb percentatge de blasts entre el 10-19% tenien significativament majors taxes de progressió que aquells pacients que tenien entre un 5-9% de blasts. En canvi, si el percentatge de blasts era superior al 20%, el pronòstic era similar als pacients que presentaven una LAM (17). També es va veure que el nombre de línies que presentaven displàsia era un indicador important pel pronòstic de la malaltia, i que la LMMC semblava tenir un comportament diferent quan tenia proliferació de leucòcits que quan presentava citopènies i manifestacions clíniques com l'hepatosplenomegàlia.

L'any **2001** l'Organització Mundial de la Salut (**OMS**) va realitzar una nova classificació morfològica de les SMD per substituir la classificació de la FAB. En aquesta nova classificació s'introdueixen diversos canvis respecte la classificació anterior:

- S'introdueix la citogenètica com un important marcador diagnòstic i pronòstic: un nou subtipus, la síndrome del(5q), es defineix com una entitat clínica diferent.
- S'elimina el subtipus AREB-t: es considera LAM quan al diagnòstic la MO presenta més d'un 20% de blasts.
- El subgrup AREB es divideix en dues entitats segons el recompte de blasts en la MO, i es demostra que això té importància en el pronòstic.

- Es reclassifiquen alguns subtipus específics de SMD, a altres grups que reflecteixen millor les seves característiques:
  - o Les LMMC passen a formar part del grup de neoplàsies mieloproliferatives/mielodisplàstiques.
  - o Els pacients prèviament classificats com AR, però amb displàsia en almenys dues línies, passen a classificar-se com AR amb displàsia multilínia.
  - o Els pacients amb displàsia unilínia que no concorda amb altres subtipus es classifiquen ara com SMD inclassificables.

Amb tot això, finalment es generen diferents subgrups:

- Anèmia refractària (AR)
- Anèmia refractària amb sideroblasts en anell (ARSA)
- Citopènia refractària amb displàsia multilínia (CRDM)
- Citopènia refractària amb displàsia multilínia i sideroblasts en anell (CRDM-SA)
- Anèmia refractària amb excés de blasts tipus 1 (AREB-1)
- Anèmia refractària amb excés de blasts tipus 2 (AREB-2)
- Síndrome associat a deleció de 5q (Síndrome 5q-)
- SMD inclassificable

L'any **2008** va haver-hi una nova actualització de la classificació de la OMS, on s'incorporaven certes modificacions (2):

- Els pacients amb citopènia(s) refractària amb sospita de SMD, però del qual manquen característiques morfològiques per a fer el diagnòstic de SMD han de ser considerats com que tenen presumpta evidència de SMD si tenen alteracions citogenètiques específiques relacionades amb la SMD.
- S'afegeix una categoria d'interès en la classificació de les SMD, citopènia refractària amb displàsia unilínia, per a poder incorporar pacients que presenten displàsia unilineal associada amb anèmia refractària (displàsia eritroide unilínia), neutropènia refractària (disgranulopoesis unilínia) o trombocitopènia refractària (dismegacariopoesis unilínia), i que presenten menys d'un 1% de blasts en SP i menys de 5% en MO.
- La categoria de citopènia refractària amb displàsia multilínia ja no es subdivideix segons si el 15% o més de precursors eritroides són sideroblasts en anell (SA), és a dir, l'antiga categoria de CRDM-SA ara s'incorpora a les CRDM.

- Els pacients que presenten entre 2-4% de blasts en SP i menys de 5% de blasts en MO s'han de diagnosticar de AREB-1 si presenten altres troballes clíniques i de laboratori suggestives de SMD.
- S'afegeix una entitat provisional, citopènia refractària de la infància, per incloure nens que presenten citopènia(s) amb blasts per sota del 2% en SP i menys del 5% en MO i evidències de displàsia en dues o més línies. Per nens amb blasts entre el 2-19% en SP i/o entre 5-19% en MO, la subclassificació de la SMD s'ha de fer mitjançant els mateixos criteris que s'utilitzen per als adults.

Un recompte precís de blasts en SP és important, perquè els pacients amb un major percentatge de blasts en SP que en MO semblen tenir una malaltia més agressiva. El comptatge de blasts en neoplàsies mieloides s'expressa com un percentatge de totes les cèl·lules nucleades en la MO i com un percentatge de leucòcits en la SP.

El nombre de línies displàsiques és rellevant per a distingir entre diferents subtipus de SMD i pot ser important per predir el comportament de la malaltia.

Amb tot això, es generen set subgrups:

- Citopènia refractària amb displàsia unilínia (CRDU)
- Anèmia refractària amb sideroblasts en anell (ARSA)
- Citopènia refractària amb displàsia multilínia (CRDM)
- Anèmia refractària amb excés de blasts (AREB)
- SMD amb del(5q) aïllada
- SMD inclassificable
- SMD infantil: citopènia refractària de la infància

Finalment, l'any **2017** va haver-hi l'última revisió de la classificació de la OMS on s'introdueixen refinaments en la interpretació morfològica i en la valoració de les citopènies i s'aborda la importància d'acumular informació genètica pel diagnòstic i classificació de les SMD (3,6). Degut a que les línies mieloides afectades per les citopènies no són necessàriament les mateixes que estan afectades per la displàsia, la terminologia per a les SMD dels adults en aquesta nova classificació ha canviat, per eliminar els termes de "anèmia refractària" i "citopènia refractària" i substituir-la pel terme "síndrome mielodisplàstica" seguit per les modificacions apropiades: unilínia vs multilínia, sideroblasts en anell, excés de blasts, o amb l'alteració citogenètica del(5q).

Un dels desafiaments més importants d'aquesta nova categorització és la separació de les SMD de les causes reactives de citopènia i displàsia. Tot i que el llindar per definir la displàsia es manté en un 10% de cèl·lules displàstiques, es reconeix que la displàsia superior al 10% pot produir-se en alguns individus normals i, encara més freqüentment, en causes de citopènies no neoplàsiques. És per tot això, que les possibles causes reactives de la displàsia sempre s'han de considerar abans de donar un diagnòstic de SMD, sobretot quan la displàsia és subtil i està limitada a una sola línia.

En aquesta nova classificació es fa un gran canvi en els criteris diagnòstics de les neoplàsies mieloides amb predominança eritroide (quan els precursors eritroides equivalen a més del 50% de totes les cèl·lules de la MO). El denominador per calcular el percentatge de blasts en totes les neoplàsies mieloides és comptar totes les cèl·lules nucleades de la MO, no només les cèl·lules no eritroides. Això comportarà que pacients prèviament diagnosticats de leucèmia eritroide aguda subtipus eritroide/mieloide, ara es classificarien de SMD amb excés de blasts. Un altre canvi que es dona en aquesta classificació és que es pot diagnosticar un pacient dins l'entitat SMD amb del(5q) aïllada encara que tingui una alteració citogenètica addicional a més del(5q), tret que aquesta anomalia sigui monosomia 7 o del (7q), ja que està descrit que no hi ha cap efecte advers en el fet de tenir una única alteració cromosòmica addicional a part de la del(5q) (18).

El nombre i tipus de mutacions concretes estan fortament associades amb l'evolució de la malaltia en les SMD i l'addició de les dades mutacionals incrementa el valor pronòstic de l'estratificació del risc existent en les SMD. Mutacions en el gen *TP53* estan associades a una malaltia més agressiva en les SMD en general i sembla predir una menor resposta a lenalidomida en pacients amb del(5q). L'avaluació de *TP53* és recomanada, dins aquesta nova classificació de la OMS, en aquells pacients amb SMD del(5q) aïllada per ajudar a identificar un subgrup de pronòstic advers dins aquesta entitat de SMD de a priori bon pronòstic.

S'ha descrit l'associació entre la presència de sideroblasts en anell i la mutació del gen d'*splicing SF3B1*, que sembla un esdeveniment precoç en la patogènesi de les SMD, manifesta un perfil d'expressió gènic diferent i es correlacionada amb un pronòstic favorable. Així, en l'actual classificació, si s'identifica una mutació en *SF3B1*, es pot fer un diagnòstic de SMD-SA encara que el percentatge de sideroblasts en anell constitueix tan sols el 5% de les cèl·lules nuclears eritroides, mentre que almenys es necessita el 15% de sideroblasts en anell en els casos que no es detecti la mutació en *SF3B1*. Encara que els casos de SMD-SA en que no està mutat *SF3B1* semblen tenir un pronòstic advers en comparació amb aquells que presenten la

mutació, el paper de la displàsia multilínia enfront la mutació de *SF3B1* en la influència en el resultat de les SMD-SA segueix sent controvertit.

Amb tot això, finalment es generen 7 subgrups (Taula 1):

- SMD amb displàsia unilínia (SMD-DU)
- SMD amb displàsia multilínia (SMD-DM)
- SMD amb sideroblasts en anell (SMD- SA)
- SMD amb del(5q) aïllada
- SMD amb excés de blasts (SMD-EB)
- SMD inclassificable
- SMD infantil

**Taula 1.** Classificació de l'OMS 2017 amb les principals característiques citològiques de cada subgrup.

Subtipus	Línies amb displàsia	Citopènies <sup>1</sup>	Sideroblasts en anell (% elements eritroides en MO)	Blasts en MO i SP
<b>SMD amb displàsia unilínia (SMD-DUL)</b>	1	1 o 2	<15%/ <5% <sup>2</sup>	MO<5%, SP<1%, no bastons d'Auer
<b>SMD amb displàsia multilínia (SMD-DML)</b>	2 o 3	1-3	<15%/ <5% <sup>2</sup>	MO<5%, SP<1%, no bastons d'Auer
<b>SMD amb sideroblasts en anell (SMD-SA)</b>				
<b>SMD_SA amb displàsia unilínia (SMD-SA-DUL)</b>	1	1 o 2	≥15%/ ≥5% <sup>2</sup>	MO<5%, SP<1%, no bastons d'Auer
<b>SMD-SA amb displàsia multilínia (SMD-SA-DML)</b>	2 o 3	1-3	≥15%/ ≥5% <sup>2</sup>	MO<5%, SP<1%, no bastons d'Auer
<b>SMD amb del(5q) aïllada</b>	1-3	1-2	Cap o qualsevol	MO<5%, SP<1%, no bastons d'Auer
<b>SMD amb excés de blasts (SMD-EB)</b>				
<b>SMD-EB-1</b>	0-3	1-3	Cap o qualsevol	MO 5-9% o SP 2-4%, no bastons d'Auer
<b>SMD-EB-2</b>	0-3	1-3	Cap o qualsevol	MO 10-19% o SP 5-19% o bastons d'Auer
<b>SMD inclassificable (SMD-I)</b>				
<b>Amb 1% blasts en SP</b>	1-3	1-3	Cap o qualsevol	MO<5%, SP=1% <sup>3</sup> , no bastons Auer
<b>Amb displàsia unilínia i pancitopènia</b>	1	3	Cap o qualsevol	MO<5%, SP<1%, no bastons Auer
<b>Basat en la definició d'alteracions citogenètiques</b>	0	1-3	<15% <sup>4</sup>	MO<5%, SP<1%, no bastons Auer
<b>Citopènia refractària de la joventut</b>	1-3	1-3	Cap	MO<5%, SP<2%

- 1- Citopènies descrites com hemoglobina <10g/dL, plaquetes <100x10<sup>9</sup>/L, i comptatge absolut de neutròfils <1.8x10<sup>9</sup>/L, poques vegades SMD poden presentar anèmia lleu o trombocitopènia per sobre d'aquests nivells. Els monòcits en SP han de ser <1x10<sup>9</sup>/L.
- 2- Si està present la mutació en *SF3B1*.
- 3- 1% de blasts en SP ha de ser reportat en almenys dues ocasions diferents.

- 4- Casos amb  $\geq 15\%$  de sideroblasts en anell per definició tenen displàsia eritroide significativa i s'han de classificar com SMD-SA-DUL

### 3.3.2. Diagnòstic diferencial

El diagnòstic de les SMD pot ser complex. Un dels majors reptes és separar les SMD de les causes reactives que provoquen citopènia i displàsia. S'ha de tenir en compte que certs fàrmacs, infeccions, deficiències metabòliques i alteracions autoimmunes, és a dir, condicions no patològiques en termes neoplàsics, poden causar tan citopènies com displàsia morfològica, i per tant, poden imitar característiques típiques de les SMD. Per altra banda, també hi ha condicions clonals que comparteixen característiques clíniques amb les SMD, incloent la LAM, NMP, etc.. és per això que s'ha d'excloure totes les causes tan reactives com altres neoplàsies abans de fer un diagnòstic de SMD (19). Com a precaució general, cap pacient hauria de ser diagnosticat de SMD si no es coneix la seva història mèdica o si s'està tractant amb factors de creixement, incloent l'eritropoetina.

Una citopènia persistent en absència de displàsia tampoc s'hauria de classificar com a SMD, tret que presenti certes alteracions citogenètiques específiques. Per altra banda, una citopènia persistent sense displàsia i sense alteracions citogenètiques específiques s'hauria de diagnosticar de citopènia idiopàtica de significat incert (*idiopathic cytopenia of undetermined significance, ICUS*) (20,21), i l'estat citogenètic i hematològic del pacient s'hauria de monitoritzar estretament (Taula 2).

Els pacients amb mutacions genètiques clonals (freqüentment descrites en SMD) identificades en cèl·lules hematopoètiques, però que no presenten displàsia significativa a MO no s'haurien de diagnosticar de SMD, ja que aquesta situació s'ha definit com hematopoesi clonal de potencial indeterminat (*clonal haematopoiesis of indeterminate potential, CHIP*) (22,23) i s'ha descrit freqüentment en persones sanes d'edat avançada (sobretot portadores de mutacions ens els denominats gens DTA: *DNMT3A*, *TET2* i *ASXL1*) i que habitualment no acaben desenvolupant una SMD (la taxa de progressió màxima a una patologia hematològica és del 0.5-1%) (12)(Taula 2).



**Taula 2.** Comparació entre els estats hematopoètics citopènics i clonals que fan frontera amb les SMD.

	ICUS no clonal	CHIP	CCUS	SMD baix risc	SMD d'alt risc	LAMs
<b>Clonalitat (VAF)</b>	-	+ (~9%)	+ (~10-50%)	+ (~30-50%)	+ (~40-50%)	+ (~40-50%)
<b>Displàsia</b>	-	-	-	+	+	+
<b>Citopènies</b>	+	-	+	+	+	+
<b>% blasts en MO</b>	<2%	<2%	<2%	<2%	2-19%	≥20%
<b>Risc global</b>	Molt baix	Molt baix	Baix	Baix/ Intermig	Alt	Molt alt
<b>Tractaments</b>	Observació	Cap	Observació/ MTS/ FC	Observació/ MTS/ FC/ FIMD	AHM/TPH	AHM/ QTI/ TPH

ICUS: citopènia idiopàtica de significat incert; CHIP: hematopoesi clonal de potencial indeterminat, CCUS: citopènia clonal de significat incert; SMD: síndrome mielodisplàstica; LAMs: leucèmia aguda mieloblàstica secundària; MTS: millor tractament de suport; FC: factors de creixement; FIMD: fàrmacs immunomoduladors; AHM: agents hipometilants; TPH: trasplantament de progenitors hematopoètics; QTI: quimioteràpia d'inducció (19,22)

### 3.4. Característiques immunofenotípiques

Les alteracions immunofenotípiques que han estat descrites en les cèl·lules hematopoètiques de les SMD, són alteracions en la quantitat i el fenotip aberrant de les cèl·lules progenitores en comparació amb cèl·lules hematopoètiques normals. Concretament es poden trobar perfils immunofenotípics aberrants de la maduració granulocítica, eritroide i monocítica, i alhora una disminució de les hematogònies (6). Aquests patrons anormals de la maduració mioide inclouen l'asincronia de CD15 i CD16 en els granulòcits, una expressió alterada de CD13 en relació a CD11b o CD16, i una expressió aberrant de CD56 i/o CD7 en els progenitors, granulòcits o monòcits. En les cèl·lules eritroides un augment del coeficient de variació i la disminució de la intensitat de CD71 o l'expressió de CD36 estan molt associades a les SMD. Generalment hi ha una bona correlació entre el percentatge de blasts descrits en la revisió citomorfològica de l'aspirat i el resultat de l'immunofenotip (cèl·lules CD34+). Les troballes per citometria de flux per si soles no són suficients per establir un diagnòstic de SMD, en absència de troballes morfològiques o citogenètiques definitives. S'han establert una sèrie de guies a nivell europeu (European Leukemia Net, ELN) pel que fa a l'ús de la citometria de flux en el diagnòstic dels pacients amb SMD, incloent un resum de les alteracions reportades associades a SMD i com donar aquests resultats. A més a més, detectar alteracions en almenys tres proves

funcionals i en almenys dos compartiments cel·lulars, s'ha associat a diagnòstic de SMD o SMD/NMP en diversos estudis (24). D'una manera més limitada, també s'han aplicat panells de cribatge o screening, però han demostrat ser menys sensibles i menys específics que els panells més grans (25).

### 3.5. Característiques genètiques

Com hem comentat, les SMD són una malaltia heterogènia, i també ho són les alteracions somàtiques més recurrents, ja que inclouen guanys o pèrdues de regions cromosòmiques, translocacions balancejades, mutacions puntuals i modificacions epigenètiques. La gran majoria dels càncers humans, i òbviament també succeeix en les SMD, alberguen tant anomalies genètiques com epigenètiques, amb una fascinant interacció entre totes dues (26).

#### 3.5.1. Perfil citogenètic

Pel que fa a les alteracions cromosòmiques es detecten alteracions citogenètiques en aproximadament el 50% de les SMD de novo i en el 80% de les SMD relacionades amb la terapèutica. Tot i això, el cariotip pot ser no informatiu en el 20% dels casos. Si es combinen els estudis citogenètics i moleculars com el *FISH* i els *SNP arrays* (SNP-A), la detecció d'alteracions cromosòmiques recurrents o desequilibrades millora fins a gairebé el 80% i això ajuda a millorar l'estratificació del risc i la precisió diagnòstica (27,28).

Els estudis citogenètics juguen un paper molt important en l'avaluació dels pacients amb SMD en quant al pronòstic, per a poder establir una clonalitat hematològica i també s'han establert correlacions amb característiques clíniques i morfològiques. Per exemple, les SMD del(5q) aïllada, ja sigui com a única alteració o amb una alteració addicional excepte la pèrdua del cromosoma 7 o del(7q), és un subtipus específic de la classificació de les SMD. Succeeix de manera més freqüent en dones i està caracteritzat per megacariòcits amb nuclis hipolobulats o no lobulats, anèmia macrocítica, un recompte de plaquetes normal o augmentat i un curs clínic favorable. La pèrdua del 17p està associada amb SMD o LAM amb l'anomalia pseudo-Pelger-Huet, neutròfils petits i vacuolats, mutacions de *TP53* i un curs clínic desfavorable, i està més relacionada amb les SMD relacionades amb la teràpia. Els cariotips complexos ( $\geq 3$  alteracions) normalment inclouen alteracions en els cromosomes 5 i/o 7, tals com del(5q) o t(5q), pèrdua del cromosoma 7, o del(7q), i estan associats a un pronòstic desfavorable. Altres troballes citogenètiques semblen associades amb característiques morfològiques, per exemple la

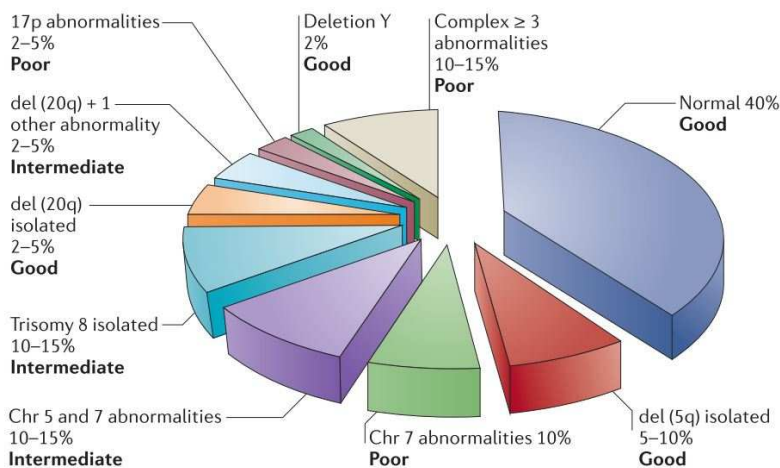
del(20q) aïllada està associada amb dismegacariopoesi i trombocitopènia, i inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2) està associat amb megacariòcits alterats i pot estar associat a trombocitosi. De totes maneres, certes alteracions citogenètiques clonals que succeeixen sovint en les SMD, com la pèrdua del cromosoma Y, trisomia del cromosoma 8 i la del(20q), han estat també descrites en condicions no neoplàsiques, i quan aquestes alteracions es detecten soles o en absència de criteris morfològics, no es poden considerar evidències definitives de SMD. En casos amb citopènia refractària sense explicació, però sense evidència de displàsia o d'augment dels blasts, s'han de considerar les alteracions citogenètiques més recurrents (Taula 3) com a presumpte fonament de la presència de SMD, i aquests casos s'inclourien en la categoria de SMD inclassificables (6). A la vegada es recomana fer un seguiment més estricte d'aquests pacients fins que apareguin trets morfològics més específics d'algun subtipus de SMD.

**Taula 3.** Alteracions citogenètiques més recurrents en les SMD (OMS 2017)

Alteració cromosòmica	FREQUÈNCIA	
	SMD	SMD relacionades amb la teràpia
<b>No equilibrades</b>		
Guany del cromosoma 8 <sup>a</sup>	10%	
Pèrdua del cromosoma 7 o del(7q)	10%	50%
del(5q)	10%	40%
del(20q) <sup>a</sup>	5-8%	
Pèrdua del cromosoma Y <sup>a</sup>	5%	
Isocromosoma 17q o t(17p)	3-5%	25-30%
Pèrdua del cromosoma 13 o del(13q)	3%	
del(11q)	3%	
del(12p) o t(12p)	3%	
del(9q)	1-2%	
idic(X)(q13)	1-2%	
<b>Alteracions equilibrades</b>		
t(11;16)(q23.3;p13.3)		3%
t(3;21)(q26.2;q22.1)		2%
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1%	
t(2;11)(p21;q23.3)	1%	
inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)	1%	
t(6;9)(p23;q34.1)	1%	

<sup>a</sup>Com a alteració citogenètica aïllada en absència de criteris morfològics, el guany del cromosoma 8, del(20q) i la pèrdua del cromosoma Y no són considerats com a evidències definitives de SMD; en el marc de citopènies persistents d'origen indeterminat, les altres alteracions descrites a la taula són considerades com a presumptes evidències de SMD, fins i tot en absència de característiques morfològiques definitives.

Tot i que les troballes citogenètiques no s'utilitzen per definir altres subtipus específics de SMD, amb excepció de les SMD amb del(5q), estan fortament correlacionades amb el pronòstic, com es reflecteix en els tres grups citogenètics que es descriuen en l'esquema del sistema internacional de puntuació pronòstica (IPSS) (Figura 2) i en els actuals 5 grups citogenètics utilitzats en el IPSS revisat (IPSS-R).



**Figura 2.** Incidència i pronòstic de les alteracions cromosòmiques més freqüents en les SMD. (Raza and Galili. Nature reviews cancer 2012).

### 3.5.2. Perfil mutacional

Gràcies a la introducció de les tècniques de seqüenciació massiva (*next-generation sequencing*, NGS), el panorama genòmic de les SMD s'ha pogut estudiar àmpliament en l'última dècada. Aquests anàlisis han permès descobrir la gran heterogeneïtat que caracteritza aquesta síndrome, identificar marcadors genètics relacionats amb l'agressivitat de la malaltia i la resposta a la teràpia, i també ha donat com a resultat el desenvolupament de noves teràpies dirigides (Figura 3).

Com passa amb totes les altres neoplàsies mieloides, s'han descrit una gran quantitat de mutacions recurrents en les SMD. La seqüenciació massiva mitjançant panells dirigits d'un nombre limitat de gens ha permès detectar mutacions entre el 80-90% dels pacients amb SMD al moment del diagnòstic. Entre els gens que es troben mutats en més del 5% de les SMD trobem *SF3B1*, *TET2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53* i *EZH2* (Taula 4).

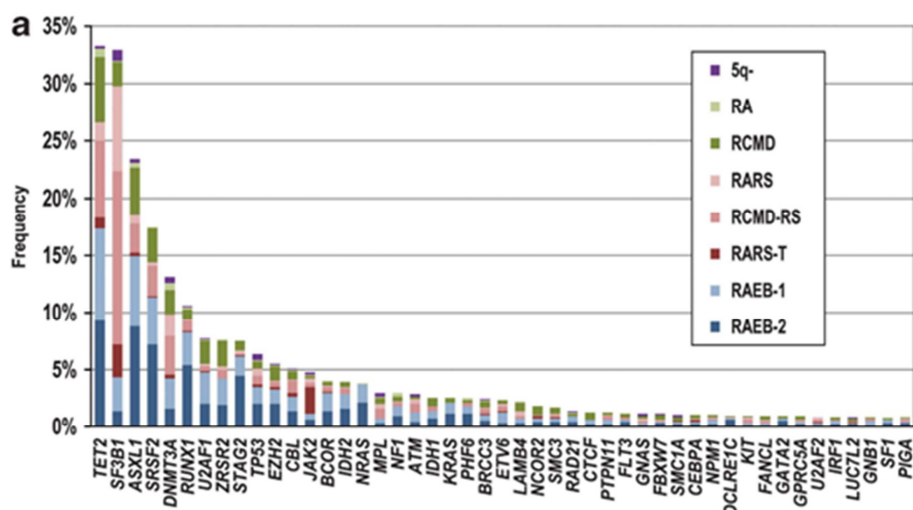


Figura 3. Freqüència dels gens més alterats en les SMD (29).

Taula 4. Gens més freqüentment alterats en les SMD (OMS 2017) (6)

Gen mutat	Via	Freqüència	Impacte pronòstic
<b><i>SF3B1</i><sup>a</sup></b>	<i>Splicing</i> ARN	20-30%	Favorable
<b><i>TET2</i><sup>a</sup></b>	Metilació de l'ADN	20-30%	Veure nota <sup>b</sup>
<b><i>ASXL1</i><sup>a</sup></b>	Modificació d'histones	15-20%	Advers
<b><i>SRSF2</i><sup>a</sup></b>	<i>Splicing</i> ARN	≈15%	Advers
<b><i>DNMT3A</i><sup>a</sup></b>	Metilació de l'ADN	≈10%	Advers
<b><i>RUNX1</i></b>	Factor de transcripció	≈10%	Advers
<b><i>U2AF1</i><sup>a</sup></b>	<i>Splicing</i> ARN	5-10%	Advers
<b><i>TP53</i><sup>a</sup></b>	Supressor de tumors	5-10%	Advers
<b><i>EZH2</i></b>	Modificació d'histones	5-10%	Advers
<b><i>ZRSR2</i></b>	<i>Splicing</i> ARN	5-10%	Veure nota <sup>b</sup>
<b><i>STAG2</i></b>	Complex de les cohesines	5-7%	Advers
<b><i>IDH1/IDH2</i></b>	Metilació de l'ADN	≈5%	Veure nota <sup>b</sup>
<b><i>CBL</i><sup>a</sup></b>	Senyalització	≈5%	Advers
<b><i>NRAS</i></b>	Factor de transcripció	≈5%	Advers
<b><i>BCOR</i><sup>a</sup></b>	Factor de transcripció	≈5%	Advers

<sup>a</sup> Aquests gens s'han reportat que estan mutats en cèl·lules hematopoètiques clonals en un subgrup d'individus sans (hematopoesi clonal de potencial indeterminat, CHIP).

<sup>b</sup> Pronòstic neutral o dades en conflicte.

Aquests gens es poden agrupar en diferents categories en funció del procés cel·lular en que estiguin involucrats. A continuació veurem els més rellevants:

### A) Gens implicats en la maquinària del *splicing*:

El spliceosoma és un complex proteic i dinàmic que participa en l'eliminació d'introns (*splicing*) per a generar un ARN missatger (ARNm) madur. Són moltes les subunitats i molècules que participen en el procés d'escissió d'introns per assegurar que es produeix de manera correcta. Les mutacions en gens que codifiquen aquest complex provocarien una alteració en els patrons de *splicing*, donant lloc a la incorporació inadequada d'introns o exons en el ARN específic, arribant així a modificar la proteïna final (30). Això podria alterar encara més la capacitat de la cèl·lula per a diferenciar-se en cèl·lules sanguínies completament madures donant lloc a un fenotip displàstic (31).

S'han descrit mutacions que afecten als gens de *splicing* en aproximadament el 45-85% dels pacients amb SMD (30). Els més rellevants són:

**SF3B1** (2q33.1): aquest gen codifica per la subunitat 1 del complex de *splicing* 3b, que és un component central de la snRNP U2 que reconeix el lloc 3' d'acoblament en les unions intró-exó. Els pacients amb SMD i mutacions en *SF3B1* presenten un major nombre de sideroblasts en anell i, sovint, tenen un recompte de plaquetes més elevat, menys citopènies, i menor percentatge de blasts comparat amb els pacients sense mutacions en aquest gen (32). Aquest gen es troba mutat en el 60-80% dels pacients amb SMD amb sideroblasts en anell i en el 20-30% de les SMD en general (32-34). La majoria de les mutacions s'agrupen en els exons 14 i 15 (aminoàcids 622-700), sent la més freqüent la mutació K700E.

De totes les alteracions descrites en gens del *spliceosoma*, només les mutacions en *SF3B1* han estat relacionades amb un pronòstic favorable en la majoria dels estudis realitzats, associant-se a una millor supervivència global i una menor probabilitat de transformació a LAM (32). Per altra banda, s'ha descrit la freqüent coexistència de mutacions en *SF3B1* amb mutacions en el gen *DNMT3A*, i alguns estudis han associat aquesta combinació a un pitjor curs clínic de la malaltia (35).

**SRSF2** (17q25.1): aquest gen codifica per una proteïna SR (*serine rich*), crítica per a l'acoblament de pre-ARNm. S'encarrega de marcar els límits entre exó/intró, i presenta la capacitat de redefinir els llocs de *splicing*, el que comporta la formació de trànscripats alternatius (36). S'han descrit mutacions en *SRSF2*, majoritàriament en el hotspot P95 de l'exó 1, en aproximadament el 10-15% de les SMD, sent més freqüents en els subtipus amb displàsia multilínia i excés de blasts (33), i s'han associat a neutropènia i pronunciada trombocitopènia. A més a més, el 85% dels pacients amb SMD que presenten mutació en *SRSF2* també tenen almenys una mutació addicional en gens com *RUNX1*, *IDH1*, *IDH2* i *ASXL1* (37). El paper de les mutacions en *SRSF2* en les SMD no està ben definit i tenen un valor pronòstic controvertit:

alguns estudis l'han associat amb supervivències més curtes i major risc de transformació a LAM (37–39) mentre que altres no han trobat cap impacte en el pronòstic (40).

**U2AF1** (21q22.3): codifica per la proteïna del factor auxiliar U2, que reconeix l'acceptor dinucleòtid AG en l'acoblament en l'extrem 3' dels introns durant la síntesi de l'ARNm (41). L'anàlisi dels patrons d'acoblament en 35 gens diana de *U2AF1* ha revelat que aquestes mutacions estan associades amb la desregulació del cicle cel·lular i el processament de l'ARN. Existeix una mutació missense recurrent en *U2AF1* que afecta a la serina del codó 34 (S34) i té lloc en el 5-10% de les SMD de novo (42). Estudis recents suggereixen que la presència de mutacions en *U2AF1* pot estar en una proporció més elevada en els pacients que tenen SMD amb deleció del 20q. A més a més, s'ha observat també concurrència de mutacions amb *ASXL1* i *TET2* (37). Les mutacions en el gen *U2AF1* s'han relacionat amb una menor supervivència i amb un menor temps de transformació a LAM en pacients joves, més concretament en els pacients amb SMD de baix risc (43).

**ZRSR2** (Xp22.1): aquest gen codifica per a una proteïna associada amb el factor auxiliar de l'heterodímer U2. Les mutacions en aquest gen succeeixen en el 5-10% de les SMD, es distribueixen al llarg de tota la proteïna, i s'han associat a neutropènia aïllada (30). S'ha descrit la freqüent coexistència de mutacions en *ZRSR2* amb mutacions del gen *TET2* (39).

### Reguladors epigenètics de l'expressió gènica

L'epigenètica són aquelles modificacions genètiques estables que causen canvis en l'expressió i funció en un gen sense que tingui lloc una alteració en la seqüència de l'ADN corresponent. Els mecanismes epigenètics inclouen la metilació de l'ADN, les modificacions covalents d'histones, els ARNs no codificants i els complexos proteïcs reguladors com el Polycomb. Els reguladors epigenètics són el grup més gran de gens mutats en pacients amb SMD, i les mutacions en la majoria d'aquests gens alteren la seva funció normal i indueixen un fenotip de pèrdua de funció (44).

#### B) Metilació de l'ADN:

En les SMD, les alteracions epigenètiques freqüentment causen hipermetilació de gens que controlen la proliferació, adhesió i canvis específics de les cèl·lules mare hematopoètiques. Mutacions en gens com *DNMT3A*, *TET2* i *IDH1/2* es consideren mutacions driver en la patogènesi de les SMD, alteren la metilació de l'ADN en aquests pacients i són per tant,

potencials marcadors terapèutics (45). Està descrit que aproximadament el 40% dels pacients amb SMD presenten alteracions en gens que afecten la via de metilació de l'ADN.

**TET2** (4q24): gen que codifica per una proteïna que catalitza la conversió de 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5hmC), fet que comporta finalment una desmetilació de la citosina i una modificació de la cromatina. Està involucrada en la regulació de la metilació de l'ADN i l'expressió gènica, inhibint l'autorenovació (46). Les mutacions de *TET2* (*missense/nonsense/frameshift*) es localitzen al llarg de tot el gen i comporten una pèrdua de funció de la capacitat catalítica i, per tant, un increment de la metilació (47). Aquest augment en la metilació de l'ADN provocarà un silenciament d'aquells gens que tinguin la regió promotora metilada (46). S'han descrit mutacions en *TET2* en un 20% dels pacients amb SMD, i diversos autors evidencien les alteracions en *TET2* com un dels primers events genètics en l'aparició de neoplàsies hematològiques (48). S'associen a edat avançada, hematopoesi clonal i cariotip normal, el que suggereix que les mutacions de *TET2* són un factor associat a l'envelliment de les cèl·lules hematopoètiques o una mutació iniciadora de processos malignes. Les mutacions de *TET2* són mútuament excloents amb les mutacions dels gens *IDH1/2*, però poden coexistir amb mutacions en *EZH2*.

Les mutacions en *TET2* no són un factor predictor de pronòstic de la malaltia, però sí són factors de resposta a agents hipometilants (AHM) (49), sobretot si no es troben associades a mutacions en *ASXL1*. Per altra banda, les mutacions en *TET2* semblen estar més associades a una supervivència global més curta després d'un trasplantament hematopoètic (50).

**DNMT3A** (2p23): codifica per un enzim metiltransferasa que catalitza la transferència del grup metil de les citosines de les illes CpG de l'ADN, per tant, aquest enzim és necessari per mantenir la metilació. Les mutacions en *DNMT3A* es donen en el 10-15% dels pacients amb SMD i amb una major incidència en pacients d'edat avançada. Aquestes mutacions heterozigòtiques i majoritàriament de tipus *missense* o *nonsense*, freqüentment es concentren en el domini metiltransferasa tot i que es poden donar a lo llarg de tot el gen. La mutació més freqüent es produeix en l'aminoàcid R882, i es creu que comporta una pèrdua de funció (51–53). La presència de mutacions de *DNMT3A* en gairebé totes les cèl·lules de la MO dels pacients amb SMD, independentment del percentatge de blasts, ha portat a la hipòtesi de que es tracta d'un event genètic primerenc en el procés d'iniciació de la malaltia que podria comportar una avantatge clonal de les cèl·lules que contenen aquesta mutació (51). Les mutacions de *DNMT3A* en SMD estan associades a un curs clínic més agressiu, amb progressions més ràpides a LAM, supervivència global més curta i a supervivències més curtes



post-trasplant (50,51). En les SMD-SA les mutacions de *DNMT3A* sovint coexisteixen amb les mutacions en *SF3B1*, i en aquests casos s'ha observat una associació amb pitjor pronòstic i una major transformació a LAM (35). Finalment, també s'ha associat les mutacions en *DNMT3A* a una major resposta a tractaments hipometilants (54).

**IDH1/2** (2q33.3/15q26.1): en condicions normals, les proteïnes *IDH1* (citosòlica) i *IDH2* (mitocondrial) converteixen l'isocitrat en alfa-cetoglutarat, que constitueix un dels passos del cicle de Krebs, una via metabòlica molt important que afecta a molts altres processos bioquímics. Mutacions en aquests gens provoquen la conversió del isocitrat en 2-hidroxioglutarat (55). L'acumulació d'aquest oncometabolit, produeix un bloqueig de la diferenciació cel·lular, inhibint l'activitat de la histona modificadora de cromatina i les demetilases de l'ADN. La inhibició d'aquests reguladors epigenètics provoca una "signatura hipermetilada" que altera l'expressió, i les cèl·lules afectades perden la capacitat de progressar des dels progenitors immadurs a cèl·lules completament diferenciades (56). Les mutacions en *IDH1* i *IDH2* es troben en el 5-10% de les SMD, sent més freqüents en les SMD-EB i inexistents en les SMD amb del(5q) aïllada (57,58). Generalment, les mutacions en *IDH1/2* es produeixen a l'exó 4 i afecten principalment tres residus específics de l'arginina: R132 (*IDH1*), R140 i R172 (*IDH2*). Clínicament, les mutacions en *IDH* es poden veure més freqüentment en aquells pacients amb major recompte plaquetari (59).

La rellevància pronòstica de les mutacions de *IDH* depenen de la mutació identificada. Les mutacions en el codó 132 de *IDH1* i el codó 172 de *IDH2* semblen estar associades amb supervivències globals més curtes, però per altra banda, la mutació en el codó 140 de *IDH2* no s'ha vinculat a mal pronòstic en les SMD (60). En les SMD de baix risc, les mutacions en *IDH2* són un factor pronòstic advers en termes de supervivència global, quan es donen en coexistència amb mutacions en *DNMT3A*, *ASXL1* i *SRSF2* (59). Actualment s'estan utilitzant molècules inhibidores de *IDH* mutat en assajos clínics per a pacients amb LAM portadors d'aquestes mutacions.

### **C) Modificació d'histones:**

Un altre mecanisme de regulació epigenètica és la modificació covalent de les histones. L'acetilació, regulada per histones acetiltransferases i deacetilases, canvia la càrrega de la cua de l'histona fent que es modifiqui l'arquitectura de la cromatina, que es troba relaxada quan està acetilada i es compacta quan es troba deacetilada, promovent i reprimint l'expressió gènica respectivament.

**ASXL1** (20q11.1): codifica per a una proteïna d'unió a la cromatina involucrada en la regulació epigenètica de les cèl·lules mare hematopoètiques, i juga un paper molt important reclutant al "complex repressiu del polycomb 2" (PRC2). Aquest complex normalment reprimeix l'expressió de varis gens relacionats amb leucemogènesi, i és per aquest motiu, que la pèrdua de funció d'*ASXL1* altera la diferenciació mieloide i condueix a la leucemogènesi (61,62). Les mutacions del gen *ASXL1* són del tipus *nonsense* i insercions/delecions que provoquen un canvi en la pauta de lectura a l'extrem 5' de l'exó 12, el que provoca una pèrdua de l'expressió de la proteïna *ASXL1*. Es detecten mutacions en *ASXL1* en el 5-25% de les SMD, i s'associen a una menor supervivència independentment d'altres paràmetres clínics com l'edat, la citogenètica i les citopènies i per això es considera un marcador de pronòstic advers (50,61,63). Les mutacions en *ASXL1* es detecten en pacients que es transformen a LAM, el que suggereix un possible paper en la progressió de la malaltia.

**EZH2** (7q35-36): gen que codifica per la subunitat catalítica del complex PRC2. Aquest complex té activitat histona metiltransferasa (HMT) i la seva diana és la lisina 27 de la histona H3 (H3-K27). La metilació de la H3-K27 és una marca de la cromatina comunament associada al silenciament de gens de diferenciació (64). Les mutacions en *EZH2* poden ser del tipus *missense*, *nonsense* i *frameshift* i provoquen una pèrdua de funció de la proteïna, suggerint que *EZH2* actua com a supressor tumoral per les neoplàsies mieloides (65). S'han descrit mutacions en *EZH2* en aproximadament el 5-12% de les SMD, i poden coexistir amb mutacions de *TET2*. Els models preclínic han descrit que l'associació d'ambdues alteracions accelera l'aparició de la malaltia (66). Les mutacions d'*EZH2* són un biomarcador pronòstic associat a supervivències globals més curtes en SMD de baix i alt risc (33) i s'ha descrit que els pacients amb SMD de baix risc i mutacions de *EZH2* tindrien pitjor pronòstic i es beneficiarien de començar abans el tractament. Les mutacions d'*EZH2* poden coexistir amb mutacions de *TET2*, i l'associació d'ambdues mutacions podria estar relacionada amb una malaltia més progressiva (46)

#### **D) Factors de transcripció:**

Els factors de transcripció són unes proteïnes que participen en la regulació de la transcripció, sense formar part de l'ARN polimerasa. Poden actuar reconeixent i unint-se a seqüències concretes de l'ADN, unint-se a altres factors, o unint-se directament a l'ARN polimerasa. Aproximadament el 20% dels pacients amb SMD presenten alteracions en algun factor de transcripció com *RUNX1*, *GATA2* i *ETV6*, ocasionant la pèrdua de funció d'aquests factors (57).

**RUNX1** (21q22): gen que codifica per la subunitat alfa de la proteïna del factor d'unió a l'ADN, de CBF (*core binding factor*), un factor de transcripció heterodímer involucrat en la regulació de nombrosos gens essencials per a l'hematopoesi. Les mutacions en *RUNX1* afecten als extrems N- i C-terminal i poden ser del tipus *missense*, *nonsense*, *frameshift* o de *splicing*. Aquestes mutacions donen lloc a una proteïna truncada o aberrant amb un efecte dominant negatiu o d'haploinsuficiència, que juga un paper en la leucemogènesi (33,67,68). S'han descrit mutacions de *RUNX1* en aproximadament el 10-15% dels pacients amb SMD (67). Aquest percentatge augmenta fins a més del 20% en SMD d'alt risc, SMD-t i en LAM post SMD amb baix percentatge de blasts, el que suggereix la seva associació amb un fenotip d'alt risc. Freqüentment s'associa amb  $-7/\text{del}(7q)$  i trombocitopènia severa. Les mutacions en *RUNX1* són un biomarcador pronòstic associat a supervivències globals més curtes (33). S'han descrit mutacions de *RUNX1* d'origen germinal, les quals s'han associat a una alta probabilitat de que produeixin insuficiència de la MO que amb el temps acabi derivant en alguna malaltia hematopoètica de línia mieloide (6,69,70).

**BCOR** (Xp11.4): gen que codifica per una proteïna correpressora de *BCL6*. S'han detectat mutacions en *BCOR* en el 5% dels pacients amb SMD, i s'ha descrit la seva coexistència amb mutacions en *RUNX1* i *DNMT3A*, fet que s'associa amb una menor supervivència global i un major risc de transformació leucèmica (71).

### E) Transducció de senyals, vies de senyalització

És freqüent trobar pacients amb SMD portadors de mutacions en els gens *CBL*, *JAK2*, *NRAS*, *MPL*, *NF1*, *PTPN11*, *KIT* i *FLT3*. Les alteracions heterozigòtiques descrites en aquests gens es localitzen, majoritàriament, en regions hotspot sent més freqüents les mutacions *missense* (com en els gens *NRAS*, *KRAS* i *MPL*) i les *frameshift* (com *FLT3*). Totes elles causen l'activació constitutiva de les proteïnes codificants (67).

**RAS**: aquestes proteïnes són petites GTPases que activen nombroses vies de transducció de senyals (són mitjanceres centrals *downstream* de la senyalització del receptor dels factors de creixement), i per tant, crítics per a la proliferació cel·lular, la supervivència i la diferenciació. Les mutacions en la família dels protoncogens *RAS*, que comprenen *H-RAS*, *N-RAS* i *K-RAS* són molt freqüents en tot tipus de càncer, i afecten aproximadament al 5-10% de les SMD (72).

**CBL** (11q23.3): és un protoncogen que codifica per la proteïna CBL, que és una ubiquitin-lligasa. Aquest enzim té la funció de marcar els substrats que seran degradats pel proteosoma.

S'observen tant fusions com mutacions *nonsense* i *silent* associades a càncer, i en les SMD aquestes mutacions es troben descrites en menys del 5% dels pacients (72).

## F) Cohesines

**STAG2** (Xq25): gen que codifica per una subunitat del complex de cohesines, el qual està involucrat en molts processos cel·lulars, com per exemple la reparació del trencament de la doble cadena d'ADN, i la segregació de les cromàtides durant la mitosi (73).

## G) Reparació del dany cel·lular

**TP53** (17p13): és un gen supressor de tumors (GST) que codifica per una proteïna que també funciona com factor transcripcional, i que en situació d'estres cel·lular regula l'expressió de gens involucrats en l'arrest del cicle cel·lular, apoptosi, senescència, reparació de l'ADN i canvis en el metabolisme de la cèl·lula. *TP53* és el gen més freqüentment mutat en càncer, i les mutacions alteren la funció normal del gen, provocant dany en l'ADN i afectant la supervivència i proliferació cel·lular (74). Està descrit que el gen *TP53* es troba alterat en el 5-10% de les SMD, però aquest percentatge augmenta en les SMD d'alt risc. Les mutacions es troben localitzades al llarg de tot el gen, i a més a més, poden donar-se juntament amb la pèrdua del segon al·lel de *TP53* mitjançant la deleció d'un dels braços del cromosoma 17 (67). Les mutacions de *TP53* en les SMD s'han associat a manifestacions clíniques desfavorables, com per exemple malaltia avançada, cariotips complexos, en ocasions amb afectació del cromosoma 5, i amb els cariotips monosòmics, excés de blasts a MO i trombocitopènia severa presentant un valor pronòstic independent (67,75). La supervivència global dels pacients amb mutacions en *TP53* és inferior a la dels pacients que no presenten mutacions en aquest gen (75). Alhora les mutacions en *TP53* també s'han associat a pitjor pronòstic en els pacients que han rebut un transplantament de progenitors hematopoètics (50,76,77), i menor supervivència en pacients amb SMD d'alt risc i LAM tractats amb azacitidina (AZA) (78).

En relació amb els pacients que presenten cariotip complex, aproximadament el 50% dels casos s'associen a mutacions en *TP53*. L'altre 50% de pacients que no tenen mutacions en *TP53* però tenen cariotip complex, presenten una supervivència global comparable a la dels pacients amb cariotips no complexos. Per tant, l'estat mutacional de *TP53* pot ser útil per a refinar el pronòstic d'aquets pacients típicament considerats com de major risc (79).

Per altra banda, les mutacions de *TP53* s'han associat a resistència al tractament amb lenalidomida en pacients amb SMD i del(5q), ja sigui com anomalia aïllada o com a part del

cariotip complex (80). Aproximadament un 18% dels pacients amb SMD i del(5q) presenten mutacions en *TP53* i, en aquests casos, el tractament amb lenalidomida produeix respostes subòptimes, recaigudes o resistència al fàrmac (33,81). En aquests casos, les mutacions en *TP53* poden ser events secundaris que estan sovint en subclones petites que poden expandir-se durant el tractament. És per aquest motiu que la OMS recomana avaluar les mutacions de *TP53* en pacients amb SMD i del(5q) aïllat, per ajudar a identificar un subgrup de pronòstic advers en aquesta entitat generalment de pronòstic favorable (3,6).

A nivell de tractament, s'han investigat fàrmacs *antisense* complementaris a *TP53* que inhibiria l'expressió de la proteïna p53 mutada i restauraria l'eritropoesi en pacients amb SMD del(5q)(82). Pel que fa al tractament amb hipometilants, un parell d'articles han descrit que les mutacions de *TP53* s'associen a majors taxes de resposta a decitabina (DEC) en SMD i LAM (en comparació amb l'AZA), tot i que hi ha discrepàncies en quant a l'associació de la resposta a una millor supervivència global (83,84).

En resum, el panorama mutacional de les SMD és complex i dinàmic. Un pacient pot presentar múltiples mutacions, alhora diversos perfils mutacionals poden estar presents en una o més subclones, i les proporcions d'aquestes subclones poden canviar durant el tractament i la progressió de la malaltia (85).

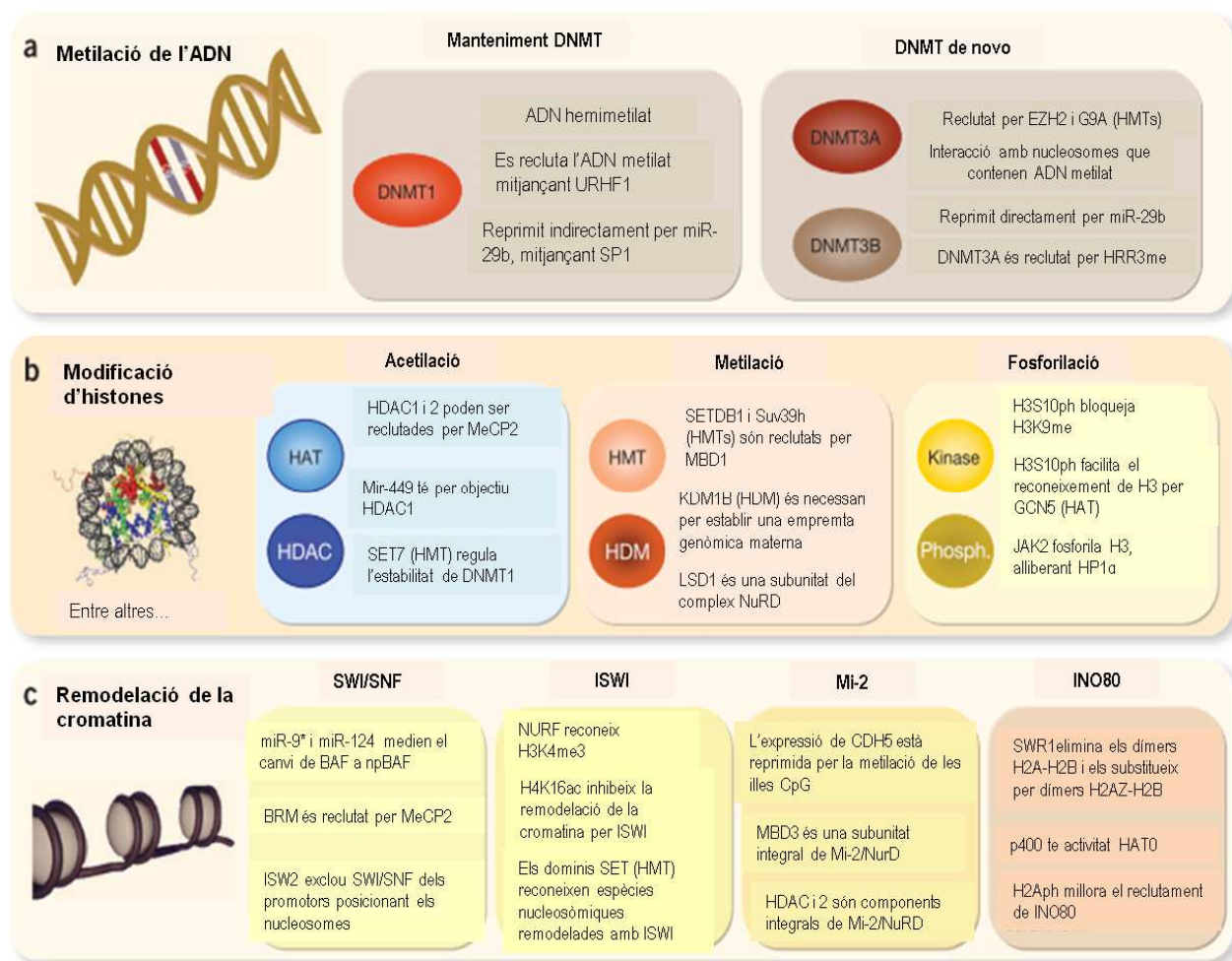
Cal remarcar l'existència de mutacions clonals, idèntiques a les que es detecten en les SMD, en cèl·lules hematopoètiques de persones grans aparentment sanes, sense SMD, és l'anomenada "hematopoesi clonal de potencial indeterminat" (CHIP). Per tant, la presència de mutacions somàtiques associades a SMD, per si soles, no són considerades diagnòstic de SMD en l'actual classificació, fins i tot en pacients amb citopènies inexplicables.

### **3.5.3. Perfils epigenètics**

Paral·lelament, als recents avenços tècnics en seqüenciació massiva s'ha de tenir en compte les tecnologies basades en *arrays* (matrius) que també han estimulat estudis sistemàtics a gran escala del paisatge epigenòmic, sovint complex, en les neoplàsies mieloides. Aquests esforços han posat de manifest la desregulació a diferents nivells dels processos transcripcionals, causats per la metilació aberrant de l'ADN, les modificacions/remodelació de la cromatina i l'expressió aberrant de l'ARN no codificant, entre altres, com una característica de molts tipus de càncer incloent les SMD.

Les modificacions epigenètiques afecten de manera simultània a grans regions de l'ADN i modifiquen l'expressió de determinats gens, sense introduir modificacions en la seva seqüència. Alteren l'accessibilitat dels factors reguladors de la transcripció a l'ADN, per mitjà de diversos processos com ara: la metilació de citosines en illes CpG de l'ADN, induint modificacions en les histones (acetilació/desacetilació i metilació/desmetilació), remodelant els nucleosomes i induint un silenciament transcripcional per mitjà dels miRNAs (Figura 5). És important tenir en compte la interacció entre els diferents factors epigenètics, ja que el resultat observat serà sempre la suma de les seves interaccions i els molts mecanismes de retroalimentació positiva i negativa (86).

És important ressaltar que els canvis epigenètics són intrínsecament heretables a nivell de les cèl·lules somàtiques. Això és essencial per a una herència fenotípica estable, i l'estructura i la funció de l'epigenoma es poden canviar per factors intrínsecs i extrínsecs com les mutacions o l'envelliment. Aquests canvis, per tant, poden alterar fonamentalment el comportament de les cèl·lules mare i les seves jerarquies de diferenciació, donant lloc a estats cel·lulars que siguin més permissius per a l'expressió d'oncogens mutats (87). Les alteracions produïdes en cadascú d'aquests mecanismes epigenètics donarà lloc a una transcripció aberrant de gens que poden estar implicats en processos de creixement, proliferació i diferenciació cel·lular o apoptosi, participant en el desenvolupament de la malaltia (88). Els canvis epigenètics han estat reconeguts en les últimes dècades com a principals motors del fenotip maligne (89), i alhora, són tan eficaços com les mutacions genètiques a l'hora de modificar l'activitat dels gens.



**Figura 5.** Maquinària epigenètica i interacció entre diversos factors epigenètics. Les marques epigenètiques estan catalitzades per diferents complexos epigenètics, les famílies principals de la qual estan il·lustrades aquí (a-c). La regulació epigenètica depèn de la interacció entre els diferents components: metilació de l'ADN (a), modificacions en les histones (b) i el posicionament del nucleosoma (c). La interacció entre els diferents factors provoca el resultat final. Aquesta figura il·lustra exemples seleccionats de les possibles interrelacions entre els diversos components epigenètics. Imatge modificada de Portela i Esteller, *Nature Biotechnology*, 2010 (86).

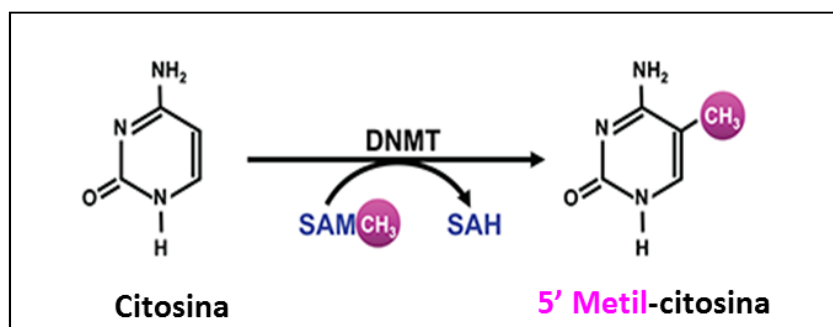
A diferència de les alteracions genètiques, els canvis epigenètics en el càncer són potencialment reversibles per mitja de la teràpia epigenètica. La via d'actuació és revertir els canvis de l'expressió gènica patològica en les cèl·lules malignes, que es suposa que pot provocar un efecte terapèutic que culmini amb respostes tumorals. L'efecte terapèutic específic induït per aquests agents és encara avui qüestió de debat, i hi ha dades que postulen que aquesta teràpia afecta moltes vies diferents, com ara la diferenciació, la senescència, l'apoptosi, el reconeixement immunitari, etc... (90). A més a més, molts fàrmacs epigenètics

mostren citotoxicitat dosi-depenent (91,92), el qual podria ser també un factor de resposta. La combinació de la inhibició de múltiples dianes epigenètiques és probablement sinèrgica, tal i com es demostra per la desmetilació de l'ADN i la inhibició de les histones deacetilases (HDAC) (93). Per tant, es disposa de dues dianes epigenètiques, els fàrmacs hipometilants i els fàrmacs inhibidors d'histones deacetilases (94).

D'entre tots els mecanismes epigenètics, aquesta tesi ha estudiat el paper de la metilació, per tant, el veurem amb més detall:

### 3.5.3.1. Metilació

La metilació de l'ADN, com a principal modificació epigenètica, juga un paper vital en la regulació transcripcional i la remodelació de la cromatina i implica la transferència d'un grup metil a un residu de citosina dins d'un dinucleòtid CpG, catalitzat per una ADN metiltransferasa (DNMT) (Figura 7).

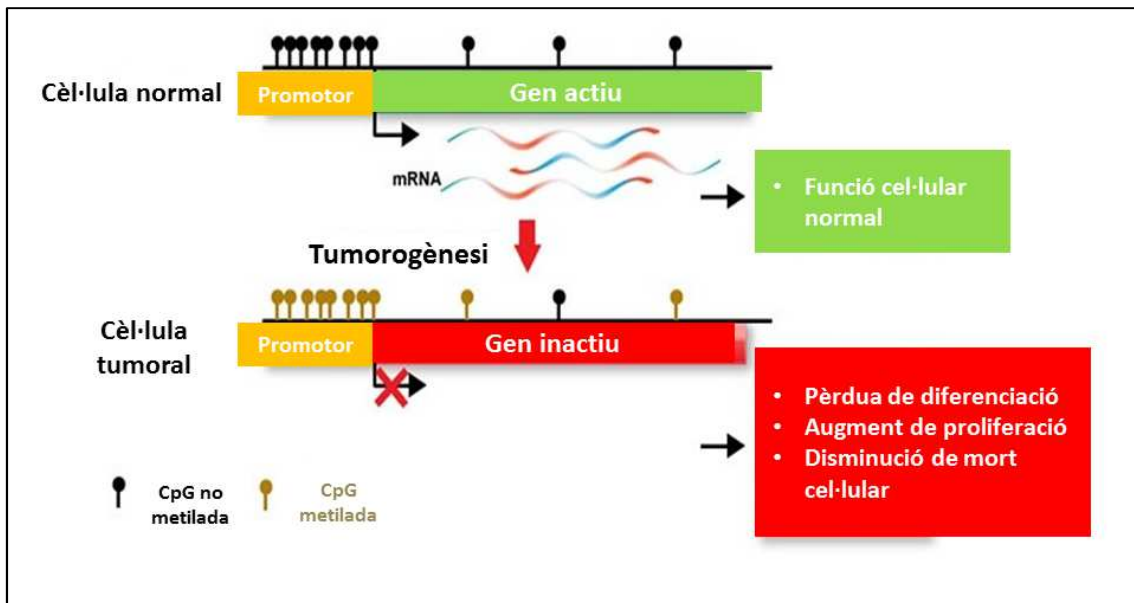


**Figura 7.** Esquema del procés de metilació de l'ADN.

La majoria de les CpGs del genoma estan metilades, especialment en regions repetides que contribueixen a l'estabilitat de l'heterocromatina. Les regions enriquides en CpG, anomenades illes CpG, també es troben en els promotors de gens, i la majoria d'aquestes illes CpG no estan metilades en teixits normals, independentment de l'estat de diferenciació. Aquesta manca de metilació a les illes CpG associades al promotor permet l'expressió gènica, si els factors de transcripció adequats estan presents, i l'estructura de la cromatina permet accedir-hi. S'ha trobat que l'aberració del perfil de metilació de l'ADN està associada a moltes malalties humanes incloent el càncer. S'ha descrit el "metiloma" de la cèl·lula leucèmica com globalment hipometilat, amb hipermetilació aberrant en alguns promotors de gens (95–97). Seria l'acumulació de metilació anormal el que contribuiria activament a la progressió de les SMD



(98). L'hipermetilació provoca un silenciament en l'expressió dels gens, incloent GST, gens involucrats en la reparació del dany de l'ADN i reguladors del cicle cel·lular (99) (Figura 8).



**Figura 8.** La metilació de les illes CpG localitzades en els promotors dels gens comporten la inactivació de l'expressió del gen corresponent.

Hi ha evidències considerables que els canvis epigenètics tenen un paper en la patogènesi dels trastorns mieloides i, per tant, poden ser unes bones dianes terapèutiques. El silenciament de GST via metilació de l'ADN s'ha descrit com un segon "hit" per a la transformació cel·lular, equivalent a les mutacions o translocacions (100). Entre els exemples de gens silenciats per la metilació de l'ADN en els trastorns mieloides es troba el *CDH1*, *CDKN2A* (p14, p16), *CDKN2B* (p15), *CTNNA1*, *MEG3* i *SNRPN*. Rarament s'ha trobat que els gens silenciats per metilació de l'ADN en SMD i LAM estiguin també inactivats per mutacions. Tot i això, l'augment de la metilació de l'ADN de les zones promotores s'associen a fenòmens de progressió en les SMD.

Estudis a gran escala de l'estat de metilació en les SMD demostren que el 12% dels gens analitzats en les SMD d'alt risc mostren un increment de la metilació en les zones promotores, en comparació amb només el 6% dels gens en les SMD de baix risc; tanmateix, aquesta diferència no és estadísticament significativa (101). La majoria de gens identificats estan implicats en funcions tan importants com la reparació de l'ADN, el control del cicle cel·lular i la regulació del desenvolupament, diferenciació i l'apoptosi. Entre els pacients amb SMD d'alt risc el 70% tenia hipermetilació d'*ALOX12*, *GSTM1*, *HIC1*, *FZD9* i *HS3ST2* (96). A més a més, està reportat que l'ús terapèutic d'inhibidors de DNMT comporta una reducció global de la metilació en els promotors (96).

A diferència de les alteracions genètiques, els canvis epigenètics en el càncer són potencialment reversibles per inhibició farmacològica de la metilació de l'ADN i la desacetilació de les histones. L'eficàcia dels agents hipometilants (AHM) com l'azactidina (AZA) o la decitabina (DEC) en pacients amb SMD van suggerir fortament la rellevància fisiopatològica de la metilació de l'ADN (102). El reclutament de les metiltransferases induït pels azanucleosids és un fenomen que es dona amb menor intensitat en les cèl·lules normals que en les tumorals. El mecanisme d'acció que dona nom als fàrmacs hipometilants no explica del tot el seu efecte terapèutic ja que, encara que la hipometilació de l'ADN sembli una circumstància necessària, no és suficient per aconseguir-lo i podria, per tant, no ser l'element central de la seva activitat farmacològica. Els AHM no només modifiquen l'activitat de les metiltransferases de l'ADN que introdueixen grups metil en l'ADN de cèl·lules en divisió, sinó que també afecten a les histones metiltransferasa (HMT), que fan lo propi amb les histones de les cèl·lules quiescents. L'AZA i la DEC són dos hipometilants anàlegs de la citosina amb activitat en la leucèmia (103,104). Els dos fàrmacs es van sintetitzar cap als anys 1960 com a anàlegs de la citosina, i cap als inicis dels anys 1980 van demostrar ser potents inhibidors de la metilació de l'ADN i inductors de la diferenciació in vitro (105). La inhibició de la metilació de l'ADN està relacionada amb el fet que comparteixen una estructura modificada de l'anell de citosina amb la substitució d'una C per una N a la posició 5', donant lloc a una captura i eventual degradació de les ADN metiltransferases (106). L'AZA s'incorpora a l'ARN i, després d'una conversió intracel·lular a DEC, s'incorpora a l'ADN i inhibeix la metilació de l'ADN. A diferència de l'AZA, la DEC no s'incorpora a l'ARN sinó que s'incorpora directament a l'ADN, fet que comporta que tingui 10 vegades més activitat desmetilant a concentracions equimolar en experiments in vitro (105).

Hi ha tres grans mètodes per analitzar el grau de metilació de l'ADN: metilació sensible a la restricció per endonucleases, estratègies d'enriquiment de l'ADN metilat i la conversió per bisulfit. La conversió per bisulfit canvia les citosines a uracils, però manté intactes les 5-metilcitosines. Per mitjà de PCR es pot fer la comparació dels nivells de C/T i fer una aproximació de l'estat de metilació. Una gran varietat de mètodes es poden utilitzar per mesurar aquest estat de metilació, incloent la PCR específica de metilació, anàlisis de curves de melting específiques de metilació, seqüenciació (tradicional o de piroseqüència), etc... En aquesta tesi s'ha utilitzat el mètode Infinium Human Methylation 450K BeadChip d'Illumina, un *array* on s'avalua l'estat de metilació de 485.764 citosines distribuïdes per tot el genoma, i ens permet tenir una idea global de l'estat de metilació de l'ADN.

### 3.6. Índexs pronòstics de les síndromes mielodisplàstiques

Els índexs pronòstics són sistemes de puntuació que inclouen variables clíniques, biològiques, citogenètiques i/o moleculars, i que s'utilitzen per a estratificar als pacients en funció del seu pronòstic. Les SMD presenten una gran variabilitat pronòstica, tant en termes de supervivència global com de risc a evolució a LAM (107,108). Això, unit a l'avançada edat de la gran majoria dels pacients, a la presència de freqüents comorbiditats significatives i a l'elevada morbimortalitat de les alternatives terapèutiques amb potencial curatiu, dificulta notablement la selecció del tractament a un pacient concret. Així, establir de forma precisa e individualitzada el pronòstic d'un pacient és essencial per a adaptar la modalitat de tractament a utilitzar al risc estimat.

#### 3.6.1. IPSS

Des de la seva creació l'any 1997, el "*International Prognostic Scoring System*" (IPSS) ha estat universalment utilitzat en la pràctica clínica diària, ja que és un model senzill d'aplicació per a caracteritzar els pacients amb SMD i definir pautes de tractament consensuades (109,110)(Taula 5). Tot i que representava l'estàndard clínic per a l'avaluació del risc en les SMD, l'IPSS presentava diverses deficiències, entre les quals hi havia una subestimació del risc en alguns pacients sense excés de blasts o amb cariotips alterats.

**Taula 5.** Índex pronòstic internacional (IPSS)

Índex pronòstic internacional (IPSS)					
Variables pronòstiques	0 punts	0.5 punts	1 punt	1.5 punts	2 punts
Blasts MO (%)	<5%	5-10%		11-20%	21-30%
Cariotip	Bo	Intermig	Dolent		
Citopènies	0-1	2-3			

**Cariotip bo:** cariotip normal, -Y, del(5q), del(20q) com anomalies úniques; **Dolent:** cariotip complex (≥3 alteracions) o anomalies del cromosoma 7; **Intermig:** altres anomalies úniques o dobles.

Grup de risc	Baix	Intermig-1	Intermig-2	Alt
Puntuació	0	0.5-1	1.5-2	2.5-3.5
Mediana SG	5.7 anys	3.5 anys	1.1 any	0.4 anys

Modificat de Greenberg et al. Blood 1997.

### 3.6.2. WPSS

Un altre esquema d'estratificació de risc utilitzat per predir el pronòstic en les SMD és el sistema de puntuació pronòstica basat en la classificació de la OMS (WPSS), que incorpora variables addicionals com les necessitats transfusionals i que va ser definit l'any 2007 pel grup de Pavia (111)(Taula 6). Aquesta puntuació suggereix que els pacients amb displàsia eritroide unilínia i sense necessitat de transfusió estable tenen un pronòstic comparable a la mitjana de la població. Independentment del grup de risc definit pel percentatge de blasts i el perfil citogenètic, la presència de transfusions implica un pitjor pronòstic. El WPSS pot ser particularment útil quan s'aplica a casos de baix risc i en moments que no siguin al diagnòstic (111).

**Taula 6.** Sistema de puntuació pronòstica per les SMD basada en la classificació de la OMS

Sistema de puntuació pronòstica basat en la classificació de la OMS (WPSS)				
Variable pronòstica	0 punts	1 punt	2 punts	3 punts
Categoria OMS	AR, ARSA, 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariotip*	Bo	Intermig	Dolent	-
Necessitats transfusionals <sup>†</sup>	Sense	Freqüent	*	*

\* **Cariotip bo:** cariotip normal, -Y, del(5q), del(20q) com anomalies úniques; **Dolent:** cariotip complex (≥3 alteracions) o anomalies del cromosoma 7; **Intermig:** altres anomalies úniques o dobles.

<sup>†</sup>Dependència transfusional definida com almenys una transfusió cada 8 setmanes durant un període de 4 mesos.

Grup de risc	Molt Baix	Baix	Intermig	Alt	Molt alt
Puntuació	0	1	2	3-4	5-6

Modificat de Malcovati et al. JCO 2007 (111)

### 3.6.3. IPSS-R

L'any 2012 va haver-hi una revisió i actualització del IPSS, donant lloc al "*Revised International Prognostic Scoring System*" (IPSS-R) per abordar les limitacions que presentava el IPSS. Primerament, el IPSS-R amplia el nombre d'alteracions cromosòmiques considerades pel model pronòstic. Segon, dona major pes a les lesions citogenètiques adverses que a l'excés de blasts. En tercer lloc, les citopènies es tracten de forma individual i es puntuen segons la gravetat. Finalment, s'inclou l'edat del pacient per recalculer el IPSS-R i fer un càlcul del risc ajustat a l'edat (IPSS-RA). Aquests canvis afegeixen complexitat en comparació amb l'IPSS, però no es necessita cap informació clínica nova per a calcular la puntuació IPSS-R, que es pot

calcular amb l'ajuda d'un aplicatiu en xarxa ([www.ipss-r.com](http://www.ipss-r.com)). L'IPSS-R és significativament millor predint la supervivència i l'evolució a LAM que l'original IPSS (112).

**Taula 7.** Índex pronòstic internacional revisat (IPSS-R)

Índex pronòstic internacional revisat (IPSS-R)*							
Característica	0 punts	0.5 punts	1 punts	1.5 punts	2 punts	3 punts	4 punts
Grup de risc citogenètic	Molt bo		Bo		Intermig	Pobre	Molt pobre
Blasts MO, %	0-2		>2-<5		5-10	≥10	
Hemoglobina, g/dL	≥10		8-<10	<8			
Plaquetes, x10 <sup>9</sup> /L	≥100	50-99	<50				
PMN, x10 <sup>9</sup> /L	≥0.8	<0.8					

Grup de risc	Molt Baix	Baix	Intermig	Alt	Molt alt
Puntuació	0-1.5	>1.5-3	>3-4.5	>4.5-6	>6

Modificat de Greenberg et al. Blood 2012 (113).

Categories de risc citogenètic *	
<b>Risc</b>	Anomalies citogenètiques
Molt bo	-Y, del(11q) aïllades
Bo	Normal, del(5q), del(12p) i del(20q) aïllades i anomalies dobles que incloguin del(5q)
Intermig	Del(7q), +8, +19, i(17q) aïllada i qualsevol altre anomalia única o doble independent
Pobre	-7 e inv(3)/t(3q)/del(3q) aïllades, anomalies dobles que incloguin -7/del87q) i anomalies complexes amb 3 alteracions
Molt pobre	Alteracions complexes amb més de 3 anomalies

\*categories definides per Schanz et al., J Clin Oncol 2012 (114).

En els últims anys han aparegut noves propostes de factors pronòstics tals com:

- Els valors de **ferritina sèrica**, ja que està comprovat que el desenvolupament de sobrecàrrega fèrrica (>1000ng/mL) afecta negativament a la supervivència dels pacients i en el risc de d'evolució a LAM (111).
- L'existència de **mielofibrosis** s'ha reconegut com un factor desfavorable en la supervivència global i risc de transformació a LAM en pacients tant de categories de baix risc com d'alt risc segons la OMS (115,116).

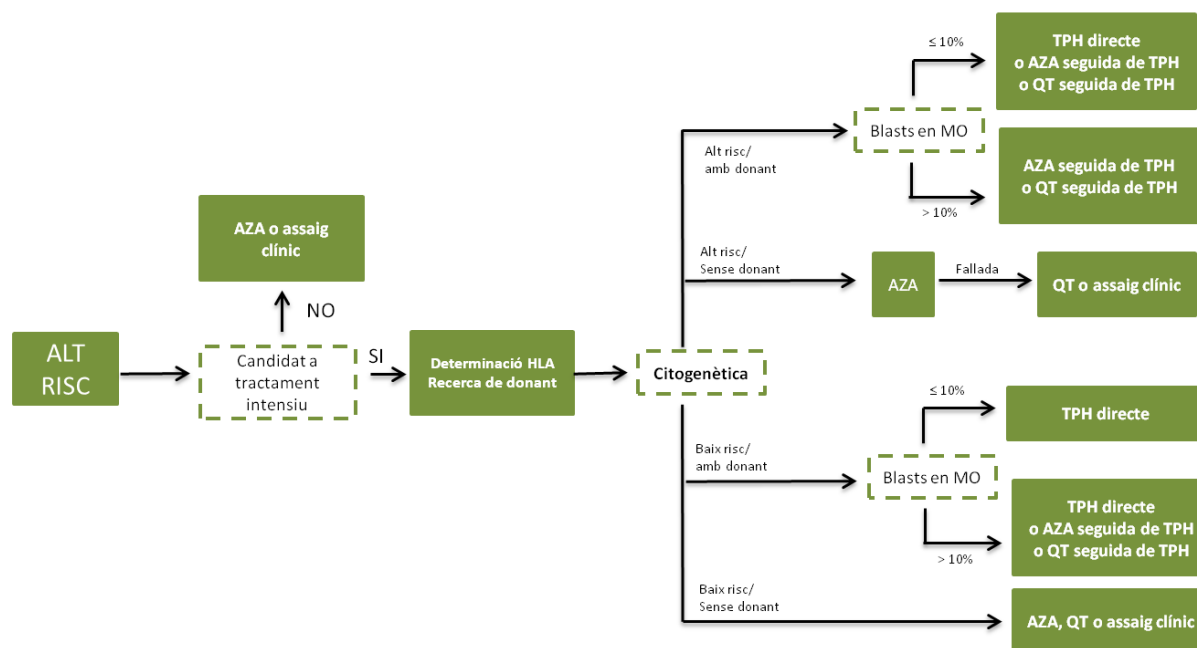
- La **trombocitopènia** greu (plaquetes  $<30 \times 10^9/L$ ) és més freqüent en pacients amb IPSS d'alt risc, però també es pot trobar en pacients amb IPSS de baix risc, i diversos estudis han posat de manifest el seu impacte negatiu en el pronòstic (11,117–119).
- La **neutropènia** greu (PMN  $<0,5 \times 10^9/L$ ) també té un pes pronòstic independent tant en la supervivència global com en la progressió a LAM en pacients amb SMD de baix risc (120).
- La presència de **mutacions** genètiques específiques han demostrat tenir impacte en el pronòstic dels pacients amb SMD tan de baix com d'alt risc (29,67,70,121). Actualment s'està treballant per treure un nou índex pronòstic que incorpori l'estat mutacional de determinats gens (IPSS-molecular).

### 3.7. Tractament

La decisió d'iniciar tractament en els pacients amb SMD ha de basar-se en el seu pronòstic individual. Actualment, en les SMD s'està utilitzant una estratègia de tractament adaptada al risc, és a dir, segons l'índex pronòstic els pacients es classificaran com de baix risc o d'alt risc.

#### 3.7.1. Tractament SMD alt risc

El pacients d'alt risc tenen una mediana esperada de supervivència global inferior als 30 mesos i l'objectiu terapèutic és modificar el curs natural de la malaltia, augmentar la supervivència i reduir el risc de transformació a LAM. El tractament de la majoria de pacients amb SMD d'alt risc no és satisfactori ni es pot considerar estandarditzat, per la qual cosa es recomana que participin en assajos clínics sempre i quan sigui possible. Aquests pacients hauran de rebre el tractament que es consideri oportú sense tardança. Les diverses opcions terapèutiques en pacients amb SMD d'alt risc es reflecteixen en la Figura 10 (122).



**Figura 10.** Algoritme de tractament de les SMD d'alt risc segons les guies espanyoles de SMD, segona edició 2020 (122).

Anomalies citogenètiques d'alt risc:  $-7$  i  $inv(3)/t(3q)/del(3q)$  aïllades, dues anomalies, incloent  $-7/del(7q)$  i anomalies complexes ( $\geq 3$  anomalies); de baix risc: la resta. Aza: azacitidina; HLA: antigen leucocitari humà; MO: medul·la òssia; QT: quimioteràpia tipus LAM; TIS: tractament immunosupressor; TPH: trasplantament de progenitors hematopoètics.

- A) Tractament de suport: Es considera tractament de suport l'encaminat a la millora global de símptomes o signes provocats per la malaltia de forma inespecífica. El tractament de suport ha de contemplar el tractament de l'anèmia (AEE i transfusions), neutropènia, trombocitopènia, sobrecàrrega de ferro transfusional i altres mesures de suport. Els pacients no aptes per a altres tractaments perquè la seva reserva funcional està molt reduïda o tenen molta comorbiditat són tributaris d'un tractament exclusivament de suport.
- B) Agents hipometilants: s'han de considerar com el tractament de primera línia en les SMD d'alt risc que no es considerin candidats a tractament intensiu, o bé, que tot i ser considerats adients a tractament intensiu no disposin d'un donant apropiat per a fer trasplantament al·logènic. L'AZA i la DEC són AHM que inhibeixen la ADN metiltransferasa a dosis inferiors a la que produeix citotoxicitat, sent capaços de revertir el silenciament transcripcional de GST i restaurar el funcionament normal de les cèl·lules alterades. Els AHM han demostrat eficàcia en les SMD, especialment en

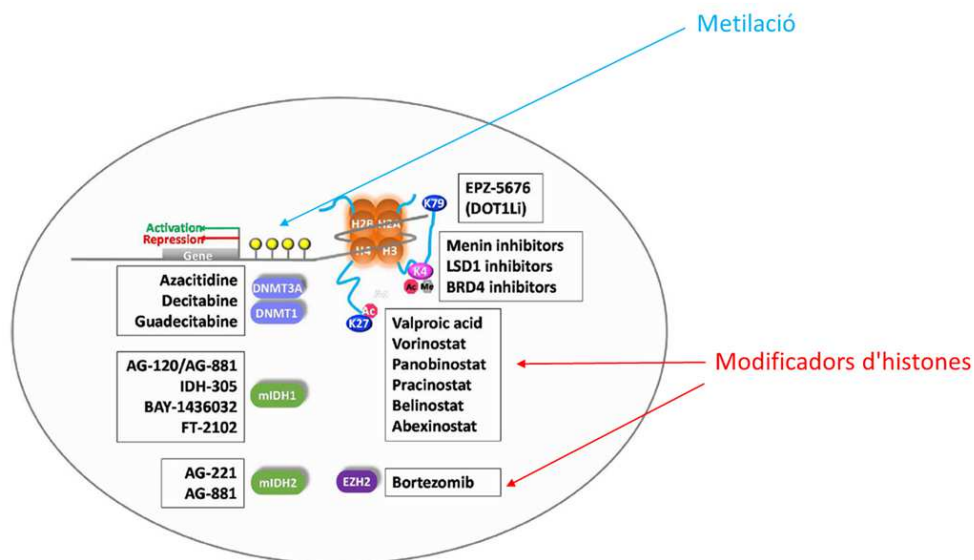
pacients d'alt risc (123,124). El grup cooperatiu d'estudi i tractament de leucèmies i mielodisplàsies (CETLAM) van establir un protocol assistencial pel tractament de les SMD d'alt risc (2009 i 2016) basat en aquesta opció terapèutica. En el protocol del 2009 els pacients es classificaven segons citogenètica, comorbiditats i possibilitat de TPH.

- C) Quimioteràpia intensiva tipus LAM: pot ser apropiat com a tractament de primera línia en pacients amb SMD d'alt risc que, sent candidats a tractament intensiu, no disposin de donant apropiat per TPH al·logènic i tinguin una edat inferior als 65 anys, no tinguin comorbiditats greus i presentin una citogenètica de risc favorable. Amb la quimioteràpia intensiva de tipus LAM la taxa de resposta completa és del 50-60%; la incidència de mort precoç, del 20-25%; i la freqüència de malaltia refractària, del 20-25%. Els resultats a llarg termini deixen poc lloc a l'optimisme, amb un risc de recaiguda molt elevat, del voltant del 70-80%, una curta durada de la remissió (mitjana de 8 mesos), d'una mitjana de supervivència global d'aproximadament 12 mesos i escassa proporció de pacients que sobreviuen sense malaltia (10-20%) (125–128).
- D) Trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics: és el tractament d'elecció per a pacients amb SMD d'alt risc i que siguin considerats candidats per aquest tractament, ja que és l'única modalitat amb capacitat curativa demostrada en les SMD. Aquest procediment s'ha de dur a terme tan aviat com es localitzi un donant apropiat (129,130).
- E) Lenalidomida: l'experiència amb aquest fàrmac en les SMD d'alt risc és encara força limitada. Les dades existents suggereixen que seria eficaç de manera temporal únicament en alguns pacients amb deleció 5q aïllada i xifres de plaquetes superiors a  $100 \times 10^9/L$  (131).
- F) Nous agents i combinacions: Hi ha dues classes de fàrmacs en assajos clínics que van dirigits cap a l'epigenoma: els reprogramadors amplis (anomenats medicaments genòmics) i fàrmacs desenvolupats per a tractar subconjunts específics de pacients, que representen teràpies més clàssiques dirigides a dianes de precisió. A dosis adequades de medicament, tant els reprogramadors amplis com els més específics, aconsegueixen interaccions precises amb les proteïnes epigenètiques reguladores de les quals són diana (87).

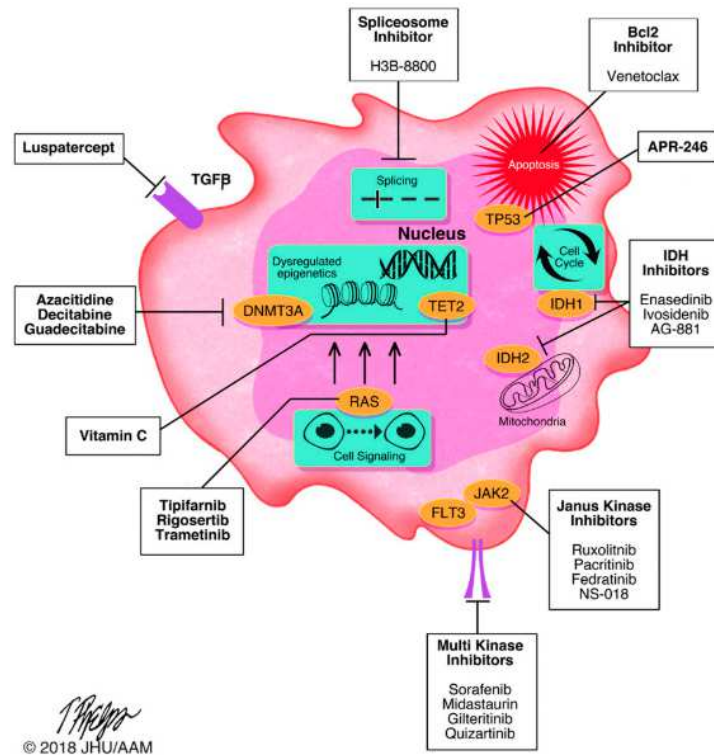
Els càncers en general, i les SMD en particular, utilitzen canvis tant en el genoma com a l'epigenoma per generar mecanismes mitjançant els quals les cèl·lules tumorals poden escapar del control del creixement cel·lular. La presència de cromatina alterada en les cèl·lules



tumorals ha estat palesa des dels primers diagnòstics mitjançant observacions microscòpiques. Atès que les vies epigenètiques presenten una major flexibilitat en relació amb alteracions genètiques, és probable que els tumors es basin més en alteracions epigenètiques per escapar de la vigilància immune i desenvolupar la resistència als fàrmacs. Els processos epigenètics, particularment els que intervenen en la metilació de l'ADN, són somàticament heretables i poden contribuir a canvis estables però modelables de l'expressió gènica que interaccionen amb altres mutacions gèniques per donar a les SMD l'avantatge d'evolucionar a un ritme molt més ràpid del que podrien aconseguir només amb les alteracions genètiques (87). Alhora, les modificacions epigenètiques també tenen la possibilitat d'activar regions no gèniques del genoma, en particular retrovirus endògens (ERV), augmentant així la mida de la diana. Per tant, els medicaments epigenètics representen autèntics “medicaments genòmics” (Figures 11 i 12) i gairebé amb seguretat mostren la màxima eficàcia quan s'utilitzen en combinació i quan s'utilitzen conjuntament amb altres teràpies com la quimioteràpia estàndard o la immunoteràpia.



**Figura 11.** Tractaments per a pacients amb SMD dirigits contra reguladors epigenètics. Imatge modificada de Heuser M et al, 2018(44).



**Figura 12.** Esquema de teràpies dirigides a dianes moleculars. Inclou teràpies selectives d'investigació i aprovats per a pacients amb SMD i les seves respectives dianes (132).

## **6. HIPÒTESI**

Les SMD són un conjunt de neoplàsies hematològiques que presenten una gran heterogeneïtat a nivell clínic, morfològic i genètic. El diagnòstic de les SMD es basa en l'anàlisi citomorfològic de la MO i la SP. L'estudi citogenètic és obligatori al diagnòstic, i a més a més de ser útil com a marcador de clonalitat és un factor importantíssim per a calcular el pronòstic del pacient. Tot i així, aproximadament la meitat dels pacients amb SMD presenten un cariotip normal.

L'aplicació de tècniques de seqüenciació massiva ha permès augmentar el coneixement de les bases moleculars de les SMD. Actualment es descriu que el 80-90% dels pacients amb SMD presenten mutacions somàtiques en un conjunt de gens, tot i que moltes de les variants detectades no són específiques de cap subgrup en concret i el perfil de mutacions és molt heterogeni. El paper pronòstic d'aquestes mutacions ha estat àmpliament estudiat, i tot i que no existeix encara un índex pronòstic molecular, molts autors coincideixen en definir el mal pronòstic que impliquen les mutacions en *TP53* en les SMD tant pel que fa a la supervivència com a l'impacte en el TPH. Moltes d'aquestes mutacions afecten a reguladors epigenètics involucrats en el mecanisme de metilació de l'ADN o a la modificació d'histones. Alguns estudis suggereixen que aquestes mutacions comporten pèrdues de marques epigenètiques, promovent l'oncogènesi, juntament amb altres mecanismes epigenètics, mitjançant la desregulació de la transcripció.

Aquest treball parteix de la base que els pacients amb SMD d'alt risc tenen una mediana esperada de supervivència global inferior als 30 mesos i l'objectiu terapèutic és modificar l'història natural de la malaltia i perllongar la supervivència mitjançant un tractament actiu, però tot i ser un grup ben definit, presenta molta heterogeneïtat a nivell clínic.

La **hipòtesi global** d'aquesta tesi és que els pacients amb SMD d'alt risc i LAMs presenten diferències a nivell genètic i que les alteracions detectades mitjançant seqüenciació massiva dirigida podrien ajudar a definir millor el pronòstic d'aquests pacients. Així mateix, en aquells pacients que presenten cariotip normal, la detecció de mutacions somàtiques ens permetrà identificar un marcador de clonalitat que podria ser útil a nivell diagnòstic, pronòstic i de monitorització de la malaltia. A més a més, donat que la metilació de l'ADN és el principal mecanisme epigenètic descrit a la leucemogènesi i que l'ús d'agents hipometilants és el tractament de primera línia en els pacients amb SMD d'alt risc no candidats a tractament intensiu, o que no disposin d'un donant compatible per a fer el trasplantament al·logènic, l'estudi dels perfil de metilació de l'ADN al diagnòstic ens podria ser d'utilitat com a predictor de resposta al tractament.

## **7. OBJECTIUS**

L'**objectiu principal** d'aquesta tesi és caracteritzar a nivell genètic, mitjançant seqüenciació massiva dirigida d'un panell customitzat de 83 gens relacionats amb la patologia mieloide, i epigenètic, mitjançant estudis de metilació de l'ADN, els pacients diagnosticats de SMD d'alt risc i LAMs que han estat inclosos al protocol SMD-09 del grup CETLAM.

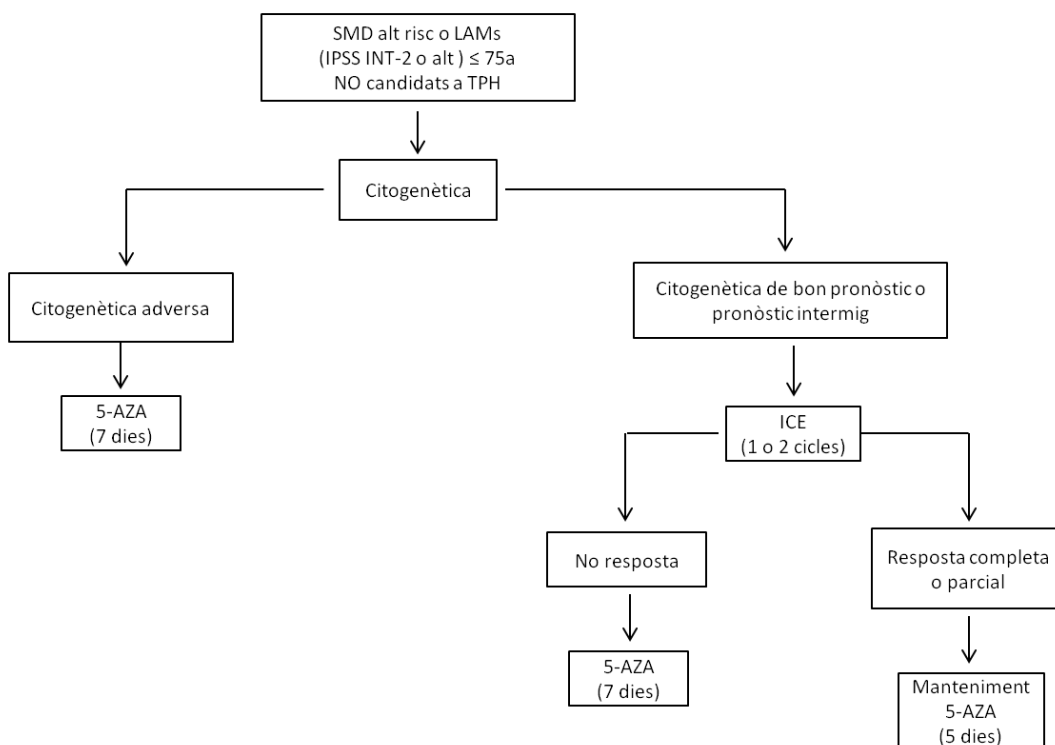
Els **objectius secundaris** són:

- Determinar l'impacte de les mutacions al diagnòstic, en el pronòstic de la malaltia i en la resposta al tractament.
- Determinar l'impacte de les mutacions durant l'evolució de la malaltia, i valorar la possibilitat d'utilitzar la tècnica de seqüenciació massiva com a eina de monitorització de la malaltia.
- Determinar si el patró de metilació d'un o més gens al diagnòstic pot predir la resposta o no al tractament amb fàrmacs hipometilants (azacitidina).
- Definir el patró de metilació de l'ADN al seguiment (post-tractament) dels pacients per poder determinar si existeix un patró comú predictor de progressió/recaiguda.

## **8.MATERIAL i MÈTODES**

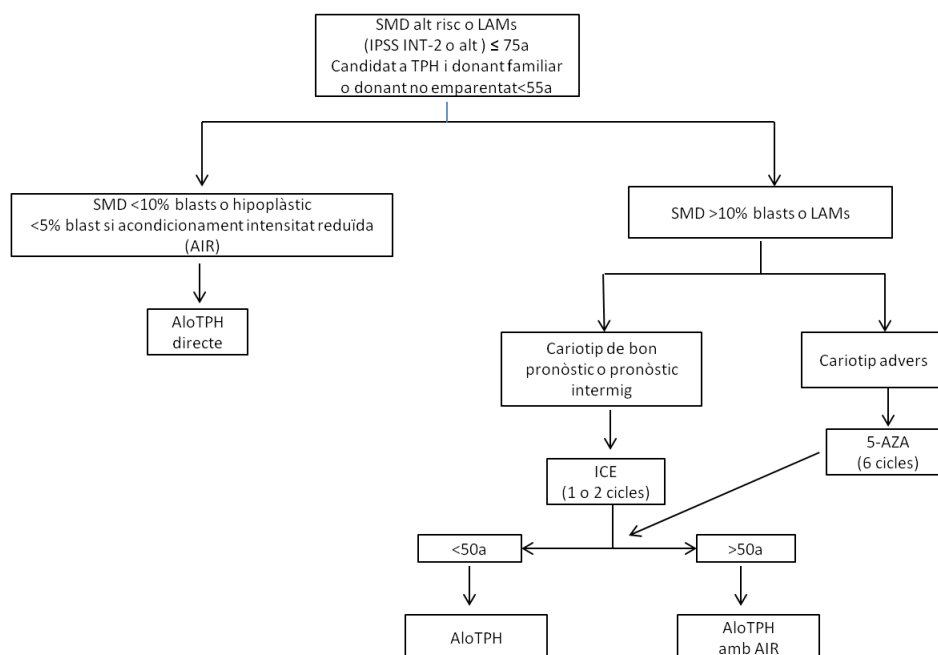
En aquesta tesi s'han fet estudis de mutacions somàtiques mitjançant tècniques de seqüenciació massiva i de metilació global de l'ADN en pacients inclosos en el protocol CETLAM SMD-09 titulat "TRATAMIENTO DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD) DE ALTO RIESGO Y LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA SECUNDARIA A SMD (LAMs) EN PACIENTES ≤ A 75 AÑOS. PROTOCOLO SMD-ALTO RIESGO ≤ 75A DEL GRUPO CETLAM (SMD-09)". Aquest és un estudi multicèntric i prospectiu, on els pacients es classifiquen segons edat i comorbiditats per a saber si són candidats o no a tractament intensiu. Els pacients candidats a tractament intensiu a la vegada es classifiquen segons el grup de risc citogenètic. En funció d'aquests paràmetres rebran diferents tractaments que inclouen azacitidina, quimioteràpia intensiva (idarrubicina, citarabina i etopòsid, ICE) i/o trasplantament de progenitors hematopoètics (Figura 13).

A)

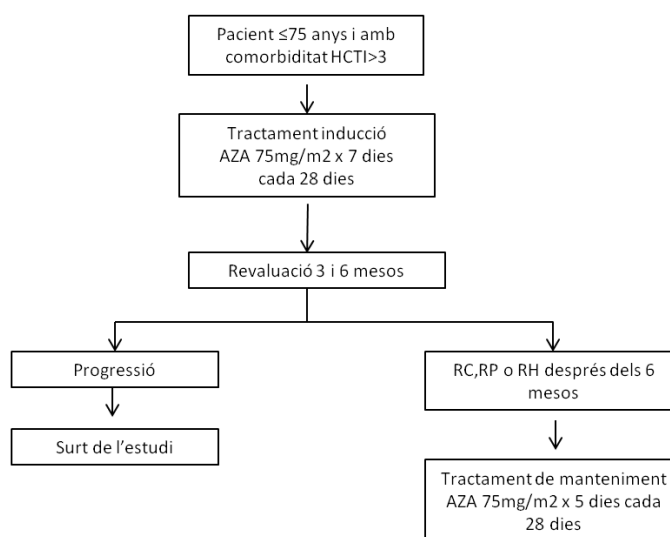




B)



C)



**Figura 13.** Esquemes de tractament dels pacients inclosos en el protocol CETLAM SMD-09. A) Pacients no candidats a trasplantament o sense donant compatible. B) Pacients candidats a trasplantament C) Pacients amb comorbiditats.

SMD: síndrome mielodisplàstica; LAM: leucèmia aguda mieloide; TPH: trasplantament hematopoètic; AZA: azacitidina; ICE: idarrubicina, citarabina i etopòsid; aloTPH: trasplantament al·logènic; mini-AloTPH: trasplantament; AIR: acondicionament intensitat reduïda; comorbiditat HCTI: índex de comorbiditat específic per al trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques; RC: resposta completa; RP: resposta parcial; RH: resposta hematològica.

## **1. Tractament**

### **1.1-Pacients amb citogenètica de bon pronòstic o pronòstic intermig**

Tractament d'inducció: ICE

- Idarrubicina: 10mg/m<sup>2</sup> endovenós els dies 1, 3 i 5.
- Citarabina: 100 mg/m<sup>2</sup> en infusió continua els dies 1-7.
- VP-16: 100 mg/m<sup>2</sup> els dies 1-3.

Mesures complementàries: inclouen hidratació abundant, alcalinització, alopurinol, antiemètics, suport hemoteràpic i profilaxis antiinfecciosa. S'administrarà G-CSF per via subcutània 7 dies després d'haver finalitzat la quimioteràpia (+14), fins a recuperar les xifres de neutròfils.

Valoració de la resposta: veure criteris de resposta més endavant. Si hi ha resposta completa (RC) s'inicia tractament de manteniment. Si hi ha resposta parcial (RP) després del primer cicle a ICE es realitza un segon cicle. Després del segon cicle d'ICE, independentment de la resposta, s'inicia el tractament de manteniment.

Tractament de manteniment: Azacitidina: 75 mg/m<sup>2</sup> x 5 dies cada 28 dies. Aquest tractament es manté fins a la progressió, un màxim de 24 mesos

### **1.2-Pacients amb citogenètica de mal pronòstic**

Tractament d'inducció: Azacitidina: 75 mg/m<sup>2</sup> x 7 dies cada 28 dies

Valoració de la resposta: Es valora la resposta als 3 i 6 mesos. En cas de progressió surt de l'estudi. Si presenta RC, RP o resposta hematològica (RH) després de 6 cicles, es passa a tractament de manteniment.

Tractament de manteniment: : Azacitidina: 75 mg/m<sup>2</sup> x 5 dies cada 28 dies. Aquest tractament es manté fins a la progressió, un màxim de 24 mesos. Es poden ajustar dosis si apareixen citopènies.

### **1.3-Pacients ≤50 anys i amb germà HLA idèntic**

#### **1.3.1- Pacients amb MO hipoplàstica o <10% blasts en MO**

Es realitzarà el trasplant directament sense tractament d'inducció previ.

### **1.3.2- Pacients amb > 10% blasts en MO**

S'estratificaran segons la citogenètica. En aquells pacients que tinguin citogenètica de bon pronòstic o pronòstic intermig s'administrarà com a tractament d'inducció ICE, mentre que en els que tinguin citogenètica de mal pronòstic s'administrarà AZA (veure apartats 1.1 i 1.2 de material i mètodes).

#### **Tractament d'acondicionament a l'al·lotrasplant:**

- Busulfà 4mg/Kg/d durant 4 dies (-8, -7, -6, -5) + ciclofosfamida 60mg/Kg/dia durant 2 dies (-4, -3)
- Ciclofosfamida 60mg/Kg/dia durant 2 dies (-6, -5) + irradiació corporal total (preferiblement 6 fraccions de 2Gy els dies -4, -3, -2)

### **1.4-Pacients >50 anys i amb germà histocompatible**

En els pacients amb SMD >10% blasts o LAMs es realitzarà un tractament d'inducció igual que l'anterior. En cas d'utilitzar un acondicionament d'intensitat reduïda (AIR) la xifra de blasts serà >5%, per a iniciar el tractament d'inducció.

#### **Tractament d'acondicionament**

- Fludarabina: 30 mg/m<sup>2</sup>/d intravenós (5 dies): dies -9 a -5.
- Busulfà: 10mg/Kg (1mg/Kg/6h) via oral dies -6 a -4.

### **1.5-Pacients <70 anys i amb comorbiditats**

**Tractament d'inducció:** Azacitidina: 75 mg/m<sup>2</sup> x 7 dies cada 28 dies

**Valoració de la resposta:** Es valora la resposta als 3 i 6 mesos. En cas de progressió surt de l'estudi. Si presenta RC, RP o RH després de 6 cicles, es passa a tractament de manteniment.

**Tractament de manteniment:** : Azacitidina: 75 mg/m<sup>2</sup> x 5 dies cada 28 dies. Aquest tractament es manté fins a la progressió, un màxim de 24 mesos. Es poden ajustar dosis si apareixen citopènies.

## 2. criteris de resposta

Els criteris de resposta utilitzats en aquesta tesi són els establerts per la International Working Group (IWG) al 2006 per a pacients amb SMD (133) (Taula 8 i 9). De manera breu, aquells pacients que aconseguen remissió completa, resposta completa a moll d'os (RCM), remissió parcial o milloria hematològica, es consideren en resposta. Les situacions restants es consideren com a no resposta.

En el protocol CETLAM SMD-09, la resposta a AZA es va valorar cada tres cicles de tractament (3, 6, 9, 12, etc..) i quan hi havia sospita de progressió, mentre que la resposta a ICE es valorava després del primer i segon cicle.

**Taula 8:** Criteris de resposta segons *International Working Group* (IWG) en referència a l'evolució de les SMD (133).

CATEGORIA	CRITERIS DE RESPOSTA (la resposta s'ha de mantenir un mínim de 4 setmanes)
<b>Remissió completa (RC)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- MO <math>\leq</math> 5% mieloblasts amb maduració normal de totes les línies cel·lulars.</li> <li>- Verificar l'existència de displàsia persistent</li> <li>- Sang perifèrica: Hb <math>\geq</math> 11g/dL, neutròfils <math>\geq</math> <math>1 \cdot 10^9</math>/L, plaquetes <math>\geq</math> <math>100 \cdot 10^9</math>/L i blasts 0%</li> </ul>
<b>Remissió parcial (RP)</b>	<p>Tots els criteris de RC si és anòmal abans del tractament excepte:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminució de blasts en MO <math>\sim</math>50% basal, però encara <math>&gt;</math> 5%.</li> <li>- Cel·lularitat i morfologia no rellevant.</li> </ul>
<b>Remissió completa medul·lar (RCM)</b>	<p>MO <math>\leq</math> 5% mieloblasts i disminució de <math>\geq</math> 50% de la xifra basal.            SP: si hi ha resposta hematològica registrar conjuntament</p>
<b>Malaltia estable (ME)</b>	Absència de RP sense evidències de progressió $>$ 8 setmanes
<b>Fracàs</b>	Mort durant el tractament o progressió de la malaltia caracteritzada per un empitjorament de les citopènies, augment del percentatge de blasts en MO o progressió a un subtipus FAB major de SMD que el del nivell basal.
<b>Recaiguda després de RC o RP</b>	<p>Al menys un dels següents:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Percentatge de blasts en MO igual que el basal</li> <li>- Descens de <math>\geq</math> 50% des de nivells de resposta/remissió màxima en granulòcits o plaquetes.</li> <li>- Reducció del valor Hb basal superior a 1.5g/dL o dependència transfusional.</li> </ul>

<b>Resposta citogenètica</b>	<p>Completa: desaparició de les anomalies cromosòmiques sense aparició de noves</p> <p>Parcial: Reducció d'almenys un 50% de les anomalies cromosòmiques.</p>
<b>Progressió de la malaltia</b>	<p>Per a pacients amb:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Menys de 5% de blasts: augment de la xifra de blasts <math>\geq</math> 50% sempre que es superi la xifra global del 5% de blasts.</li> <li>- Del 5-10% de blasts: augment de la xifra de blasts <math>\geq</math> 50% sempre que es superi la xifra global del 10% de blasts.</li> <li>- Del 10-20% de blasts: augment de la xifra de blasts <math>\geq</math> 50% sempre que es superi la xifra global del 20% de blasts.</li> <li>- Del 20-30% de blasts: augment de la xifra de blasts <math>\geq</math> 50% sempre que es superi la xifra global del 30% de blasts.</li> </ul> <p>Qualsevol dels següents:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Almenys un descens del 50% des de la remissió/resposta màxima en granulòcits i plaquetes.</li> <li>- Reducció del valor Hg superior a 2g/dL</li> <li>- dependència transfusional.</li> </ul>

MO: medul·la òssia, Hb: Hemoglobina, RC: remissió completa, RP: remissió parcial, RCM: remissió completa medul·lar, ME: malaltia estable.

**Taula 9:** Criteris de resposta segons *International Working Group (IWG)* en referència a la milloria hematològica (133).

MILLORIA HEMATOLÒGICA	CRITERIS DE RESPOSTA (la resposta s'ha de mantenir un mínim de 8 setmanes)
<b>Resposta eritroide</b> (xifra basal, <11g/dL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augment del valor Hb <math>\geq 1.5\text{g/dL}</math></li> <li>- Disminució rellevant de transfusió d'hematies en nombre absolut d'almenys 4 transfusions d'hematies / 8 setmanes comparat amb el nombre de transfusions pretractament en les 8 setmanes prèvies. Per a l'avaluació de la resposta només es comptabilitzaran les transfusions pretractament realitzades amb un valor de Hb <math>\leq 9\text{g/dL}</math>.</li> </ul>
<b>Resposta plaquetar</b> (pretractament, $<100 \times 10^9/\text{L}$ )	Augment absolut de $\geq 30 \times 10^9/\text{L}$ en pacients amb xifres inicials de plaquetes $> 20 \times 10^9/\text{L}$ Augments des de $<20 \times 10^9/\text{L}$ fins a $>20 \times 10^9/\text{L}$ i almenys del 100%
<b>Resposta neutrofílica</b> (pretractament, $<1 \times 10^9/\text{L}$ )	Almenys un increment del 100% i un augment absolut de $>0.5 \times 10^9/\text{L}$ .
<b>Progressió o recaiguda després de milloria hematològica</b>	Almenys un dels següents: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Com a mínim una disminució del 50% dels nivells de resposta màxima de granulòcits i plaquetes.</li> <li>- Reducció de Hb <math>\geq 1.5\text{g/dL}</math></li> <li>- Dependència de transfusions</li> </ul>

Valoració de la resposta al tractament d'inducció ICE: s'efectua el primer control d'aspirat medul·lar a les 3-5 setmanes d'inici (en funció del resultat dels recomptes cel·lulars a sang perifèrica), per a valorar el resultat del cicle d'inducció segons els criteris de resposta establerts per la *International Working Group (IWG)* al 2006 per a pacients amb SMD (133).

Valoració de la resposta al tractament d'inducció AZA: es valora la resposta als 3 i 6 mesos. En cas de progressió es retira de l'estudi. Si presenta RC, RP o RH després de 6 cicles es passa a tractament de manteniment.

### **Estudis citogenètics**

Els estudis de citogenètica convencionals de bandes G es realitzen a cada centre en mostres de moll d'os al diagnòstic seguint els procediments estàndards. Es van descriure els cariotips segons el Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenètica Humana (134).

### **3. PRIMER ESTUDI: Anàlisi mutacional d'un panell de 83 gens relacionats amb patologia mieloide**

#### **3.1 Pacients**

En aquest estudi es van analitzar retrospectivament un total de 39 pacients amb SMD d'alt risc (n=30) i LAM secundària (n=9) al diagnòstic, i després del tractament amb AZA (17 mostres d'onze pacients). Es van recollir mostres des d'octubre de 2009 a desembre de 2014.

Es va utilitzar la classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (2) per a fer el diagnòstic dels pacients en diferents hospitals del grup CETLAM. Tots els pacients van ser tractats uniformement amb AZA (75 mg/m<sup>2</sup> per dia durant 7 dies, 5-2-2, cada 4 setmanes) durant l'evolució de la seva malaltia i cinc pacients van ser trasplantats després del tractament amb AZA.

El Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Germans Trias i Pujol va aprovar l'estudi i tots els pacients van donar el consentiment informat, d'acord amb la Declaració de Hèlsinki.

#### **3.2 Processament de les mostres**

Es van recollir mostres de MO al diagnòstic de 39 pacients i en el moment de la resposta i/o progressió en 11 pacients, totes les mostres van ser enviades al laboratori de referència del protocol per a realitzar els anàlisi. En 21 dels 39 pacients es disposava de sang perifèrica i es van utilitzar els limfòcits T CD3 + (purificació mitjançant separació immunomagnètica (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanya) segons les recomanacions del fabricant) com a teixit control per discriminar les variacions de la línia germinal de mutacions somàtiques.

Processat de la mostra de moll d'os en EDTA:

- 1- Tot el volum de MO es posa en un tub de 20ml amb tampó de lisis eritrocitària (TLE) (3 vegades més TLE que MO, és a dir 9ml de TLE per 3ml de MO).
- 2- Es deixa 10 minuts rotant.
- 3- Es centrifuga el tub 10 min a 2000rpm. Si calgués es pot repetir el pas anterior fins aconseguir un precipitat cel·lular blanc lliure d'eritròcits.

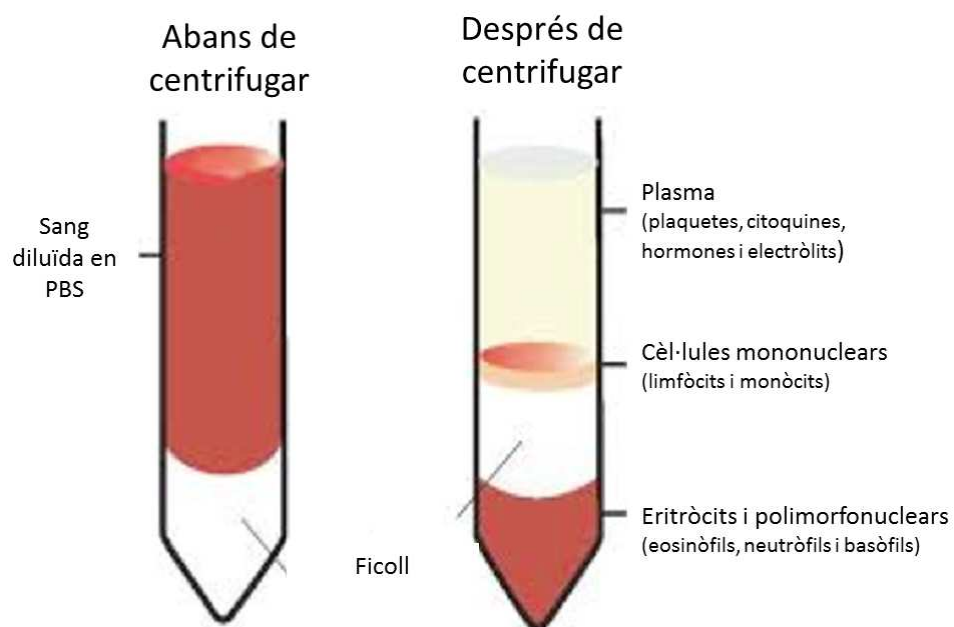


- 4- Es descarta el sobrenedant, es ressuspend amb TLE i es reparteix en diferents eppendorfs de 2mL (aproximadament  $1 \times 10^7$  de cèl·lules en cada eppendorf).
- 5- Es centrifuguen els eppendorfs 5 min a 2000rpm.
- 6- Es treu el sobrenedant i es ressuspenden els pellets amb 150µl de RA (solució estabilitzadora de l'ADN) i si hi ha prou material amb 1mL de TRIZOL (solució estabilitzadora de l'ARN).
- 7- Els leucòcits es guarden congelats a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a ser utilitzats.

Processat de la mostra de sang perifèrica per fer separació cel·lular de limfòcits CD3+:

- 1- Treure el PBS de la nevera per a que s'atemperi.
- 2- Mesurar el volum de la mostra i afegir la meitat del volum de PBS (dilució 2:1).
- 3- Agafar el volum de Ficoll que sigui la meitat del volum de la barreja sang + PBS i repartir-ho en 2 tubs de 10mL (la meitat del volum de Ficoll a cada tub). Introduir la meitat de la barreja sang + PBS amb cura a cada tub sense que es barregin les fases.
- 4- Centrifugar els tubs a 1800rpm durant 25 minuts (sense fre).
- 5- Retirar la capa de cèl·lules mononucleades amb una pipeta Pasteur i traspasar-la a un altre tub de 10mL (Figura 14).
- 6- Afegir com a mínim 3mL de PBS i centrifugar 1500rpm durant 5 minuts.
- 7- Retirar el sobrenedant.
- 8- Resuspendre el pellet de  $1 \times 10^7$  cèl·lules en 80µl de buffer BSA-EDTA.
- 9- Afegir 20µl d'anticòs per cada  $1 \times 10^7$  de cèl·lules i barrejar bé.
- 10- Incubar a  $4-8^{\circ}\text{C}$  durant 15 minuts.
- 11- Afegir 1-2mL de buffer BSA-EDTA per cada  $1 \times 10^7$  cèl·lules i centrifugar a 1200rpm durant 10 minuts.
- 12- Retirar el sobrenedant i afegir 1mL de buffer BSA-EDTA (25ml BSA en 1000ml PBS i 0.75gr EDTA).
- 13- Col·locar una columna de silicagel dins d'un imant i humidificar-la amb 3mL de buffer.
- 14- Preparar un tub de 10mL per recollir la fracció de cèl·lules sense anticòs.
- 15- Passar la mostra per la columna
- 16- Fer 3 rentats de 3mL de buffer cadascun (esperar que cada rentat hagi passat completament per la columna).
- 17- Retirar la columna de l'imat i col·locar-la en un altre tub de 10mL.
- 18- Afegir 5mL de buffer a la columna i prémer amb un èmbol enèrgicament per obtenir la fracció cel·lular marcada amb l'anticòs.

- 19- Traspasar les cèl·lules seleccionades amb anticòs a eppendorfs de 2mL.
- 20- Separar 150µl de cada fracció cel·lular per donar a la secció d'immunofenotipat per a que les analitzin mitjançant el citometre de fluxe i així conèixer la puresa de la nostra mostra.
- 21- Centrifugar els eppendorfs a 2000-3000rpm durant 5 minuts i resuspendre'ls en 150µl de RA.
- 22- Guardar els eppendorfs a -20°C.



**Figura 14.** Separació cel·lular pel mètode de Ficoll.

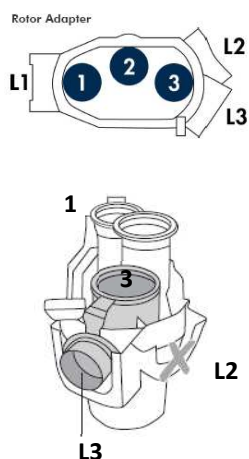
### 3.3 Extracció d'ADN

L'ADN genòmic es va extreure amb el kit QiaAmp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemanya) i es va quantificar mitjançant Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, CA, EUA).

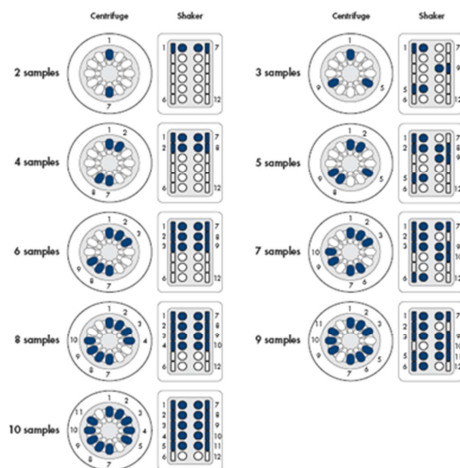
Protocol d'extracció d'ADN de pel·let cel·lular per mitjà del robot extractor QIAcube:

1. Engegar el QIAcube.
2. Obrir la porta.
3. Posar 150µL de RA en la mostra que serà el nostre control negatiu.
4. Homogeneïtzar les mostres amb la pipeta de 200µL, per evitar que saturi la columna.  
Si el material és molt viscos es recomana fer servir una xeringa i agulla d'insulina.
5. Posar als rotors adaptadors les columnes de silicagel i els eppendorf de 1,5mL (rotulats amb el número de mostra) seguint l'esquema següent:

Posició	Columna/Eppendorf	Posició tapa
1	Rneasy spin columna	L1
2	-	-
3	Eppendorf final 1.5mL	L3



6. Posar els rotors adaptadors ja plens a la centrifuga i els tubs de 2mL amb les mostres al *shaker* seguint el següent esquema:



7. Posar l'ependorf amb la proteasa a la posició A de la safata d'accessoris, situada al costat de les puntes.
8. Verificar que hi hagi puntes suficients (1000 i 200 $\mu$ L).
9. Col·locar les ampolles dels reactius necessaris sense els taps al suport de reactius en el següent ordre:
  1. Res o pot buit
  2. Buffer AL
  3. Etanol absolut
  4. Buffer AW1
  5. Buffer AW2
  6. Aigua lliure de RNases i Dnases



10. Tancar la porta
11. Posar en marxa el QIAcube, seleccionant el programa "QIAamp DNA blood".
12. Esperar a que el QIAcube acabi el seu procediment.
13. Es retiren els rotors adapters i les mostres un a un seguint l'esquema de dalt (mateix ordre en el qual s'han ficat dins la màquina) per confirmar que els números coincideixen.
14. Llegir concentracions

#### Protocol lectura PicoGreen:

El fluorocrom PicoGreen® és un marcador d'àcids nucleics que permet quantificar l'ADN de doble cadena (ADNdc), és altament sensible i permet mesurar concentracions des de 1ng/mL fins a 1000ng/mL. Totes les mostres d'ADN que s'han d'utilitzat per fer l'estudi del panell de NGS es van llegir mitjançant el sistema de PicoGreen® per assegurar que la quantitat d'ADN que es parteix per la generació de llibreries és de doble cadena.

### 3.4 Estudi de NGS mitjançant un panell dirigit de 83 gens relacionats amb patologia mieloide

L'anàlisi de mutacions es va realitzar mitjançant un panell customitzat i dirigit a detectar variants en 83 gens relacionats amb patologia mieloide (Taula 10). Les llibreries indexades es van preparar a partir d'1µg d'ADN genòmic de doble cadena fragmentat mitjançant Covaris, per mitjà del kit de preparació de llibreries Kapa (Kapa biosystems, MA, EUA). Es va fer l'enriquiment de les dianes seleccionades mitjançant la química de captura SeqCap EZ (Nimblegen, Roche, Suïssa) i es van fer pools de 8 mostres per llibreria per arribar a la cobertura desitjada (1000x). Aquestes llibreries capturades i multiplexades es van seqüenciar en un seqüenciador MiSeq d'Illumina després d'un protocol estàndard de lectura de 150pb. Les dades de seqüenciació es van analitzar mitjançant els programes comercials MiSeq Reporter i Variant Studio (Illumina, CA, EUA).

**Taula 10:** Llistat dels 83 gens i regions d'estudi inclosos en el panell mieloide.

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

A continuació veurem cada un d'aquests passos amb més detall.

### 3.4.1 Fragmentació de l'ADN mitjançant Covaris

Abans d'iniciar el protocol de generació de llibreries necessitem tenir l'ADN fragmentat en un rang de mida d'entre 180-220pb. En el nostre estudi vam fer fragmentació aleatòria mitjançant ultrasons utilitzant el disruptor Covaris S2.

Segons el fabricant dels reactius de la llibreria (Nimblegen, Roche) la quantitat òptima de partida per la generació de llibreries són 1000ng d'ADN (1µg), després d'haver fragmentant 53µl de mostra a una concentració de 20ng/µl. Això implica que estem treballant amb menys volum del que recomana Covaris pels seus tubs (130µl), el que comporta la generació de bombolles que poden dificultar la fragmentació homogènia de la mostra.

Com hem dit, diluïm l'ADN a una concentració final de 20ng/µl en 10mM Tris-HCl (pH 8.0 o 8.5) amb 0.1 mM EDTA, i transferim el volum a un microtub *AFA fiber*. Fem la fragmentació durant 270 segons (parant cada 90 segons per fer baixar les bombolles). Després correm 1µl de mostra en un bioanalyzer DNA 1000 xip (*high sensitivity DNA assay*) per confirmar que el perfil de fragmentació obtingut s'ajusta a les nostres necessitats, és dir, la majoria de fragments entre 180 i 220pb.

#### Protocol Covaris S2:

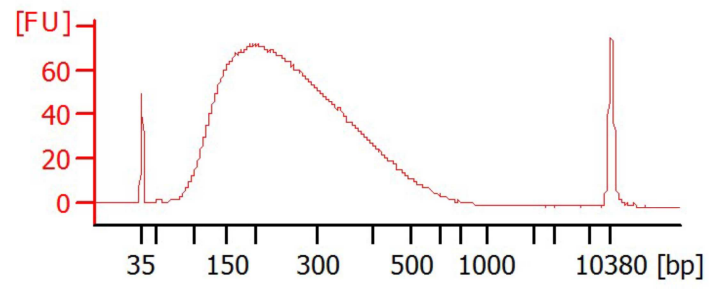
- 1- Dues o tres hores abans d'utilitzar el Covaris cal realitzar els passos 1a i 1b per permetre la refrigeració i desgassificació de l'aigua:
  - a. Omplir el circulador de refrigeració LTC1 Grant amb aigua osmotitzada i posar-lo en marxa (temperatura 2°C).
  - b. Encendre el Covaris i posar aigua fins al nivell 15 de FILL. Encendre l'ordinador i el software Covaris SonoLite. Desconnectar l'opció DEGASS fins a 30 minuts abans de començar a utilitzar-lo.
- 2- Abans de començar la fragmentació confirmar que el software marca que l'aparell està entre 5-6°C.
- 3- Posar el tub *millitube AFA Fiber* en el holder millitube i col·locar-lo en el Covaris. Comprovar que el nivell de l'aigua de RUN cobreix tot el tub.
- 4- Les condicions per a obtenir el grau de fragmentació que necessitàvem podia variar d'una mostra a una altra, però de manera global fèiem 270 segons de fragmentació parant cada 90 segons per a homogeneïtzar la mostra i evitar la formació de bombolles.
  - a. Duty cycle:5

- b. Intensity: 5
  - c. Cycles/burst: 200
  - d. Duration: 90s
  - e. Mode: Freq sweeping
  - f. Turn degas pump off
  - g. RUN
- 5- Apagar el covaris i l'ordinador.
  - 6- Apagar el LTC1 Grant.
  - 7- Buidar d'aigua el circulador de refrigeració LTC1 Grant i buidar i assecar la cambra de metacrilat del Covaris.

Protocol *Bionalyzer Agilent High sensitivity DNA kit*:

- 1- Atemptar els reactius del Bioanalyzer 30 minuts abans de fer-los servir.
- 2- Preparar la Mix entre el reactiu *high sensitivity DNA dye concentrate* (15µl) i el *high sensitivity DNA gel matrix vial* (mix gel-dye). Centrifugar la barreja durant 10 minuts i protegir-ho de la llum. Emmagatzemar a 4°C. Aquesta mix és estable 6 setmanes a nevera.
- 3- Carregar 9µl de la mix gel-dye a la posició marcada amb una "C" del xip. Tancar la *priming station* i apretar l'èmbol fins al final. Esperar 60 segons i tornar a pujar l'èmbol fins a 1mL.
- 4- Obrir la *priming station* i carregar els altres 9µl en els altres pous marcats amb una **G**.
- 5- Carregar 5µl de *marker* en tots els pous on hi ha mostra o el *ladder*.
- 6- Pipeteja 1µl de *High sensitivity DNA ladder* en el pou marcat amb una escala. Pipeteja 1µl de mostra en els altres 11 pous per a mostra.
- 7- Vortejar el xip durant un minut.
- 8- Corre el xip en l'aparell Agilent 2100 Bioanalyzer.

Un cop confirmem que les mostres presenten el patró de fragmentació desitjat (Figura 15) podem procedir a la generació de llibreries. Si la mostra no s'ha fragmentat suficientment bé, podem tornar-la a fragmentar uns segons més, per intentar no perdre el material.



**Figura 15.** Imatge d'una mostra post-fragmentació. La mida adequada per prosseguir amb la tècnica és de 180-220pb.

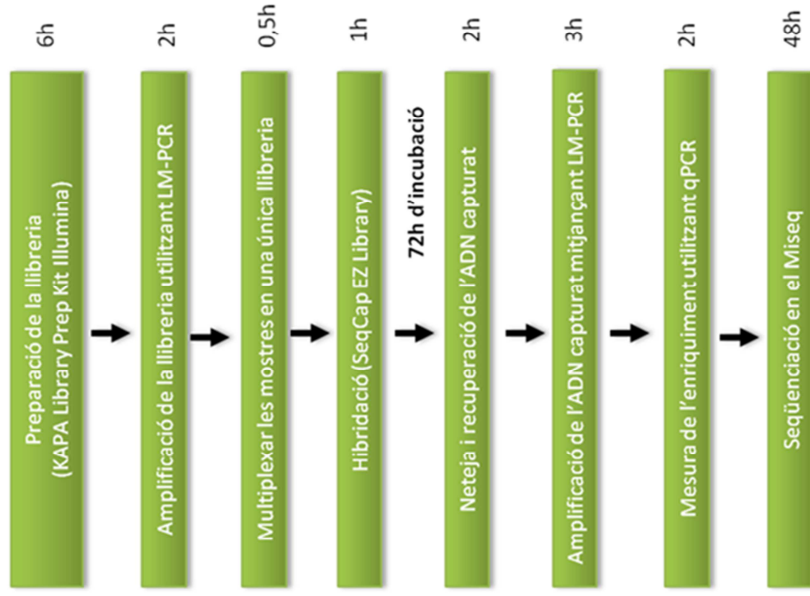


### 3.4.2 Generació de les llibreries

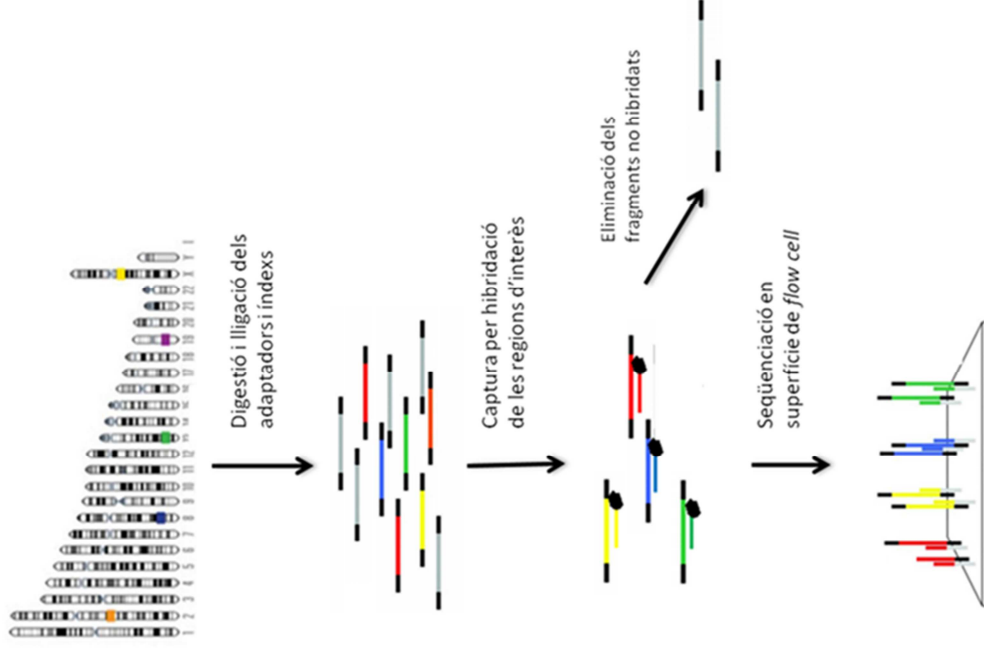
Per generar les llibreries hem utilitzat els reactius SeqCap EZ Library SR (Nimblegen, Roche), segons el protocol del fabricant (135). A mode de resum, els passos són els següents (Figura 16):

- a. Preparació de la llibreria
  - I. Reparació dels extrems: reparar els extrems dels fragments d'ADN que hem obtingut amb el Covaris.
  - II. Afegir les cues de poliA: en els extrems reparats els hi unirem unes cues de poliA que seran indispensables per la posterior unió dels adaptadors.
  - III. Lligació dels adaptadors: cada mostra s'unirà a un adaptador específic que ens permetrà després identificar de quina mostra prové cada seqüència.
  - IV. Selecció dual per mides: eliminarem els fragments més grans i els més petits mitjançant les boles d'Ampure.
- b. LM-PCR pre-captura: amplificarem les mostres utilitzant una PCR per preparar-les per la hibridació.
- c. Neteja post-PCR: a partir de les boles de purificació eliminarem tot allò que no hagi amplificat, o reactius que hagin sobrat. Després comprovarem la puresa i la concentració mitjançant les lectures del nanodrop i les imatges del Bioanalyzer.
- d. Hibridació de les mostres amb les sondes de captura: es fa un pool a concentracions iguals de cada llibreria. La hibridació es dona en un termociclador a 47°C durant 64-72 hores. El que es fa en aquest pas és enriquir la mostra amb les regions d'interès.
- e. Neteja post-captura: a partir de buffers de neteja i boles de captura recuperarem els fragments d'ADN d'interès, és a dir, aquelles regions que teníem definides en el nostre panell i del qual teníem sondes generades.
- f. LM-PCR post-captura: amplifiquem les regions d'interès amb una segona PCR post-hibridació de les llibreries amb les sondes específiques.
- g. Neteja post-PCR utilitzant boles de purificació: mitjançant boles de purificació eliminarem tot allò que no siguin seqüències d'interès de la nostra llibreria. Després comprovarem la puresa i la concentració mitjançant les lectures del nanodrop i les imatges del Bioanalyzer.
- h. PCR quantitativa de les mostres amplificades per LM-PCR: utilitzant quatre gens seleccionats farem una PCR de la llibreria pre-captura i de la llibreria post-captura. Si el procés ha anat bé, haurem de veure que les dianes s'han enriquit al voltant de 100 vegades més entre les dues condicions.

A)



B)

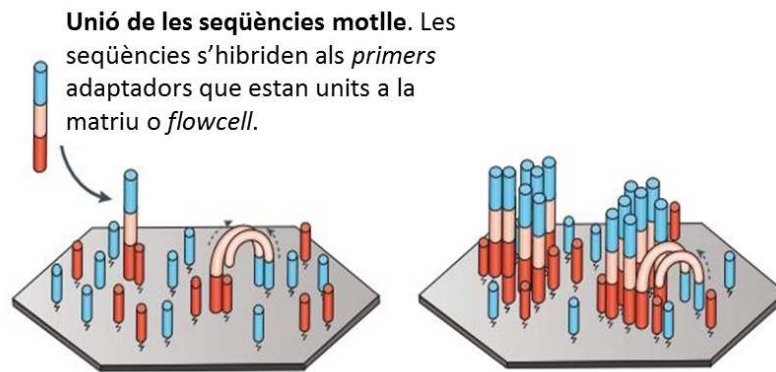


**Figura 16.** Generació de llibreries per la química de captura SeqCap EZ. A) Esquema de treball i temps aproximat de realització. B) Esquema de generació de llibreries mitjançant captura i posterior seqüenciació.

### 3.4.3 Bioquímica de la seqüenciació en el MiSeq

El mètode de seqüenciació d'Illumina és un mètode de seqüenciació per síntesi (*sequencing by synthesis*) (136). Dins l'equip es duen a terme dos processos: l'amplificació per pont (*bridge amplification*) i la seqüenciació mitjançant terminació cíclica reversible (*cyclic reversible termination*, CRT) (137). En l'amplificació per pont els fragments de les llibreries s'uneixen, a través dels adaptadors i per complementarietat, a una sèrie d'oligonucleòtids (*primers*) que es troben sobre una superfície plana, anomenada *flowcell*, i que segueix un patró. Mitjançant PCR es sintetitza *in situ* una segona cadena des del *primer* immobilitzat, mentre que la primera es descarta. L'extrem lliure d'aquest nou fragment pot interaccionar amb un altre *primer* de la superfície, formant així una estructura de pont. A través de la formació d'aquestes estructures tipus pont els fragments d'ADN de la llibreria s'amplifiquen, formant una sèrie de clústers. Cada clúster és un conjunt de fragments localitzat sobre un punt concret de la superfície (Figura 17A). A continuació té lloc la seqüenciació mitjançant CRT, on aquests fragments serveixen de motlle per a una seqüenciació directa basada en la utilització de nucleòtids terminadors reversibles. Aquests nucleòtids estan marcats amb un fluorocrom específic i diferent per a cada base. Cada nucleòtid que s'incorpora a la cadena d'ADN que s'està sintetitzant està bloquejat per un grup 3'-O-acidmetil, que impedeix la incorporació de nucleòtids addicionals. D'aquesta manera, els fragments incorporen un únic nucleòtid marcat en cada un dels cicles, que es visualitza mitjançant microscòpia de fluorescència de reflexió interna total utilitzant dos o quatre canals làser. Seguidament, el fluorocrom s'escindeix i el 3'OH es regenera com un agent reductor. Després d'això, el cicle d'addició, elongació i escissió de nucleòtids comença de nou (Figura 17B). Després d'aquests dos processos, el seqüenciador generarà les lectures o seqüències a partir de les fluorescències detectades.

A)

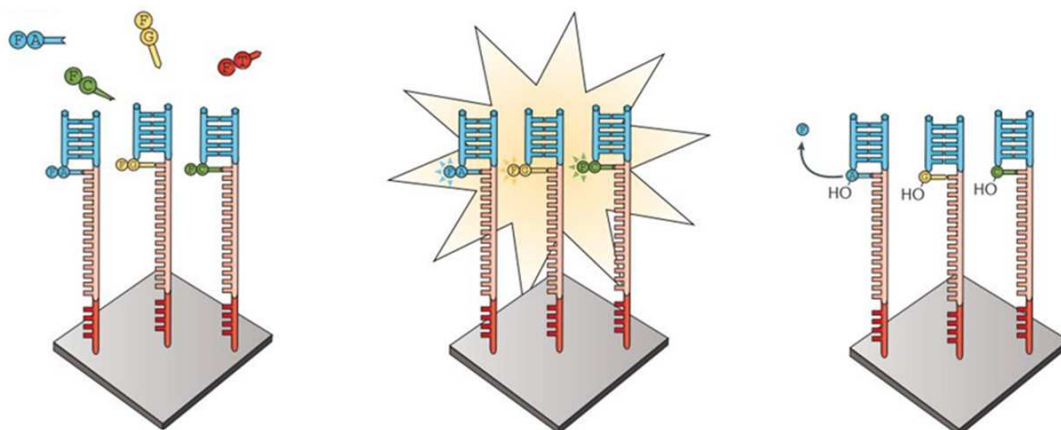


**Unió de les seqüències motlle.** Les seqüències s'hibriden als primers adaptadors que estan units a la matriu o *flowcell*.

**Amplificació per pont.** Els extrems distals de la seqüència hibridada interactua amb els primers pròxims i es durà a terme l'amplificació.

**Generació de clústers.** Després de diverses rondes d'amplificació, es generen entre 100-200 milions de clústers clonals.

B)



**Addició de nucleòtids** marcats amb fluorescència.

**Adquisició de la imatge.**

**Escissió del fluorocrom** amb regeneració del grup hidroxil (-OH).

**Figura 17.** Mètode de seqüenciació d'Illumina. A) Amplificació per pont i generació de clústers sobre una superfície sòlida. B) Seqüenciació cíclica reversible sobre la superfície: addició del nucleòtid marcat amb fluorescència, adquisició de la imatge i escissió del fluorocrom amb regeneració del grup hidroxil (-OH). Imatges modificades de l'article Goodwin S et al, Nature Reviews Genetics, 2016 (137).

### 3.4.4 Interpretació dels resultats

La metodologia de la seqüenciació massiva genera un gran volum de dades, per a la qual cosa es necessita un suport bioinformàtic i una gran potència a nivell computacional. L'anàlisi de les dades de NGS es divideixen en quatre nivells:

- I. Anàlisi primari o *base calling*: consisteix en convertir les senyals captades en el seqüenciador a bases nucleotídiques (A, C, T i G) i en generar les corresponents seqüències o lectures.
- II. Anàlisi secundari o alineament: consisteix en alinear o mapejar aquestes seqüències amb un genoma de referència.
- III. Anàlisi terciari o *variant calling*: consisteix en identificar les diferències (variants) entre les seqüències generades de l'ADN a estudi, i el genoma de referència.
- IV. L'últim pas correspon a l'anotat i filtrat de variants, que consisteix en anotar tota la informació existent de cada una de les variants (efecte en la proteïna, patogenicitat, freqüència en la població, rellevància clínica, etc..) per a després poder filtrar aquestes variants en funció de la seva rellevància en la malaltia d'estudi.

En el nostre estudi, les dades de seqüenciació van ser analitzades mitjançant els softwares comercials MiSeq reporter i Variant Studio (Illumina, CA, EUA). I en l'anotat i filtrat de variants vam eliminar els errors de seqüenciació i mapeig, es van descartar les variants localitzades en regions intròniques, amb baixa cobertura (<20 lectures de la variant) o amb una freqüència al·lèlica de la variant (VAF) <10% per a les variants d'un únic nucleòtid (SNVs) i <15% per a insercions i delecions (indels), ja que així ens asseguràvem que no eren artefactes tècnics. També es van excloure els polimorfismes (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) descrits a les bases de dades poblacionals (ExAC, 1000 genomes, dbSNPs, etc..). Les VAFs es van calcular com el nombre de lectures de la variant dividit pel nombre total de lectures per aquella posició. En aquells pacients on disposàvem de teixit control (cèl·lules CD3+), la informació obtinguda després d'estudiar els 83 gens es va utilitzar per a confirmar o completar l'estratègia de filtratge dels SNPs. La resta de variants es van considerar com a candidates a ser mutacions somàtiques, i finalment es van etiquetar com oncogèniques, a partir de la informació derivada de la literatura i/o de la informació donada predictors *in-silico*.

### **3.4.5 Anàlisi estadístic**

Les característiques bàsiques demogràfiques i clíniques van ser analitzades descriptivament calculant freqüència i percentatge per les variables categòriques i la mediana i rang per les variables contínues. Les comparacions de variables categòriques entre subconjunts de pacients es van comparar amb  $\chi^2$  o la prova exacta de Fisher, quan corresponia, mentre que el test de la mediana es va utilitzar per comparar variables contínues. La supervivència global (SG) es va definir com el temps des del diagnòstic fins al darrer seguiment o la mort del pacient per qualsevol causa, considerant la mort com a event principal. La supervivència lliure de progressió (SLP) es va definir com el temps des del diagnòstic fins a la progressió, recaiguda o la mort relacionada amb la malaltia, o fins últim control, altrament. Les estimacions i les corbes de supervivència es van realitzar mitjançant el mètode de Kaplan-Meier i el log-rank test va ser utilitzat per a comparacions entre grups. L'anàlisi multivariant per SG i SLP es va realitzar mitjançant el model de riscos proporcionals de Cox, considerant Wald Backward com a mètode de selecció. Es va considerar significatiu una p-valor<0.05. Per a totes les anàlisis es va utilitzar el paquet estadístic SPSS, versió 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## **4. SEGON ESTUDI: metilació global de l'ADN**

### **4.1 Pacients**

S'ha fet l'estudi de metilació de 75 pacients amb SMD d'alt risc i LAMs amb displàsia multilínia al moment del diagnòstic i a diversos moments post-tractament. Alhora es van analitzar 10 mostres de donants emparentats de moll d'os, com a controls de perfils de metilació estàndard.

Els criteris de resposta utilitzats són els establerts per la *International Working Group (IWG)* al 2006 per a pacients amb SMD (133). De manera breu, aquells pacients que aconseguen remissió completa, resposta completa a moll d'os, remissió parcial o milloria hematològica, van ser considerats que estaven en resposta. Les situacions restants es van considerar com a no resposta.

Els estudis citogenètics convencionals de bandes G es van realitzar en mostres de moll d'os al diagnòstic seguint els procediments estàndards. Es van descriure els cariotips segons el Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenètica Humana (134).

### **4.2 Processament de les mostres**

Es van recollir mostres de MO al diagnòstic de 75 pacients i en diversos moments al llarg del tractament, totes les mostres van ser enviades al nostre laboratori (laboratori de referència del protocol CETLAM SMD-09) per a realitzar els anàlisis de metilació. Alhora es van utilitzar cèl·lules CD34+ procedents de 10 donants emparentats de medul·la òssia com a controls sans. Pel processat de la mostra de moll d'os en EDTA veure apartat 3.2 de material i mètodes.

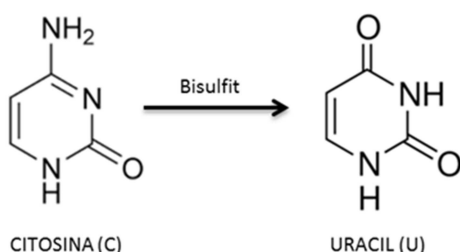
### **4.3 Extracció d'ADN**

Es va extreure l'ADN de 156 mostres de moll d'os de 75 pacients, i de 10 mostres de donants sans mitjançant el QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Werfen) (veure protocol en apartat 3.3 de material i mètodes).

#### 4.4 Conversió amb bisulfit

El mètode de conversió per bisulfit es va desenvolupar als anys 90 i va suposar un gran avenç en l'anàlisi de la metilació de l'ADN. Aquest mètode consisteix en tractar l'ADN amb bisulfit de sodi, que actua convertint les citosines no metilades de l'ADN en uracils (mitjançant un primer pas de desaminació i un posterior de dessulfonació). Això permet distingir entre l'ADN metilat i no metilat mitjançant la posterior amplificació de l'ADN tractat per PCR i els anàlisis dels productes de PCR. Durant aquesta amplificació, les citosines no metilades (convertides a uracil) amplificaran com a timines, mentre que les citosines metilades (no convertides) amplificaran com citosines (Figura 18).

A)



B)

DNA original amb C metilades	C	Cmet	G	T	C met	G	A	T	Cmet	G	C	T	C	A
DNA post conversió amb bisulfit	U	Cmet	G	T	Cmet	G	A	T	Cmet	G	U	T	U	A
Seqüència post conversió	T	C	G	T	C	G	A	T	C	G	T	T	T	A

**Figura 18.** Mètode de conversió per bisulfit. A) Conversió de la citosina en uracil per tractament amb bisulfit. B) Mètode de PCR per a distingir entre les citosines prèviament metilades i les no metilades.

En aquest estudi es va modificar 1 µg d'ADN amb bisulfit de sodi mitjançant el kit de metilació de l'ADN EZ (Zymo Research, Ecogen) segons les instruccions del fabricant (138). Abans de començar el protocol de conversió per bisulfit cal preparar uns reactius:



### Preparació del reactiu de conversió CT:

El reactiu de conversió CT que forma part del kit de metilació de l'ADN (Zymo Research, Ecogen) és una mix sòlida que ha de ser preparada abans del primer us. Un cop preparat està dissenyat per a diversos tractaments independents:

- Afegir 750µl d'aigua i 210µl del buffer de dilució *M-Dilution Buffer* al tub de reactiu de conversió CT
- Barrejar la mix a temperatura ambient amb vòrtexs freqüents o sacsejant cada 10 minuts.

Aquest reactiu és sensible a la llum, per tant un cop preparat s'ha de minimitzar la seva exposició a la llum. Per a obtenir uns millors resultats, el reactiu de conversió CT s'hauria d'utilitzar el més ràpidament possible després de la seva preparació. Si no es pot utilitzar immediatament, el reactiu s'hauria de conservar una nit a temperatura ambient, una setmana a 4°C o fins a un mes a -20°C. El reactiu de conversió CT s'hauria d'atemperar a 37°C i vortejar abans de tornar a ser utilitzat.

### Preparació del reactiu *M-Wash Buffer*:

Afegir 96mL d'etanol absolut als 24mL de *M-Wash Buffer* concentrat (D5002) abans d'utilitzar per primera vegada.

### Protocol

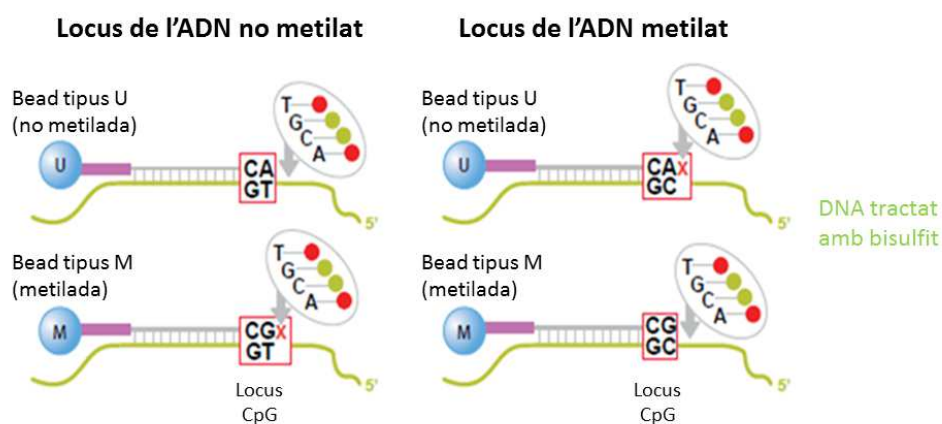
- 1- Afegir 5µl de *M-Dilution Buffer* a la mostra d'ADN i ajustar el volum total a 50µl amb aigua. Barrejar la mostra per pipeteig. Exemple: per 14µl d'ADN s'afegeix 5µl de *M-Dilution Buffer* i 31µl d'aigua.
- 2- Incubar la mostra a 42°C durant 20 minuts.
- 3- Després de la incubació afegir 100µl de la preparació del reactiu de conversió CT a cada mostra i barrejar.
- 4- Incubar les mostres en termociclador:
  - a. (95°C durant 30 segons; 50°C durant 60 minuts) x 16 cicles
  - b. Mantenir a 4°C (mínim 10 minuts)
- 5- Afegir 400µl de *M-Binding Buffer* a la mostra (volum=150µl) i barrejar per inversió.
- 6- Posar tota la mostra a la columna *Zymo-Spin IC Column* que està dins un tub col·lector. Centrifugar a màxima velocitat ( $\geq 10000g$ ) durant 1 minut. Llençar el filtrat.

- 7- Afegir 200µl de *M-Wah Buffer* a la columna. Centrifugar a màxima velocitat ( $\geq 10000g$ ) durant 1 minut. Llençar el filtrat.
- 8- Afegir 200µl de *M-Desulphonation Buffer* a la columna i mantenir a T<sup>a</sup> ambient durant 15-20 minuts.
- 9- Després de la incubació centrifugar a màxima velocitat ( $\geq 10000g$ ) durant 1 minut. Llençar el filtrat.
- 10- Afegir 200µl de *M-Wah Buffer* a la columna. Centrifugar a màxima velocitat ( $\geq 10000g$ ) durant 1 minut. Llençar el filtrat.
- 11- Afegir uns altres 200µl de *M-Wah Buffer* a la columna. Centrifugar a màxima velocitat ( $\geq 10000g$ ) durant 1 minut. Llençar el filtrat.
- 12- Tornar a centrifugar 1 minut sense cap reactiu més.
- 13- Posar la columna a un tub eppendorf de 1.5mL. Afegir 30µl de *M-Dilution Buffer* directament a la matriu de la columna. Centrifugar 1 minut a màxima velocitat per a que baixi l'ADN.

L'ADN està preparat per l'anàlisi o també pot ser guardat a -20°C per a un futur estudi. Si es vol guardar durant molt de temps, es recomana fer-ho a -70°C. Es recomana utilitzar entre 1-4µl de l'ADN per a cada PCR, tot i així es poden utilitzar fins a 10µL si és necessari.

## 4.5 Arrays de metilació

L'ADN convertit amb bisulfit es processa i s'hibrida a *Infinium Human Methylation 450K BeadChip* d'Illumina, segons les recomanacions del fabricant (139). La matriu o *array* avalua l'estat de metilació de 485.764 citosines distribuïdes per tot el genoma, que corresponen a dinucleòtids CpG (99,3%) i dianes CNG (0,7%) (140). Segons els seus transcrits associats, 361.766 CpGs (74,4%) corresponen a "classic coding messenger RNA genes", 4.168 (0,85%) estan vinculats a ARN no codificants (microRNAs i ARN llargs que no codifiquen) i a 119.830 (24,6%) llocs no hi ha transcripcions anotades associades a la ubicació descrita de CpG (140). El *microarray* de Illumina utilitza, per a cada CpG d'interès, dos tipus diferents de boles (*beads*) que contenen oligonucleòtids complementaris al lloc CpG no metilat (*bead* tipus U) i al metilat (*bead* tipus M). Aquestes *beads* estan marcades diferencialment amb fluorescència. L'ADN genòmic prèviament tractat amb bisulfit s'hibrida a l'*array* amb totes aquestes *beads* que contenen les sondes dissenyades per a interrogar les diferents CpGs d'interès. Després de la hibridació hi ha una amplificació mitjançant PCR d'aquells productes on hi ha total complementarietat entre l'ADN convertit i la sonda. És a dir, si l'ADN està metilat només hi haurà amplificació quan s'uneixi la *bead* tipus M, i si no està metilat només hi haurà amplificació quan s'uneixi la *bead* tipus U (Figura 19). Aquests productes de PCR quedaran immobilitzats en les *beads* corresponents, de forma que la senyal de fluorescència es pot mesurar i la ratio entre els dos tipus de sondes per a cada locus (CpG individual) és un indicador del nivell de metilació. L'anàlisi d'aquesta enorme quantitat de dades és molt complex, tot i que s'ha anat millorant al llarg del temps (141–143).



**Figura 19.** Fonament del *microarray* de metilació de Illumina.

Protocol Infinium HD Methylation array:

- Generar una placa amb les mostres convertides amb bisulfit. Les mostres es desnaturalitzaran i neutralitzaran per preparar-les per l'amplificació.
- Incubació de l'ADN: l'ADN desnaturalitzat és isotèrmicament amplificat durant la incubació que dura tota la nit. L'amplificació de tot el genoma augmenta uniformement la quantitat de la mostra d'ADN sense introduir gran quantitat de biaix d'amplificació.
- Fragmentació de l'ADN: el producte amplificat es fragmenta per un procés enzimàtic controlat que no requereix electroforesi en gel. El procés utilitza la fragmentació del punt final per evitar la sobrefragmentació de la mostra.
- Precipitació de l'ADN: després de la precipitació de l'ADN amb isopropanol, l'ADN fragmentat es recull per centrifugació a 4°C.
- Resuspensió de l'ADN: l'ADN precipitat es resuspèn en *buffer* d'hibridació.
- Hibridar l'ADN en els *BeadChip*: Es dispensa la mostra d'ADN fragmentada i resuspesa en les *BeadChips*. Es carrega un màxim de 12 mostres a cada *BeadChip*, que les manté separades mitjançant el *IntelliHyb seal*. La *BeadChip* s'incuba tota la nit en el forn d'hibridació d'Illumina. L'ADN fragmentat i amplificat s'anella al locus específic durant la hibridació (unions covalents amb les *beads*). A cada locus CpG es corresponen dos tipus de *beads*: una *bead* correspon a l'estat metilat (C) i un altre a l'estat no metilat (T) del lloc CpG.
- Neteja de la *BeadChip*: l'ADN que no ha hibridat s'elimina per mitjà de rentats.
- Extensió de base única i color de la *BeadChip*: el xip experimenta una extensió i una tinció a les cambres de flux capil·lar. Una extensió de base única dels oligos de la *Beadchip*, utilitzant l'ADN capturat com a motlle, incorpora sondes detectables a la *BeadChip* i determina el nivell de metilació dels lloc CpG que s'estan estudiant.
- Imatge de la *BeadChip*: Els sistemes d'Illumina iScan o HiScan exploren la *BeadChip* utilitzant un làser que excita el fluoròfor del producte d'extensió d'una sola base en les *beads*. L'escàner registra imatges d'alta resolució de la llum emesa pels fluoròfors.

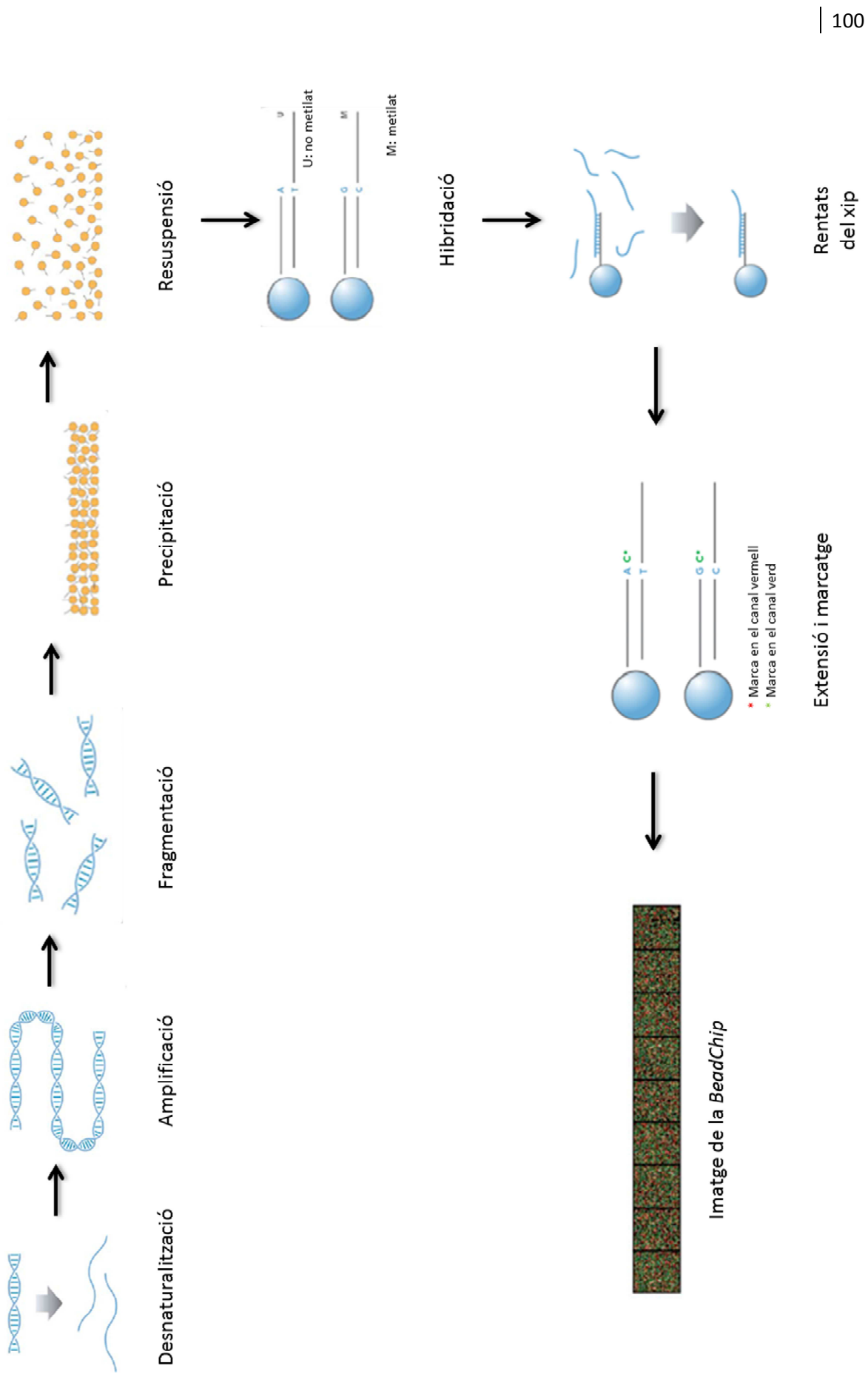


Figura 20. Esquema del protocol *Infinium HD Methylation array*.

## **4.6 Anàlisi dels arrays de metilació**

Com he comentat, els senyals de fluorescència generats per citosines no metilades i metilades es transformen en una relació de valor beta (valor  $\beta$ ) que va des de 0 (lloc completament no metilat) a 1 (lloc completament metilat). Els fitxers IDAT en brut dels experiments Infinium 450K es van importar a RnBeads per a l'anàlisi de metilació de l'ADN, inclòs el control de qualitat, el pre-processament de dades i la normalització (144). Els valors  $\beta$  de metilació es van normalitzar mitjançant el mètode de normalització BMIQ (145). Es va utilitzar RnBead per realitzar l'anàlisi de components principals no supervisats (PCA) i per explorar associacions entre diferents característiques (144). L'anàlisi de metilació diferencial es va realitzar a nivell de lloc i de regió segons els grups especificats. Els p-valors al nivell del lloc es van calcular mitjançant el mètode limma (146). Es va calcular la metilació diferencial a nivell del lloc basant-se en una varietat de mètriques: a) es compara la diferència entre els nivells mitjans de metilació dels dos grups; b) el quocient en metilació mitjana; c) una prova estadística (limma o test t) que avalui si els valors de metilació dels dos grups tenen l'origen en distribucions diferents. Addicionalment, a cada lloc se li va assignar un rang en funció de cadascun d'aquests 3 criteris. Un rang combinat (*combined rank*) es calcula com el màxim (és a dir, el pitjor) entre les tres files. Com més petit sigui el rang combinat d'un lloc, més evidència té de metilació diferencial. Es va realitzar una anàlisi de metilació diferencial per identificar sondes hipermetilades i hipometilades entre els grups comparats i es va realitzar segons el rànquing de combinació. Es va analitzar la classificació combinada entre els 200 millors llocs de classificació. Les dades de metilació de l'ADN es van avaluar i es van tractar estadísticament com a unitats CpG (que consisteixen en un o més dinucleòtids CpG). El tractament de la regió com una unitat en l'anàlisi de metilació diferencial podria identificar regions amb canvis de metilació consistents.

## **9. RESULTATS**

## **1- PRIMER ESTUDI: Anàlisi mutacional d'un panell de 83 gens associats a patologia mieloide en pacients tractats segons el protocol CETLAM SMD-09.**

### **1.1- Característiques dels pacients i tractament administrat**

S'han analitzat un total de 39 pacients amb SMD d'alt risc i LAMs. Les principals característiques clíniques i biològiques estan resumides a la Taula 11. L'edat mitja al diagnòstic era de 71 anys (rang entre 55-83 anys) i a la nostra sèrie hi havia 29 (74%) homes i 10 (26%) dones. Segons la classificació de l'OMS 2008 els casos es van diagnosticar d'anèmia refractària amb sideroblasts en anell (ARSA)(n=1; 2.5%), citopènia refractària amb displàsia multilínia i sideroblasts en anell (CRDM-SA)(n=1; 2.5%), citopènia refractària amb displàsia multilínia (CRDM) (n=5, 13%), anèmia refractària amb excés de blasts-1 (AREB-1) (n=9, 23%), anèmia refractària amb excés de blasts-2 (AREB-2) (n=14; 36%) i LAMs (n=9; 23%). L'estratificació de risc dels pacients es va realitzar mitjançant el sistema de puntuació pronòstica internacional revisat (IPSS-R) i tots els pacients pertanyien al grup de risc intermig, alt o molt alt risc (Taula 11). A nivell de tractament, tots els pacients van rebre AZA i el nombre mig de cicles va ser de 6 (rang 1-36).



**Taula 11.** Principals característiques clíniques i hematològiques dels pacients amb SMD d'alt risc i LAMs al diagnòstic (n=39).

Variable	Mediana (rang)	N=39 (%)
<b>Edat, anys</b>	71 (55-83)	
<70a		18 (46)
≥70a		21 (54)
<b>Gènere</b>		
Masculí		29 (74)
Femení		10 (26)
<b>Classificació OMS 2008</b>		
ARSA		1 (2.5)
CRDM-SA		1 (2.5)
CRDM		5 (13)
AREB-1		9 (23)
AREB-2		14 (36)
LAMs		9 (23)
<b>Nivells d'hemoglobina, g/dL</b>	9.1 (6.5-12.5)	
<10g/dL		29 (74)
≥10g/dL		10 (26)
<b>Recòmpte de leucòcits, x10<sup>9</sup>/L</b>	2.9 (1.1-50.2)	
<4 x10 <sup>9</sup> /L		29 (74)
>4 x10 <sup>9</sup> /L i <11 x10 <sup>9</sup> /L		8 (21)
≥11 x10 <sup>9</sup> /L		2 (5)
<b>Recòmpte de plaquetes, x10<sup>9</sup>/L</b>	63 (13-416)	
<100 x10 <sup>9</sup> /L		28 (72)
≥100 x10 <sup>9</sup> /L		11 (28)
<b>Recòmpte de neutròfils, x10<sup>9</sup>/L</b>	1.3 (0.09-13.55)	
<0.8 x10 <sup>9</sup> /L		13/36 (36)
≥0.8 x10 <sup>9</sup> /L		23/36 (64)
<b>Blasts en SP, %</b>	0 (0-20)	
<5%		32/38 (84)
≥5%		6/38 (16)
<b>Blasts en MO, %</b>	11 (0-36)	
<20%		29 (74)
≥20%		10 (26)
<b>Citogenètica</b>		
Cariotip normal		8 (21)
Cariotip alterat		31 (79)
<b>Grup de risc IPSS</b>		
Intermig-1		4 (10)
Intermig-2		19 (49)
Alt		16 (41)
<b>Grup de risc IPSS-R</b>		
Intermig		5 (13)
Alt		12 (31)
Molt alt		22 (56)

ARSA: anèmia refractària amb sideroblasts en anell; CRDM-SA: citopènia refractària amb displàsia multilínea i sideroblasts en anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínea; AREB-1 anèmia refractària amb excés de blasts-1; AREB-2: anèmia refractària amb excés de blasts-2; LAMs: leucèmia aguda mieloide secundària; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia; IPSS: International prognostic score System; IPSS-R: International prognostic score System revised.

### **1.2- Citogenètica convencional**

Al moment del diagnòstic es va obtenir un resultat de citogenètica per a totes les mostres analitzades. Vuit (21%) pacients tenien un cariotip normal o una pèrdua del cromosoma Y. La resta dels pacients (n=31; 79%) presentaven un cariotip alterat, que a més a més, en molts dels casos era complex (n=18,46%).

### **1.3- Seqüenciació de gens diana**

Un total de 56 mostres es van analitzar mitjançant un panell dirigit de 83 gens mitjançant seqüenciació massiva (39 al moment del diagnòstic, 17 durant el seguiment [6 en resposta i 11 a la recaiguda]). A més a més, de 21 pacients es va realitzar la NGS de mostra control, no patològica, a partir de cèl·lules CD3+ per a poder descartar els polimorfismes propis de cada individu.

Els estudis de NGS tenien una profunditat mitja de lectura per base de 737 vegades (737x) i més del 95% de les seqüències diana presentaven més de 100 lectures independents. Després d'aplicar els filtres (explicats a l'apartat de material i mètodes) es va detectar una mitja de dues variants (patogèniques o possiblement patogèniques) per mostra (rang 0-5) que no estaven presents a la mostra control (CD3+).

### **1.4- Anàlisi mutacional al diagnòstic**

De tota la nostra cohort de pacients, 37 de les 39 (95%) mostres al diagnòstic presentaven almenys una mutació, afectant 35 dels 83 gens estudiats. Els gens més freqüentment alterats (en >10% dels pacients) van ser *TP53* (49%), *DNMT3A* (21%) i *SRSF2* (18%); seguits de *TET2* (15%) i *U2AF1* (15%). La llista amb la freqüència de tots els gens afectats es descriu a la Taula 12. Els 48 gens on no vam trobar cap mutació es descriuen al peu de la Taula 12.

**Taula 12.** Freqüències dels gens alterats en tota la cohort de pacients amb SMD d'alt risc I LAMs al diagnòstic (n=39)

Gen	Nº variacions	Nº pacients	% pacients que tenen alteracions en aquest gen
<i>TP53</i>	24	19	48,72%
<i>DNMT3A</i>	8	8	20,51%
<i>SRSF2</i>	7	7	17,95%
<i>TET2</i>	6	6	15,38%
<i>U2AF1</i>	6	6	15,38%
<i>EZH2</i>	3	3	7,69%
<i>RUNX1</i>	3	3	7,69%
<i>STAG2</i>	3	3	7,69%
<i>RAD21</i>	2	2	5,13%
<i>ASXL1</i>	2	2	5,13%
<i>BCOR</i>	2	2	5,13%
<i>CUX1</i>	2	2	5,13%
<i>EP300</i>	2	2	5,13%
<i>SF3B1</i>	2	2	5,13%
<i>ABL1</i>	1	1	2,56%
<i>BCORL1</i>	1	1	2,56%
<i>CEBPA</i>	1	1	2,56%
<i>CSF3R</i>	1	1	2,56%
<i>ETV6</i>	1	1	2,56%
<i>IDH2</i>	1	1	2,56%
<i>JAK2</i>	1	1	2,56%
<i>KMT2A</i>	1	1	2,56%
<i>KMT2D</i>	1	1	2,56%
<i>KRAS</i>	1	1	2,56%
<i>LUC7L2</i>	1	1	2,56%
<i>NF1</i>	1	1	2,56%
<i>NPM1</i>	1	1	2,56%
<i>NRAS</i>	1	1	2,56%
<i>PDGFRB</i>	1	1	2,56%
<i>PHF6</i>	1	1	2,56%
<i>SETBP1</i>	1	1	2,56%
<i>SF3A1</i>	1	1	2,56%
<i>SH2B3</i>	1	1	2,56%
<i>SMC3</i>	1	1	2,56%
<i>WT1</i>	1	1	2,56%

**Els gens que no vam trobar alterats en cap pacient són:** *AEBP2, ATRX, BRAF, CALR, CBL, CBLB, CDH13, CDH3, CDKN2A, CREBBP, CSNK1A1, CTCF, CTNNA1, EED, FLT3, GATA1, GATA2, GCAT, GNAS, HRAS, IDH1, IKZF1, IRF1, JAK3, JARID2, KDM6A, KIT, MECOM, MPL, PDGFRA, PHLPP1, PTEN, PTPN11, RPS14, SALL4, SBDS, SF1, SFPQ, SMC1A, SPARC, STAG1, SUZ12, TERC, TERT, TGM2, TIMM50, UMODL1 i ZRSR2.*

La majoria de les mutacions detectades eren variants *missense*, però també es van detectar variants *nonsense* i *frameshift*. Els detalls de totes les variants detectades en els 39 pacients al diagnòstic estan descrites en la Taula 13.

**Taula 13.** Variants detectades en tota la cohort de pacients amb SMD d'alt risc i LAMs al diagnòstic (n=39).

Pacient ID	Gen	Variants	Cr	Coordenades (hg19)	Típus	VAF (%)	Conseqüència
29	ABL1	G>G/A	9	133738189	snv	51,26	<i>missense</i>
33	ASXL1	CG>CG/C	20	31022642	deleció	37,52	<i>frameshift_truncament</i>
29	ASXL1	C>C/G	20	31022288	snv	43,13	<i>nonsense</i>
32	BCOR	G>G/GA	X	39932522	inserció	62,41	<i>frameshift_elongació</i>
14	BCOR	G>G/C	X	39921510	snv	85,84	<i>nonsense</i>
32	BCORL1	C>C/CA	X	129162665	inserció	68,23	<i>frameshift_elongació</i>
30	CEBPA	G>G/GGCGGGT	19	33792731	inserció	28,22	<i>inframe_inserció</i>
37	CSF3R	C>C/T	1	36935408	snv	52,09	<i>missense</i>
39	CUX1	G>G/T	7	101882800	snv	28,12	<i>nonsense</i>
17	CUX1	G>G/A	7	101758502	snv	35,9	<i>missense</i>
22	DNMT3A	G>G/A	2	25467083	snv	30,74	<i>nonsense</i>
4	DNMT3A	T>T/A	2	25462060	snv	31,02	<i>nonsense</i>
25	DNMT3A	CAG>CAG/C	2	25458625	deleció	31,13	<i>frameshift_truncament</i>
3	DNMT3A	G>G/A	2	25457243	snv	41,81	<i>missense</i>
5	DNMT3A	G>G/A	2	25463248	snv	41,87	<i>missense</i>
28	DNMT3A	G>G/C	2	25463541	snv	42,77	<i>missense</i>
14	DNMT3A	A>A/C	2	25463229	snv	42,87	<i>missense</i>
39	DNMT3A	G>G/A	2	25463184	snv	44,61	<i>missense</i>
3	EP300	C>C/A	22	41547994	snv	45,43	<i>missense</i>
37	EP300	C>C/T	22	41546029	snv	57,77	<i>missense</i>
30	ETV6	C>C/CA	12	12038928	inserció	22,56	<i>frameshift_elongació</i>
4	EZH2	T>T/A	7	148526933	snv	37,58	<i>missense</i>
7	EZH2	T>T/A	7	148506435	snv	79,4	<i>missense</i>
19	EZH2	T>T/C	7	148526897	snv	90,11	<i>missense</i>
33	IDH2	C>C/T	15	90631934	snv	47,22	<i>missense</i>
37	JAK2	G>G/T	9	5073770	snv	14,29	<i>missense</i>
27	KMT2A	C>C/A	11	118374121	snv	49,34	<i>missense</i>
31	KMT2D	C>C/T	12	49424704	snv	36,25	<i>missense</i>
12	KRAS	C>C/T	12	25380283	snv	41,94	<i>missense</i>
24	LUC7L2	G>G/C	7	139091978	snv	25,5	<i>missense</i>

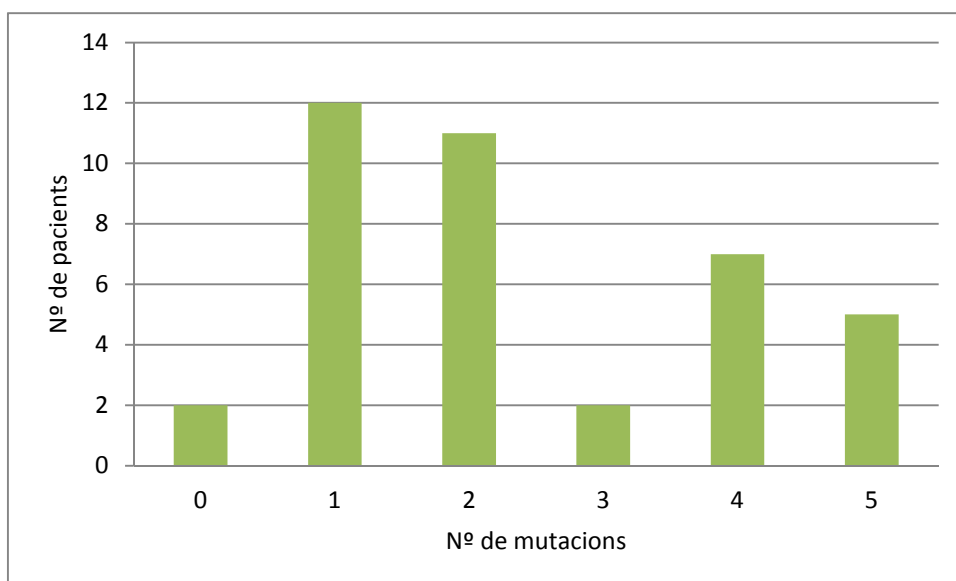
17	NF1	G>G/A	17	29684020	snv	28,79	missense
28	NPM1	C>C/CTCTG	5	170837543	inserció	28,57	frameshift_elongació
34	NRAS	C>C/T	1	115258747	snv	44,93	missense
3	PDGFRB	C>C/G	5	149514402	snv	45,95	missense
2	PHF6	C>C/T	X	133527636	snv	77,58	nonsense
38	RAD21	G>G/A	8	117868927	snv	12,23	nonsense
28	RAD21	T>T/TA	8	117875443	inserció	36,79	frameshift_elongació
30	RUNX1	G>G/T	21	36252937	snv	10,1	missense
23	RUNX1	C>C/T	21	36252877	snv	25,45	missense
34	RUNX1	C>C/T	21	36231773	snv	46,21	missense
19	SETBP1	G>G/A	18	42531913	snv	51,01	missense
12	SF3A1	C>C/T	22	30734818	snv	53,83	missense
23	SF3B1	C>C/G	2	198267359	snv	37,6	missense
38	SF3B1	C>C/G	2	198267359	snv	47,09	missense
29	SH2B3	G>G/A	12	111856661	snv	45,42	missense
29	SMC3	G>G/A	10	112341690	snv	31,08	missense
33	SRSF2	G>G/T	17	74732959	snv	34,8	missense
29	SRSF2	G>G/T	17	74732959	snv	37,53	missense
38	SRSF2	G>G/T	17	74732959	snv	41,85	missense
3	SRSF2	G>G/T	17	74732959	snv	43,37	missense
36	SRSF2	G>G/T	17	74732959	snv	46,85	missense
34	SRSF2	G>G/T	17	74732959	snv	49,69	missense
30	SRSF2	G>G/A	17	74732959	snv	49,9	missense
32	STAG2	C>C/CCAAT	X	123227905	inserció	65,85	frameshift_elongació
34	STAG2	T>T/TATAC	X	123210268	inserció	83,51	frameshift_elongació
33	STAG2	C>C/T	X	123220428	snv	85,29	nonsense
30	TET2	C>C/T	4	106156747	snv	38,74	nonsense
3	TET2	C>C/T	4	106156747	snv	42,66	nonsense
38	TET2	GA>GA/G	4	106155754	deleció	42,91	frameshift_truncament
34	TET2	C>C/T	4	106156747	snv	44,69	nonsense
12	TET2	T>T/C	4	106197285	snv	78,53	missense
2	TET2	C>C/G	4	106193995	snv	93,77	nonsense
27	TP53	G>G/A	17	7577121	snv	16,31	missense
27	TP53	T>T/A	17	7577084	snv	17,18	missense
25	TP53	C>C/T	17	7577114	snv	24,08	missense
31	TP53	C>C/A	17	7577568	snv	31,6	missense
4	TP53	T>T/C	17	7577536	snv	32,26	missense
17	TP53	C>C/T	17	7577120	snv	34,62	missense

16	TP53	T>T/C	17	7578535	snv	34,74	missense
4	TP53	G>G/A	17	7578212	snv	35,33	nonsense
16	TP53	C>C/T	17	7577568	snv	38,84	missense
15	TP53	C>C/T	17	7577509	snv	39,56	missense
10	TP53	G>G/A	17	7577022	snv	41,03	nonsense
10	TP53	C>C/T	17	7577120	snv	42,17	missense
15	TP53	G>G/A	17	7578275	snv	42,17	nonsense
12	TP53	C>C/T	17	7578413	snv	44,99	missense
14	TP53	C>C/A	17	7577097	snv	45,83	missense
21	TP53	C>C/T	17	7577538	snv	48,18	missense
26	TP53	C>C/T	17	7578406	snv	55,46	missense
9	TP53	T>T/TGGGAA	17	7579388	inserció	58,37	frameshift_elongació
22	TP53	C>C/T	17	7578406	snv	67,38	missense
5	TP53	C>C/T	17	7577120	snv	67,47	missense
11	TP53	G>G/GC	17	7579315	inserció	68,59	frameshift_elongació
6	TP53	C>C/T	17	7577142	snv	76,2	missense
8	TP53	C>C/T	17	7578493	snv	90,53	nonsense
1	TP53	T>T/C	17	7578190	snv	96,15	missense
18	U2AF1	T>T/G	21	44514777	snv	24,07	missense
17	U2AF1	T>T/G	21	44514777	snv	26,71	missense
32	U2AF1	G>G/A	21	44524456	snv	39,67	missense
35	U2AF1	G>G/A	21	44524456	snv	42,42	missense
14	U2AF1	G>G/A	21	44524456	snv	45,5	missense
12	U2AF1	T>T/G	21	44514777	snv	49,79	missense
28	WT1	G>G/T	11	32456298	snv	38,53	missense

Cr: cromosoma; snv: *single nucleotide variant*: Variant d'un únic nucleòtid; VAF: *Variant Allele Frequency*: Freqüència al·lèlica de la variant; *missense*: el canvi de nucleòtid comporta un canvi d'aminoàcid; *nonsense*: mutació puntual que comporta el truncament de la proteïna degut a que es genera un codó STOP prematur; *frameshift*: canvi en la pauta de lectura degut a una inserció/deleció no múltiple de tres nucleòtids, *inframe*: la inserció/deleció no implica canvi en la pauta de lectura, ja que són múltiples de tres nucleòtids;

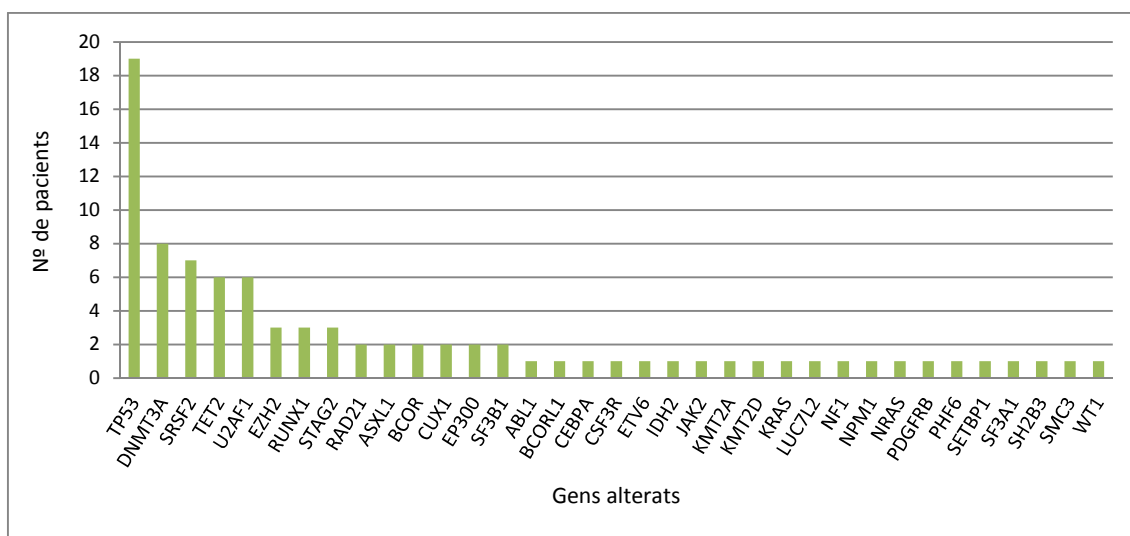
Al disposar de teixit control provinent de cèl·lules CD3+, vàrem poder descartar una mitja de dues variants per mostra que no havien estat prèviament descrites com a SNPs en bases de dades poblacionals, però que en els nostres pacients eren clarament variants germinals.

De manera global, la distribució del nombre de mutacions detectades per pacient era la següent: 12 (31%) pacients tenien 1 mutació, 11 (28%) pacients presentaven dues mutacions, 2 (5%) presentaven 3 mutacions, 7 (18%) pacients tenien 4 mutacions i 5 (13%) pacients tenien 5 mutacions (Figura 21).



**Figura 21.** Distribució del nombre de mutacions detectades en cada pacient al diagnòstic (n=39 pacients)

A la Figura 22 es descriu el número de pacients que presentaven al diagnòstic alguna mutació agrupada pel gen afectat.



**Figura 22.** Distribució de les mutacions detectades al diagnòstic (n= 39 pacients)

D'acord amb la categoria citològica, el promig d'alteracions detectades en cada subgrup de pacients està descrit a la Taula 14, suggerint que els pacients amb LAMs presentaven més variants que els pacients amb AREB-2, AREB-1 o CRDM.

**Taula 14.** Mitjana de mutacions segons categoria citològica.

	Nº pacients	Mitjana de mutacions per pacient (rang)
LAMs	9	2.889 (1-5)
AREB-2	14	2.286 (0-5)
AREB-1	9	2 (1-4)
CRDM	5	2.2 (1-4)
CRDM-SA	1	5
ARSA	1	1

ARSA: anèmia refractària amb sideroblasts en anell; CRDM-SA: citopènia refractària amb displàsia multilínea i sideroblasts en anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínea; AREB-1 anèmia refractària amb excés de blasts-1; AREB-2: anèmia refractària amb excés de blasts-2; LAMs: leucèmia aguda mieloide secundària.

Finalment, també vam examinar la correlació entre les mutacions gèniques per intentar identificar possibles interaccions funcionals al llarg dels diferents gens afectats. Degut a l'heterogeneïtat dels gens mutats i al nombre de pacients de la nostra cohort, ens vam centrar en fer els anàlisis estadístics només en aquelles mutacions detectades en almenys 5 pacients. L'única associació que vam trobar va ser la correlació entre les mutacions de *SRSF2* i *TET2* ( $P=0.006$ ), i ambdues mutacions eren mútuament excloents amb mutacions de *TP53* ( $P=0.008$ ).

### 1.5- Relacions entre mutacions gèniques i variables clíniques

Vam investigar les relacions entre les mutacions detectades al diagnòstic i les principals variables clíniques i biològiques dels pacients, incloent l'edat, el gènere, el subtipus de l'OMS, els recomptes cel·lulars a SP, el percentatge de blasts en SP i MO, el cariotip i les categories del IPSS-R.

Vam observar una tendència entre la presència de mutacions en *SRSF2* i pacients d'edat avançada ( $>70$  anys;  $P=0.098$ ), i aquestes mutacions s'associaven amb l'absència de cariotip complex ( $P=0.010$ ). Les mutacions de *U2AF1* es van associar amb menor recompte de neutròfils a SP ( $<0.8 \times 10^9/L$ ) ( $P=0.003$ ). Els pacients amb *TET2* wild-type s'associaven amb menys de 5% de blasts a SP ( $P=0.021$ ). Les mutacions en el gen *TP53* s'associaven a l'edat, més joves de 70 anys ( $P=0.007$ ), cariotip alterat ( $P=0.003$ ), la majoria amb cariotip complex ( $P<0.001$ ), i amb grups d'alt risc segons el IPSS-R ( $P=0.003$ ). També vam estudiar l'efecte de les mutacions de *TP53* en un subconjunt de pacients que van fer transplantament al·logènic ( $n=5$ ) i els tres pacients que tenien mutacions en *TP53* van morir en menys d'un any des del

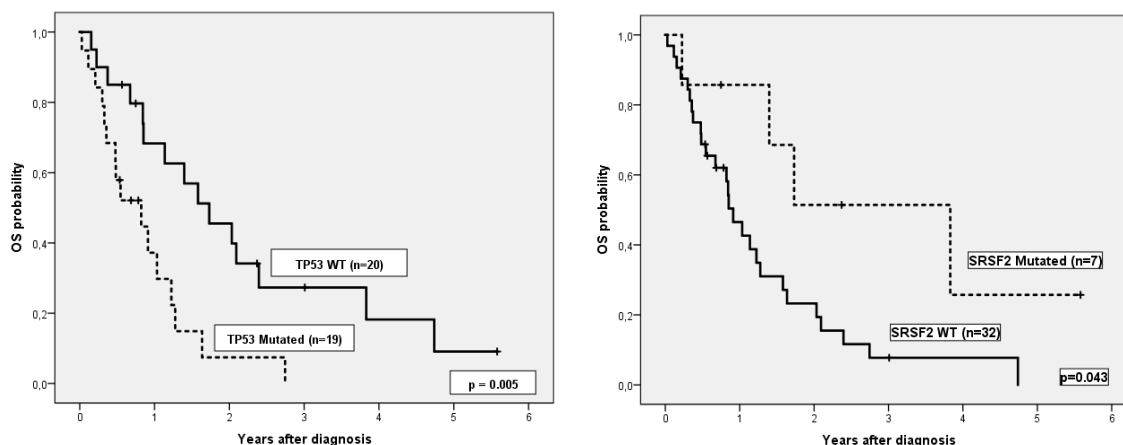


diagnòstic de la SMD, mentre els altres dos pacients, sense mutacions en *TP53*, es mantenien vius més de tres anys després del diagnòstic.

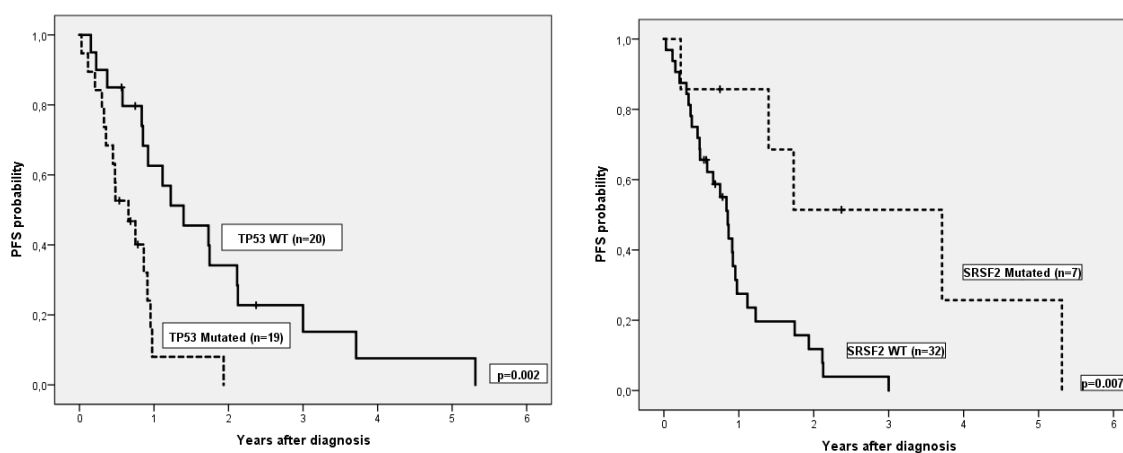
### **1.6- Anàlisi de supervivència global i supervivència lliure de progressió**

Vam explorar l'impacte de les dades clíniques i biològiques en la supervivència dels pacients. La mediana de seguiment dels pacients va ser de 11 mesos (rang 0-68), i la mediana de SG i SLP (95% IC) de la cohort va ser de 1.1 anys (0.6, 1.6) i 0.9 anys (0.8, 1) respectivament. El cariotip complex, el grup de risc segons IPSS-R i els nivells d'hemoglobina eren predictius tant de SG com de SLP (Taula 15). A més a més, hi havia una tendència a pitjor SLP en els pacients amb més de 5% de blasts a SP al diagnòstic. Pel que fa a les característiques genètiques, no vam trobar cap associació entre el número de mutacions i la SG o SLP. Però si ens centràvem en gens específics, només les mutacions en *TP53* estaven associades a menor SG (mediana SG pacients amb mutació: 0.822, IC:0.214-1.430; vs mediana SG pacients sense mutació: 1.732, IC:0.874-2.589) i SLP (mediana SLP pacients amb mutació: 0.658, IC:0.308-1.007; vs mediana SLP pacients sense mutació: 1.397, IC:0.566-2.229), mentre que les mutacions en *SRSF2* correlacionaven amb millor SG (mediana SG pacients amb mutació: 3.830, IC:1.511-6.149; vs mediana SG pacients sense mutació: 0.912, IC:0.663-1.161) i SLP (mediana SLP pacients amb mutació: 3.712, IC:1.505-5.919; vs mediana SLP pacients sense mutació: 0.852, IC:0.679-1.025) (Figura 23).

(a)

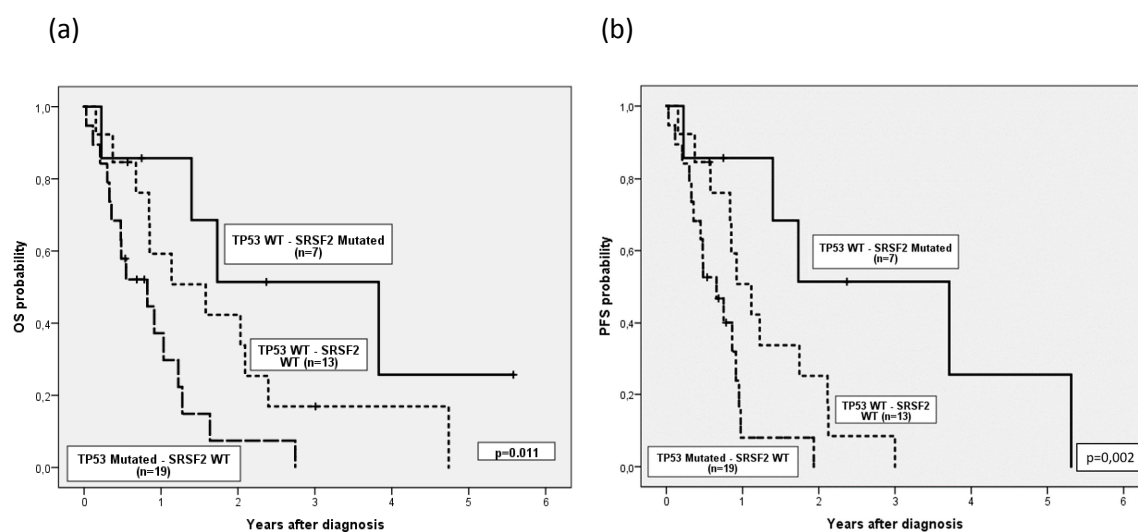


(b)



**Figura 23.** (a) Supervivència global i (b) Supervivència lliure de progressió segons l'estat mutacional de *TP53* (esquerra) i *SRSF2* (dreta).

Si consideràvem conjunt l'estat mutacional de *SRSF2* i *TP53*, els pacients es podien estratificar en tres grups significativament diferents en quant a SG i SLP (Figura 24). Sent el de millor pronòstic aquells pacients *SRSF2* mutat/*TP53* wild-type (SG:3.830, IC:1.511-6.149; SLP:3.712, IC:1.505-5.919) i el de pitjor pronòstic *SRSF2* wild-type/*TP53* mutada (SG: 0.822, IC:0.214-1.430; SLP:0.658, IC:0.308-1.007). El tercer grup *SRSF2* wild-type/*TP53* wild-type tenia SG i SLP entremig dels dos grups anteriors (SG:1.581, IC: 0.375-2.786; SLP:1.115, IC:0.680-1.550)



**Figura 24.** (a) Supervivència global i (b) Supervivència lliure de progressió considerant conjuntament l'estat mutacional de *TP53* i *SRSF2*.

Finalment, degut a la gran concordança entre les tres variables que eren estadísticament significatives en l'anàlisi univariant (citogenètica, IPSS-R i estat mutacional de *TP53*) vam realitzar un anàlisi multivariant ajustat incloent només la citogenètica i l'estat mutacional de *TP53* (Taula 15). Per la SLP, l'estat mutacional de *TP53* es mantenia significatiu, mentre que cap de les variants mantenia el seu impacte independent en la SG.

**Taula 15.** Resultats de la supervivència global i la supervivència lliure de progressió en l'anàlisi univariant i multivariant.

ANÀLISI UNIVARIANT					
Variable	Categories	Supervivència Global (SG)		Supervivència lliure de progressió (SLP)	
		Mediana SG (95%IC)	P valor	Mediana SLP (95%IC)	P valor
<b>Cariotip</b>	Normal	2.1 (1.2, 3)	0.022	1.75 (1.7, 1.8)	0.01
	Alterat	0.9 (0.7, 1)		0.8 (0.6, 1.1)	
<b>Nivells d'Hemoglobina</b>	<100	0.9 (0.5, 1.2)	0.028	0.8 (0.5, 1.1)	0.029
	≥100	2.1 (0.6, 3.6)		1.7 (0.3, 3.1)	
<b>IPSS-R</b>	Internig	2 (0, 4.6)	0.026	1.2 (0.2, 2.2)	0.005
	Alt	1.7 (1.2, 2.2)		1.7 (0.8, 2.7)	
	Molt alt	0.5 (0.1, 1)		0.5 (0.2, 0.8)	
<b>TP53</b>	WT	1.7 (0.9, 2.6)	0.005	1.4 (0.6, 2.2)	0.002
	Mutat	0.8 (0.2, 1.4)		0.7 (0.3, 1)	
<b>SRSF2</b>	WT	0.9 (0.7, 1.2)	0.043	0.9 (0.7, 1)	0.007
	Mutat	3.8 (1.5, 6.1)		3.7 (1.5, 5.9)	
ANÀLISI MULTIVARIANT					
Variable	Categoria	Supervivència Global (SG)		Supervivència lliure de progressió	
		HR (95%IC)	P valor	HR (95%IC)	P valor
<b>Cariotip</b>	Normal	2.2 (0.7, 7.3)	0.182	2.6 (0.8, 8.3)	0.111
<b>TP53</b>	WT	2.1 (0.9, 4.9)	0.081	2.4 (1.01, 5.6)	<b>0.047</b>

Els valors estadísticament significatius en l'anàlisi multivariant estan marcats en **negreta**.

### 1.7- Factors predictius de resposta a teràpia amb agents hipometilants

A la nostra cohort de pacients, 16 casos es van classificar com a responedors (8 RC i 8RP) a AZA als 6 mesos de tractament i 8 casos es van classificar com a no-responedors (2 tenien malaltia estable i 6 fallo al tractament). Hi havia 15 pacients que van ser èxits abans del sisè cicle, però d'aquells pacients que van rebre com a mínim 3 cicles d'AZA es va valorar la resposta segons el percentatge de blasts a MO i dels seus requeriments transfusionals durant aquests mesos. Després d'això, vam poder incorporar a l'anàlisi set pacients més, sis que no van respondre, ja que les seves necessitats transfusionals no van disminuir o perquè el percentatge de blasts va augmentar sota el tractament amb AZA, i un pacient es va considerar responedor perquè les seves necessitats transfusionals van disminuir amb el tractament amb AZA abans de realitzar el TPH. Els altres 8 pacients van rebre menys de 3 cicles d'AZA i es van considerar no avaluables pels factors predictius de resposta.

La taxa de resposta global va ser del 55% (17/31). L'anàlisi univariant de l'impacte de les característiques clíniques i l'estat mutacional en la taxa de resposta està resumit a la Taula 16, però no vam trobar cap variable clínica o mutació gènica que s'associés a la resposta al tractament.

**Taula 16.** Diferències en la resposta al tractament basant-nos en les característiques clíniques i l'estat mutacional dels 31 pacients avaluables.

Variable	No-responedors n= 14 (%)	Responedors n= 17(%)	p-valor
<b>Edat, anys</b>			
<70	5 (36)	8 (47)	0.524
≥70	9 (64)	9 (53)	
<b>Gènere</b>			
Masculí	9 (64)	14 (82)	0.412
Femení	5 (36)	3 (18)	
<b>Classificació OMS 2008</b>			
ARSA	1 (7)	0	
CRDM-SA	1 (7)	0	
CRDM	1 (7)	4 (24)	
AREB-1	5 (36)	1 (6)	
AREB-2	4 (29)	7 (41)	
LAMs	2 (14)	5 (29)	
<b>Nivells d'Hemoglobina, g/dL</b>			
<10 g/dL	12 (86)	10 (59)	0.132
≥10 g/dL	2 (14)	7 (41)	
<b>Recòmpte leucòcits, x10<sup>9</sup>/L</b>			
<4 x10 <sup>9</sup> /L	8 (57)	14 (82)	0.112
>4 x10 <sup>9</sup> /L i <11 x10 <sup>9</sup> /L	6 (43)	2 (12)	
≥11 x10 <sup>9</sup> /L	0	1 (6)	

<b>Recòmpte plaquetes, x10<sup>9</sup>/L</b>			
<100 x10 <sup>9</sup> /L	10 (71)	12 (71)	1
≥100 x10 <sup>9</sup> /L	4 (29)	5 (29)	
<b>Recòmpte neutròfils, x10<sup>9</sup>/L</b>			
<0.8 x10 <sup>9</sup> /L	3 (23)	8 (47)	0.177
≥0.8 x10 <sup>9</sup> /L	10 (77)	9 (53)	
<b>Blasts en SP, %</b>			
<5%	10 (71)	15 (94)	0.157
≥5%	4 (29)	1 (6)	
<b>Blasts en MO, %</b>			
<20%	12 (86)	11 (65)	0.240
≥20%	2 (14)	6 (35)	
<b>Citogenètica</b>			
Cariotip normal	3 (21)	4 (24)	1
Cariotip alterat	11 (79)	13 (76)	
<b>Grup de risc segons IPSS</b>			
Intermig 1	2 (14)	2 (12)	0.816
Intermig 2	7 (50)	7 (41)	
Alt	5 (36)	8 (47)	
<b>Grup de risc segons IPSS-R</b>			
Intermig	3 (21)	2 (12)	0.739
Alt	5 (36)	6 (35)	
Molt alt	6 (43)	9 (53)	
<b>Estat mutacional TP53</b>			
Wild-type	8 (57)	10 (59)	0.925
Mutat	6 (43)	7 (41)	
<b>Estat mutacional DNMT3A</b>			
Wild-type	11 (79)	12 (71)	0.698
Mutat	3 (21)	5 (29)	
<b>Estat mutacional SRSF2</b>			
Wild-type	11 (79)	14 (82)	1
Mutat	3 (21)	3 (18)	
<b>Estat mutacional TET2</b>			
Wild-type	11 (79)	15 (88)	0.636
Mutat	3 (21)	2 (12)	
<b>Estat mutacional U2AF1</b>			
Wild-type	14 (100)	14 (82)	0.232
Mutat	0	3 (18)	

ARSA: anèmia refractària amb sideroblasts en anell; CRDM-SA: citopènia refractària amb displàsia multilínia i sideroblasts en anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; AREB-1 anèmia refractària amb excés de blasts-1; AREB-2: anèmia refractària amb excés de blasts-2; LAMs: leucèmia aguda mieloide secundària; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia; IPSS: *International prognostic score System*; IPSS-R: *International prognostic score System revised*.

### **1.8- Seguiment mutacional durant la resposta, recaiguda o progressió a LAM**

Finalment, es va realitzar estudi del panell de seqüenciació al moment de la resposta en 6 pacients i a la recaiguda o transformació a LAM en 11 pacients (Taula 17). En dos pacients el nombre de mutacions a la resposta va disminuir (pacients ID32 i ID28), dos pacients van mantenir el nombre de mutacions (pacients ID13 i ID25) i en dos pacients el nombre de mutacions va augmentar (pacients ID7 i ID20), tot i que es trobaven en millora hematològica (Figura 25). El nombre de mutacions detectades per pacient va ser el mateix entre el diagnòstic i la progressió en 4/11 pacients (ID4, ID16, ID23 i ID25) (36.4%) i va augmentar al moment de la recaiguda o progressió a LAM en 6/11 pacients (ID7, ID11, ID13, ID20, ID28 i ID32) (54.5%). En el pacient ID32, la clona dominant observada al diagnòstic va desaparèixer per complet a la resposta però va reaparèixer en la recaiguda juntament amb mutacions en altres gens. Només un pacient (ID21) no presentava a la recaiguda la mutació detectada al diagnòstic o cap altre mutació del panell de gens estudiat.

**Taula 17.** Llista de gens afectats en els pacients amb SMD d'alt risc i LAMs que van ser estudiats al diagnòstic, resposta i/o al temps de la progressió/recaiguda (n=11).

Dades al diagnòstic			Dades en resposta			Dades a la progressió/recaiguda		
ID	Alteració	VAF	Temps	Alteració	VAF	Temps	Alteració	VAF
pacient i DX								
<b>Pt ID4</b>	DNMT3A c.2347T>A	31%		*		6M	DNMT3A c.2347T>A	47.1%
<b>AREB-1</b>	EZH2 c.371T>A	37.6%				relapse	EZH2 c.371T>A	42.5%
	TP53 c.745T>C	32.3%					TP53 c.745T>C	42.9%
	TP53 c.637G>A	35.3%					TP53 c.637G>A	47.2%
<b>Pt ID16</b>	TP53 c.713C>T	38.8%				6M	TP53 c.713C>T	34%
<b>AREB-1</b>	TP53 c.395T>C	34.7%				progressió	TP53 c.395T>C	34%
<b>Pt ID7</b>	EZH2 c.2077T>A	79.4%	3M	EZH2 c.2077T>A	80.7%	6M	EZH2 c.2077T>A	72.6%
<b>AREB-1</b>			Resposta parcial	<b>IDH1 c394G&gt;A</b>	27.4%	progressió	<b>IDH1 c394G&gt;A</b>	35.3%
<b>Pt ID11</b>	TP53 c.371_372insC	68.6%		*		2M	TP53 c.371_372insC	38.8%
<b>AREB-1</b>						progressió	<b>NF1 c.282_283insG</b>	27%
<b>Pt ID32</b>	BCOR	62.4%	12M	<b>BCOR c.2752G&gt;A</b>	51.2%	27M	BCOR	79.3%
	c.2076_2077insA						c.2076_2077insA	
<b>AREB-2</b>	BCORL1	68.2%	Resposta completa	U2AF1 c.101G>A	34.6%	recaiguda	BCORL1	84.6%
	c.4134_4135insA						c.4134_4135insA	
	STAG2	65.8%					STAG2	84.1%
	c.3616_3617insCAAT						c.3616_3617insCAAT	
	U2AF1 c.101G>A	39.7%					U2AF1 c.101G>A	46.8%
							<b>GATA2</b>	24.1%
							<b>c.569_570insGCCC</b>	
							<b>NF1 c.1067T&gt;C</b>	42.6%
<b>Pt ID21</b>	TP53 c.743C>T	48.2%		*		12M	0	
<b>AREB-2</b>						recaiguda		
<b>Pt ID13</b>	0		24M	0		36M	<b>LUC7L2 c.1300A&gt;C</b>	38.9%
<b>AREB-2</b>			resposta			progressió	<b>TERT c.1234G&gt;A</b>	40.9%
							<b>TET2 c.5103G&gt;A</b>	37%
<b>Pt ID20</b>	0		4M	<b>ASXL1</b>	32.6%	12M	<b>ASXL1</b>	35.9%
<b>AREB-2</b>			Resposta parcial	<b>c.1926_1927insG</b>		recaiguda	<b>c.1926_1927insG</b>	
<b>Pt ID23</b>	RUNX1 c.485C>T	25.4%		*		6M	RUNX1 c.485C>T	64.3%
<b>AREB-2</b>	SF3B1 c.1998C>G	37.6%				recaiguda	SF3B1 c.1998C>G	43.1%
<b>Pt ID25</b>	DNMT3A	31.13%	3M	DNMT3A	17.6%	12M	DNMT3A	25.3%
	c.2546delAG			c.2546delAG			c.2546delAG	
<b>CRDM</b>	TP53 c.824C>T	24.08%	Resposta completa	TP53 c.824C>T	6.6%	recaiguda	TP53 c.824C>T	9.6%
<b>Pt ID28</b>	DNMT3A c.2141G>C	42.8%	5M	DNMT3A	23.7%	12M	DNMT3A c.2141G>C	33.5%
				c.2141G>C				

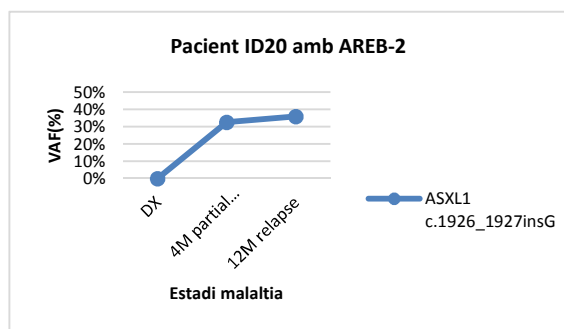
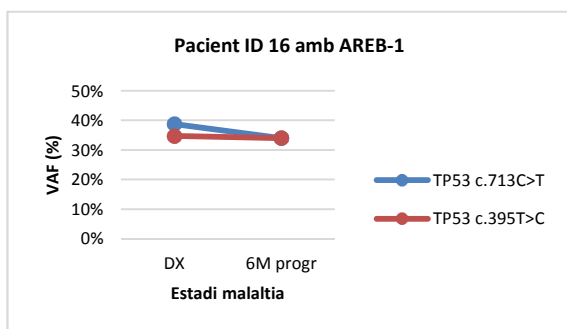
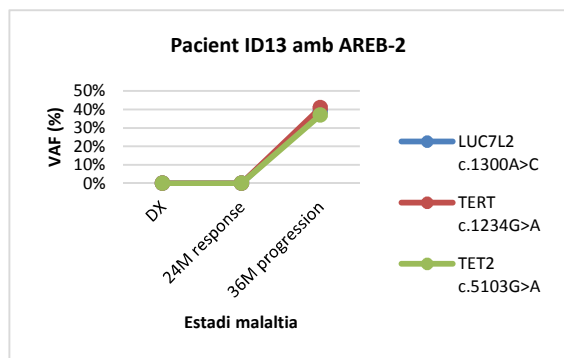
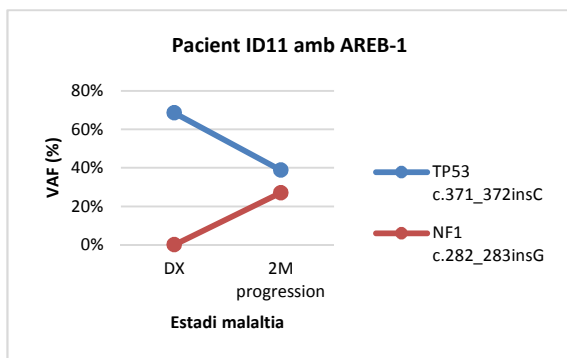
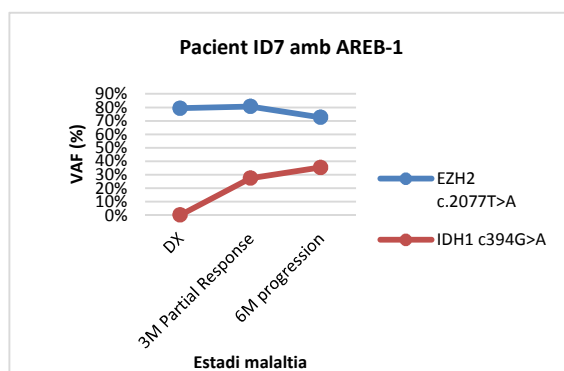
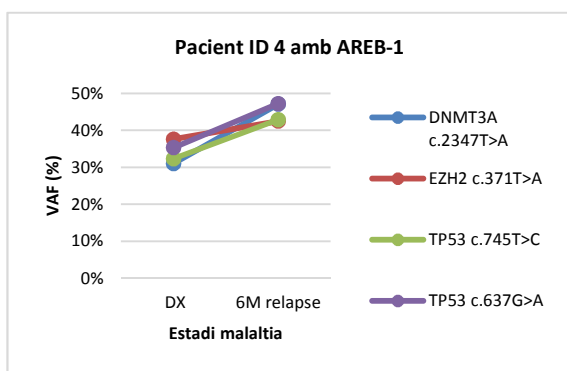


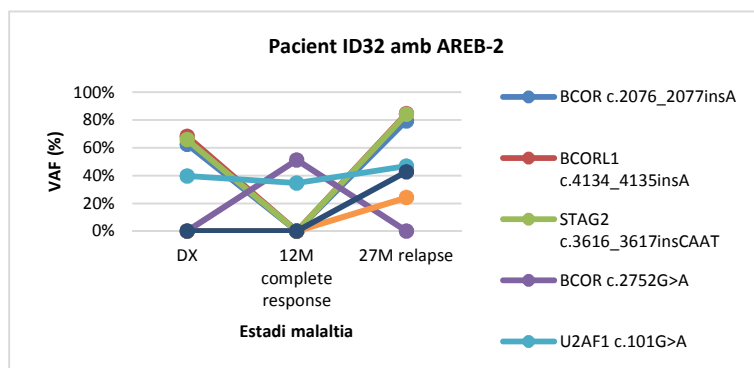
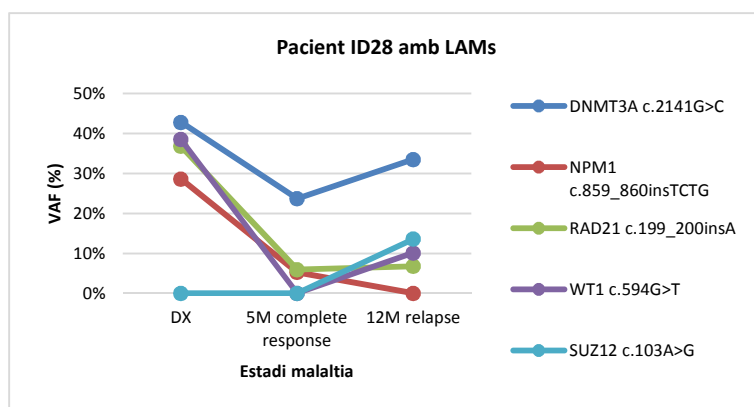
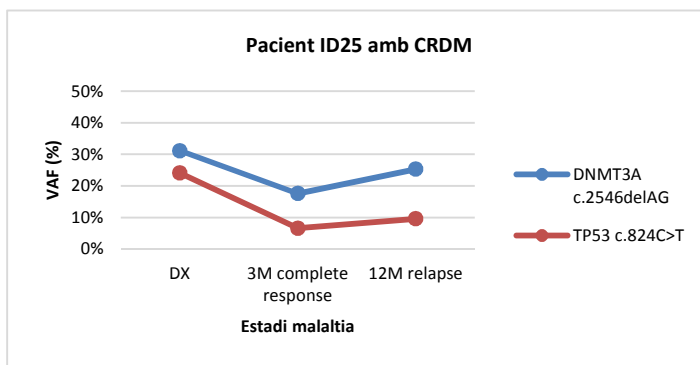
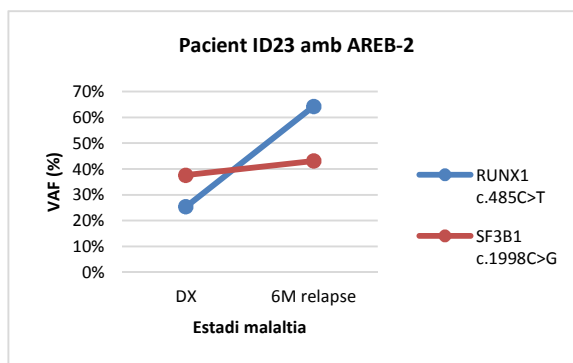
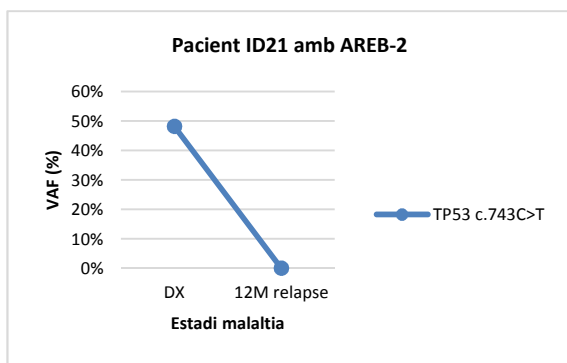
<b>LAMs</b>	NPM1	28.6%	Resposta completa	NPM1	5.25%	recaiguda	RAD21	6.8%
	c.859_860insTCTG			c.859_860insTCTG			c.199_200insA	
	RAD21	36.8%		RAD21	5.96%		WT1 c.594G>T	10.1%
	c.199_200insA			c.199_200insA			<b>SUZ12 c.103A&gt;G</b>	13.6%
	WT1 c.594G>T	38.5%						

DX: diagnòstic; M: mesos; Pt: Pacient; AREB-1: anèmia refractària amb excés de blasts-1; AREB-2: anèmia refractària amb excés de blasts-2; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínea; LAMs: leucèmia aguda mieloide secundària; VAF: Freqüència al·lèlica de la variant

\*: No hi ha dades en aquest punt

Els gens que difereixen dels alterats al moment del diagnòstic estan marcats en **negreta**.





**Figura 25.** Evolució de la freqüència de la variant al·lèlica durant el seguiment de la malaltia en 11 pacients tractats amb 5-azacitidina.

En 5 pacients (ID4, ID11, ID16, ID21 i ID23) es disposava de mostra al diagnòstic (DX) i a la recaiguda/progressió. En 6 pacients (ID7, ID13, ID20, ID25, ID28 i ID32) es disposava de mostra al diagnòstic, resposta i recaiguda/progressió. En tots els casos els patrons que vam observar es poden agrupar en els tres models següents:

- Model 1: la freqüència al·lèlica de la variant (VAF) de les mutacions, o el nombre de mutacions, disminueix a la resposta i augmenta a la progressió (pacient ID4, ID11, ID13, ID23, ID25, ID28 i ID32).
- Model 2: les VAFs de les mutacions, o el nombre de mutacions, augmenta a la resposta indicant la progressió molecular de la malaltia tot i que el pacient es trobi en milloria de les seves característiques hematològiques (pacient ID7 i ID20) o no es veu canvi entre les VAFs del diagnòstic i les de la progressió (ID16).
- Model 3: les VAFs de les mutacions, o el nombre de mutacions, disminueix o desapareix a la progressió de la malaltia indicant que la causa de la progressió no és deguda a les mutacions trobades al diagnòstic (pacient ID21).

## 2- SEGON ESTUDI: metilació global de l'ADN

### 2.1- Característiques dels pacients

L'estudi de metilació inclou un total de 75 pacients, dels que es van analitzar 156 mostres en diferents moments del tractament (Taula 18). D'aquestes mostres, 108 eren de pacients amb SMD d'alt risc i 48 mostres de LAM. Les principals característiques clíniques i biològiques estan descrites a la Taula 19.

**Taula 18.** Classificació de les mostres segons el moment de la malaltia i el tractament.

		Tractament només amb AZA	Altres tractaments: quimioteràpia (ICE), AZA i/o TPH
<b>SMD</b> (108 mostres) 49 pacients*	Diagnòstic	27	21
	Seguiment	37	23
<b>LAMs</b> (48 mostres) 26 pacient*	Diagnòstic	10	15
	Seguiment	13	10

SMD: síndrome mielodisplàstica; LAMs: leucèmia aguda mioelode secundària; AZA: azacitidina; ICE: idarrubicina, citarabina i etopòsid; TPH: transplantament de progenitors hematopoètics.

\*De dos pacients (un diagnosticat de SMD i l'altre de LAMs) no disposem de mostra al diagnòstic, però si durant el seguiment.

**Taula 19.** Principals característiques clíniques i hematològiques dels pacients al diagnòstic (n=75).

Variable	Mediana (rang)	N (%) (n=75)
<b>Edat, anys</b>	66 (32-83)	
<65		34
≥65		41
<b>Gènere</b>		
Masculí		52 (69)
Femení		23 (31)
<b>Nivells d'hemoglobina, g/L</b>	91 (57-136)	
<100		50
≥100		25
<b>Recopte de leucòcits, x10<sup>9</sup>/L</b>	2.9 (0.8-108)	
<4		47
>4 i <11		14
≥11		14
<b>Recopte de plaquetes, x10<sup>9</sup>/L</b>	68 (5-536)	
<100		48
≥100		27

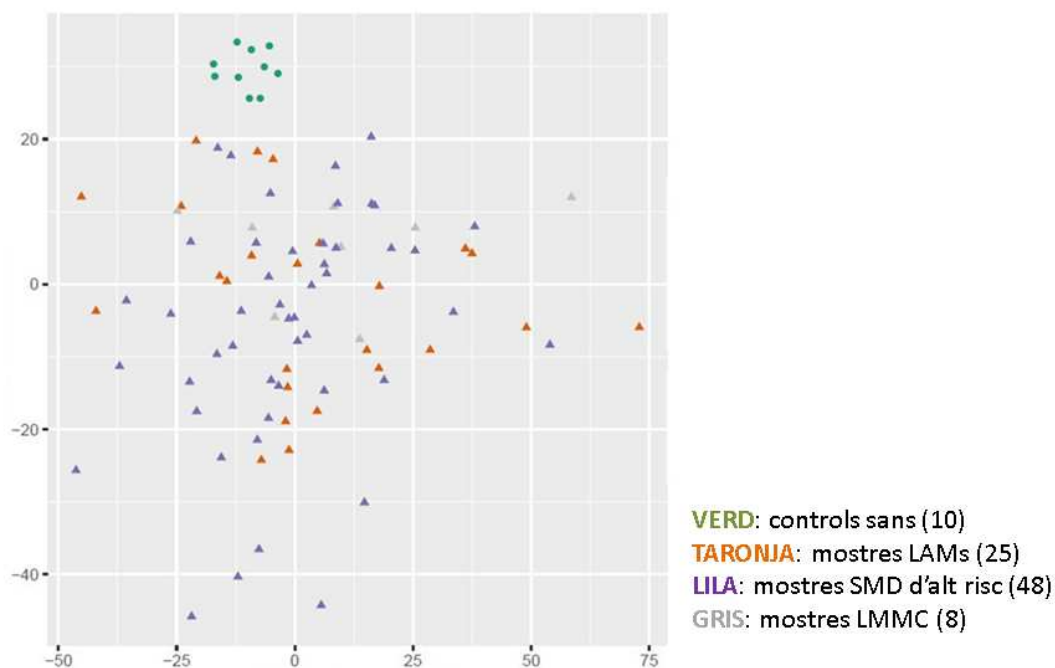
<b>Recòmpte de neutròfils, x10<sup>9</sup>/L</b>	1.23 (0.09-13.55)	
<0.8		27
≥0.8		47
NO DATA		1
<b>Blasts en SP, %</b>	0 (0-74)	
<5		55
≥5		20
<b>Blasts en MO, %</b>	15 (0-92)	
<20		45
≥20		30
<b>Citogenètica</b>		
Cariotip normal		28
Cariotip alterat		45
Citogenètica no informativa		2
<b>Categoria citogenètica (IPSS-R)</b>		
Molt bon pronòstic		1
Bon pronòstic		30
Pronòstic intermig		20
Mal pronòstic		6
Molt mal pronòstic		16
Citogenètica no informativa		2
<b>Grup de risc segons IPSS</b>		
Intermig-1		6
Intermig-2		30
Alt		37
Manquen dades		2
<b>Grup de risc segons IPSS-R</b>		
Baix risc		1
Intermig		11
Alt risc		30
Molt alt risc		30
Manquen dades		3
<b>Tractament</b>		
Azacitidina		38
Altres tractaments (ICE i/o TPH)		37
<b>Mutacions genètiques</b>		
Sense mutacions en gens que afecten a la metilació		22/33
Mutacions en gens que afecten a la metilació		11/33
<i>DNMT3A</i>		6/33
<i>TET2</i>		5/33
<i>IDH1/2</i>		1/33

LAMs: leucèmia aguda mieloide secundària; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia; ICE: idarrubicina, citarabina i etopòsid; TPH: transplantament hematopoètic; IPSS: *International prognostic score System*; IPSS-R: *International prognostic score System revised*.

## 2.2- Anàlisi de metilació global al diagnòstic

L'estudi de metilació global (metiloma) s'ha realitzat en les 156 mostres i en 10 controls sans utilitzant l'*array* de metilació HumanMethylation450 Infinium d'illumina. En totes les tongades d'experiments s'han analitzat les mateixes dues mostres per assegurar que no hi havia diferències degudes al procés tècnic ni al canvi dels números de lots dels *arrays* (controls tècnics). Els perfils de metilació d'aquestes dues mostres va ser sempre el mateix i totes les mostres van passar els criteris de control de qualitat de l'assaig. L'anàlisi no supervisat dels

perfils de metilació es va analitzar mitjançant un estudi d'anàlisi del component principal (PCA), el qual separava les mostres neoplàsiques de les mostres de controls sans, demostrant homogeneïtat en els controls i l'heterogeneïtat de la resta de mostres (Figura 26). Però a nivell de metilació global al diagnòstic no vam poder detectar cap diferència segons el grup citològic (SMD d'alt risc versus LAMs), segons el grup citogenètic o la resposta al tractament.



**Figura 26.** Perfils de metilació que permeten distingir els pacients dels controls sans. L'anàlisi del component principal (PCA) de metilació global de les mostres al diagnòstic permet separar els pacients de les mostres controls després d'un anàlisi no supervisat.

LAMs: leucèmia aguda mieloide secundària, SMD: síndrome mielodisplàstica, LMMC: leucèmia mielomonocítica crònica.

### **2.3- Diferència entre els perfils de metilació de les mostres al diagnòstic i els controls sans**

Per a poder identificar canvis en els perfils de metilació associats a la malaltia, vam comparar els perfils de metilació de l'ADN dels pacients amb SMD d'alt risc i LAMs al diagnòstic (n=73, 48 SMD i 25 LAMs) amb els perfils obtinguts dels controls sans (n=10) mitjançant anàlisis de metilació diferencial. Es van detectar 40395 sondes diferencialment metilades, però vam voler ser més estrictes i ens vam centrar només en aquelles sondes que eren estadísticament

significatives ( $p\text{-adj } fdr < 0.05$ ) i al mateix temps que tinguessin la metilació diferencial mitja entre els dos grups superior a 0.2 ( $>0.2$  *methylation difference*). Un total de 8247 sondes complien aquests criteris, hi havia 6841 sondes més metilades en les mostres de pacients que en els controls, mentre que hi havia 1406 sondes menys metilades. Per a poder entendre millor les diferències entre els pacients i els controls sans, vam centrar els nostres estudis en aquelles sondes que estaven anotades en la zona promotora de gens (definida com aquella regió que va des de -2000pb fins a +500pb de lloc d'inici de la transcripció, en anglès TSS). Vam veure que hi havia 1213 zones promotores de gens més metilades i 352 zones promotores de gens menys metilades en els pacients respecte els controls sans.

Finalment, per conèixer millor si la regió de més metilació en els pacients amb SMD d'alt risc i LAMs estava associada amb algun procés biològic, vam realitzar anàlisi de *Gene Ontology* (GO) dels 109 promotors de gens que tenien 4 o més sondes més metilades en la seva zona promotora i vam veure que hi havia un increment en el nombre de gens implicats en processos metabòlics de la cèl·lula, com ara proteïnes de fosforilació.

Després vam generar un altre anàlisi de GO dels 5 promotors de gens que tenien 4 o més sondes menys metilades en els SMD i LAMs en comparació amb els controls, però en aquest cas no vam poder determinar cap relació entre ells.

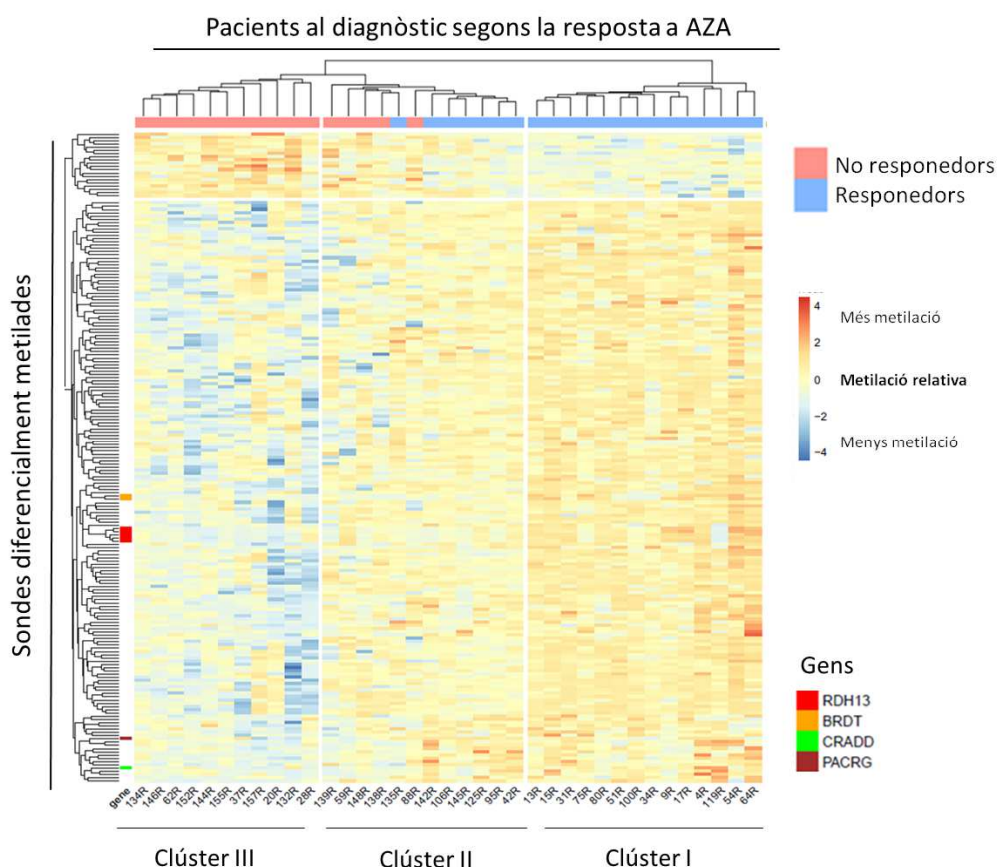
#### **2.4- Diferent signatura de metilació al diagnòstic segons el tipus de resposta a AZA**

Tot i que l'estudi clínic (CETLAM SMD-09) era un estudi prospectiu, quan vam fer l'anàlisi dels perfils de metilació, disposàvem de les dades de resposta al tractament de 68 pacients dels 73 dels quals teníem mostra al diagnòstic (Taula 20)

**Taula 20.** Classificació de les mostres al diagnòstic segons la resposta al tractament.

	Responedor	No-responedor
Azacitidina	21	16
Altres tractaments	21	10

Així doncs, vam poder analitzar l'impacte del tipus de resposta en el perfil global de metilació al diagnòstic. Primer de tot, vam buscar diferències en el perfil de metilació dels pacients que havien rebut AZA (n=37) en funció del grau de resposta al tractament. Degut a que l'estudi de metilació global no va donar cap resultat conclouent, es va utilitzar la tècnica del “*combined rank*” i analitzant les 200 primeres sondes de la classificació, vam poder identificar una signatura de metilació, que ens permetia diferenciar entre els pacients que havien respost al tractament amb AZA (n=21) d'aquells que no havien respost (n=16) (Figura 27), teníem un pacient que va fer resposta al tractament, però del qual no disposàvem de la mostra al diagnòstic. Segons aquestes 200 sondes es podien classificar els pacients en dos grans clústers. El clúster I incloïa exclusivament pacients responedors. El segon gran clúster es podia subdividir en dos clústers més petits, el clúster II i el clúster III. El clúster II era un combinat que contenia pacients responedors o no a AZA, mentre que el clúster III incloïa només pacients no-responedors.



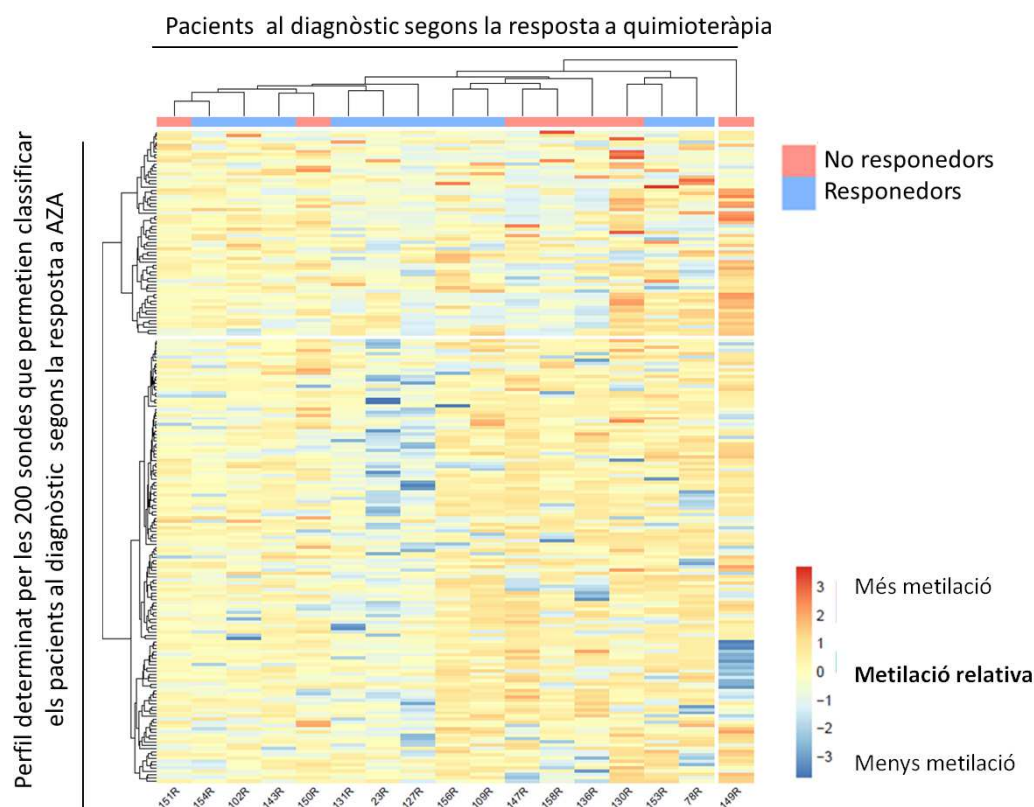
**Figura 27.** Una signatura de metilació al diagnòstic obtinguda a partir de la tècnica del *combined rank* prediu la resposta a azacitidina. Hetmap que representa la clusterització jerarquitzada de les 200 sondes diferencialment metilades al diagnòstic entre els dos grups (responedors versus no responedors al tractament amb AZA)



Per entendre millor les diferències entre responedors i no-responedors, ens vam centrar en aquelles sondes que estaven localitzades en el promotor. D'aquestes 200 sondes només 61 sondes afectaven a zones promotores de gens. D'aquestes 61 sondes hi havia 58 que es trobaven més metilades en els pacients responedors mentre que només 3 sondes estaven menys metilades en els responedors. Tot i que les diferències entre la majoria de les sondes no tenien prou significància (el promig de metilació diferencial entre els dos grups cobria un rang entre 0.009 fins a 0.226), ens vam centrar en aquelles que la diferència era superior a 0.2. Aquestes sondes afectaven a 4 gens: *CRADD*, *RDH13*, *BRDT* i *PACRG*. Només la sonda en la zona promotora del gen *PACRG* estava hipermetilada (metilació mitja= 0.759) en els pacients que havien respost mentre que els pacients que no responien tenien aquesta sonda amb un grau de metilació normal (metilació mitja=0.5332). Els altres tres gens (*CRADD*, *RDH13* i *BRDT*) es trobaven amb una metilació normal en els responedors (metilació mitja= 0.473) i hipometilada en els no responedors (metilació mitja= 0.2666).

Per altra banda, cal remarcar, que de les 61 sondes que vam analitzar només hi havia 5 gens (*BRDT*, *C4BPB*, *CYTH4*, *RDH13* i *SH3TC1*) que tenien més d'una sonda diferencialment metilada entre el dos grups dins la regió promotora, i això els feia d'especial interès per a ser analitzats amb més detall. El gen que ens va cridar més l'atenció va ser *RDH13*, ja que tenia 5 sondes en la seva zona promotora, i totes elles es trobaven menys metilades en els pacients no-responedors a AZA (metilació mitja=0.3644) respecte als pacients responedors (metilació mitja=0.5564).

Ja que disposàvem d'una branca de la cohort que no havia rebut cap tractament hipometilant, vam voler comprovar que la signatura que havíem identificat en els pacients responedors a AZA no es mantenia per classificar els pacients que rebien tractament quimioteràpic. Teníem mostra al diagnòstic de 17 pacients que van fer tractament amb l'esquema ICE, 10 van respondre al tractament, i 7 no van respondre. En aquest cas l'anàlisi de les 200 sondes definides pel *combined rank* a l'estudi anterior no van ser d'utilitat per a classificar els pacients que havien rebut quimioteràpia (Figura 28). Fet que reforça la nostra hipòtesi de que els gens anteriors es podrien utilitzar per predir la resposta al tractament hipometilant (AZA).



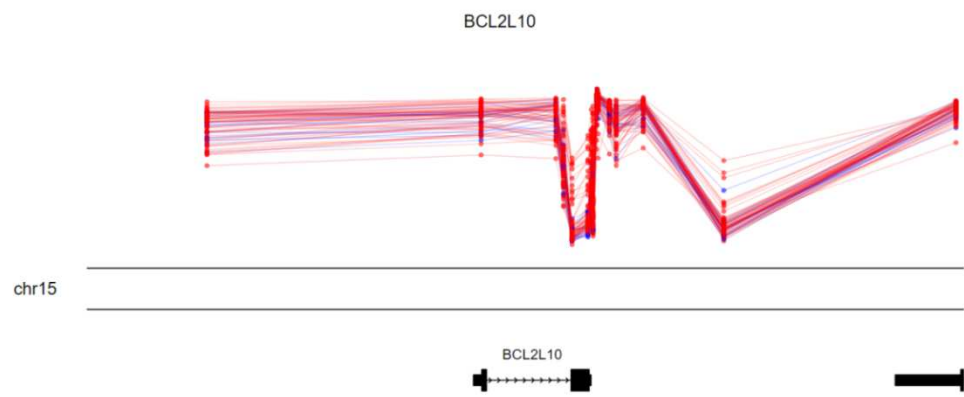
**Figura 28.** La signatura de metilació que predeia al diagnòstic la resposta a azacitidina no serveix per predir la resposta a la quimioteràpia. Heatmap de les mateixes 200 sondes definides pel *combined rank* que no permet distingir al diagnòstic quins pacients respondran a la quimioteràpia.

## 2.5- Valor pronòstic de la metilació de l'ADN en gens específics

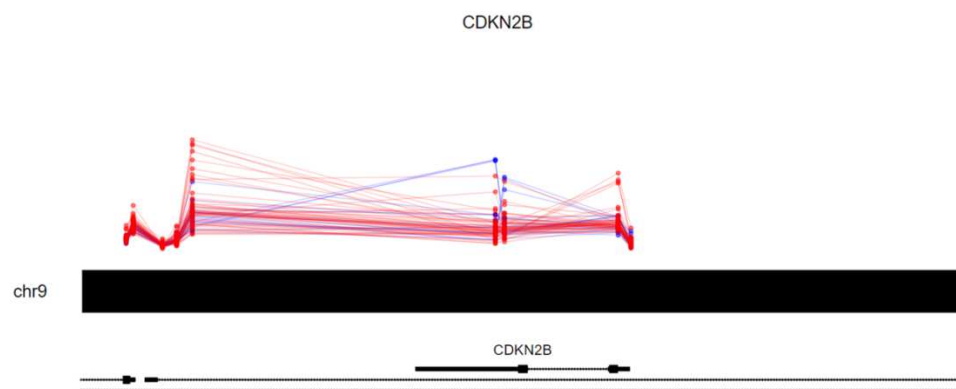
Degut a que la realització d'estudis de metilació global del genoma té una limitada aplicabilitat a la pràctica assistencial, vam voler veure quin era l'estat de metilació d'una sèrie de gens que havien estat reportats prèviament a la literatura amb impacte en la supervivència i/o resposta al tractament (*BCL2L10*, *CDKN2B* i *TP53*)(147–149) per estudiar-los amb més detall.

A la nostra cohort de pacients, l'anàlisi d'aquests tres gens de manera específica no va mostrar cap patró de metilació diferencial entre els respondors i els no-respondors (Figura 29). Només quan ens centràvem amb el gen *TP53* detectàvem una petita regió que semblava estar diferencialment metilada entre els dos grups, però el nombre de pacients en cada cohort va ser massa limitat com per a permetre'ns treure cap conclusió ferma.

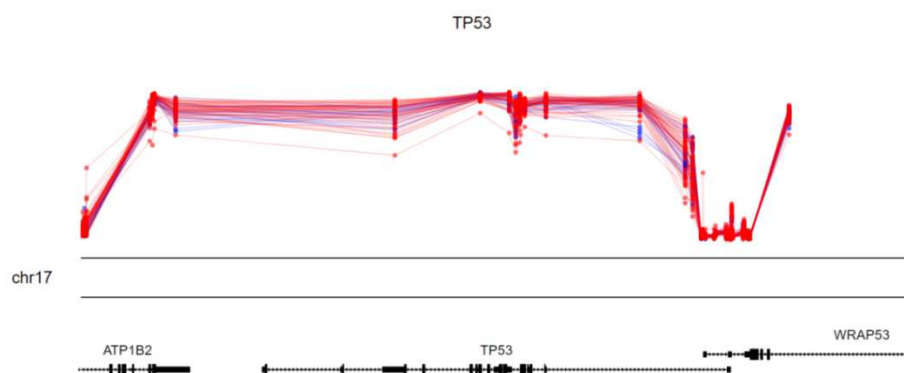
A)



B)



C)

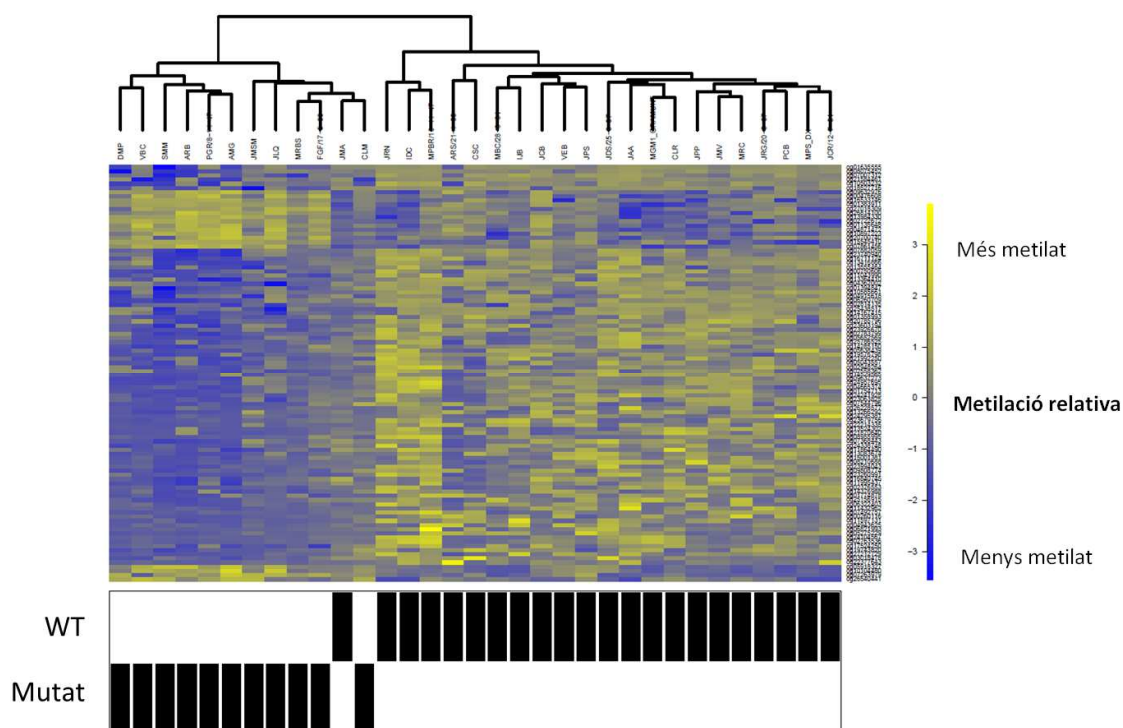


**Figura 29.** Estat de metilació de les sondes a estudi segons el tipus de resposta (Vermell= pacients responedors; blau= pacients NO responedors). A) Sondes del gen *BCL2L10*. B) Sondes del gen *CDKN2B*. C) Sondes del gen *TP53*.

## 2.6- Impacte de les mutacions en gens que afecten a la metilació de l'ADN al diagnòstic de la malaltia

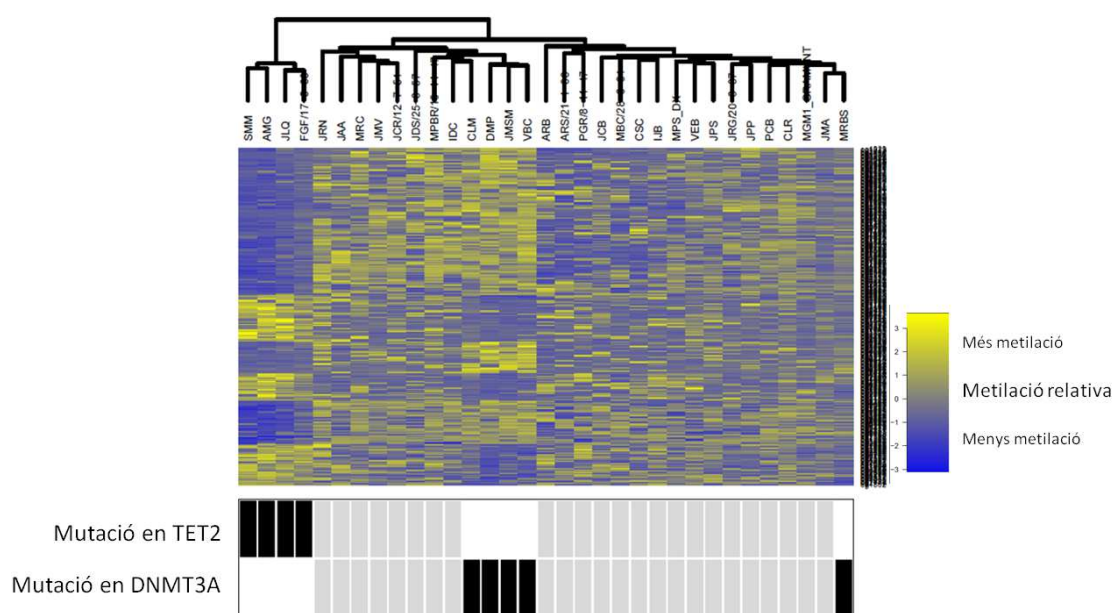
Cada vegada hi ha més evidències que suggereixen un paper important de les mutacions en gens que afecten a la metilació de l'ADN, en la resposta als agents hipometilants. Tot i així hi ha resultats discrepants, i per aquesta raó, vam voler explorar la correlació entre mutacions i perfil de metilació de l'ADN ja que teníem l'estat mutacional de 33 pacients (26 SMD i 7 LAM)(150) que també estaven inclosos a l'estudi de metilació.

D'aquests 33 pacients, onze tenien mutacions en algun gen implicat en la metilació de l'ADN (*DNMT3A*, n=5; *TET2*, n=4; *DNMT3A* i *TET2* alhora, n=1; i *IDH2*, n=1). Al comparar el perfil de metilació mitjançant el *combined rank* d'aquests onze pacients respecte els altres 22 que no presentaven mutacions en cap d'aquests tres gens vam trobar un conjunt de sondes que permetia distingir els pacients mutats dels pacients *wild-type* (Figura 30).



**Figura 30.** Una signatura de metilació al diagnòstic obtinguda a partir de la tècnica del *combined rank* prediu la presència de mutacions en gens que afecten la metilació (*DNMT3A*, *TET2* i *IDH1/2*). Heatmap que representa la clusterització jerarquitzada de les sondes diferencialment metilades de les mostres al diagnòstic que permeten distingir els pacients mutats per *DNMT3A*, *TET2* i *IDH1/2* respecte els pacients *wild-type*.

Un cop vist aquest perfil diferencial, ens vam preguntar si hi hauria unes sondes que ens podrien ajudar a separar per tipus de mutació, ja que a nivell teòric, les mutacions de pèrdua de funció de *DNMT3A* haurien de comportar una disminució de la metilació, mentre que les mutacions de pèrdua de funció de *TET2* haurien d'inhibir la desmetilació i comportar un increment de la metilació global. En aquesta part de l'estudi no vam incloure les mutacions de *IDH1/2* ja que només teníem un pacient que presentés mutació en *IDH2*. Tampoc vam tenir en compte el pacient que presentava tant mutació en *DNMT3A* com en *TET2*, ja que al tenir funcions oposades no sabíem com podria influir en el perfil de metilació. Utilitzant la mateixa tècnica d'abans, el *combined rank*, vam poder determinar una sèrie de sondes que permetien distingir els pacients que presentaven mutacions en *TET2* dels pacients que presentaven mutacions en *DNMT3A* (Figura 31). Tot i així, el perfil que vam obtenir semblava no anar en concordança amb la nostra hipòtesi, ja que la majoria de les sondes diferencialment metilades entre els dos grups es trobaven menys metilades en pacients amb mutacions en *TET2*.



**Figura 31.** Una signatura de metilació al diagnòstic obtinguda a partir de la tècnica del *combined rank* permet distingir els pacients mutats per *DNMT3A* respecte els pacients amb mutació en *TET2*. Heatmap que representa la clusterització jerarquizada de les sondes diferencialment metilades de les mostres al diagnòstic que permeten distingir els pacients mutats en *TET2* respecte els pacients amb mutació en *DNMT3A*.

Per entendre millor les diferències dels perfils de metilació entre els pacients amb mutació en *TET2* i els pacients amb mutació en *DNMT3A*, ens vam centrar en aquelles sondes que estaven localitzades en zona promotora. De les 200 sondes seleccionades per la tècnica del *combined*

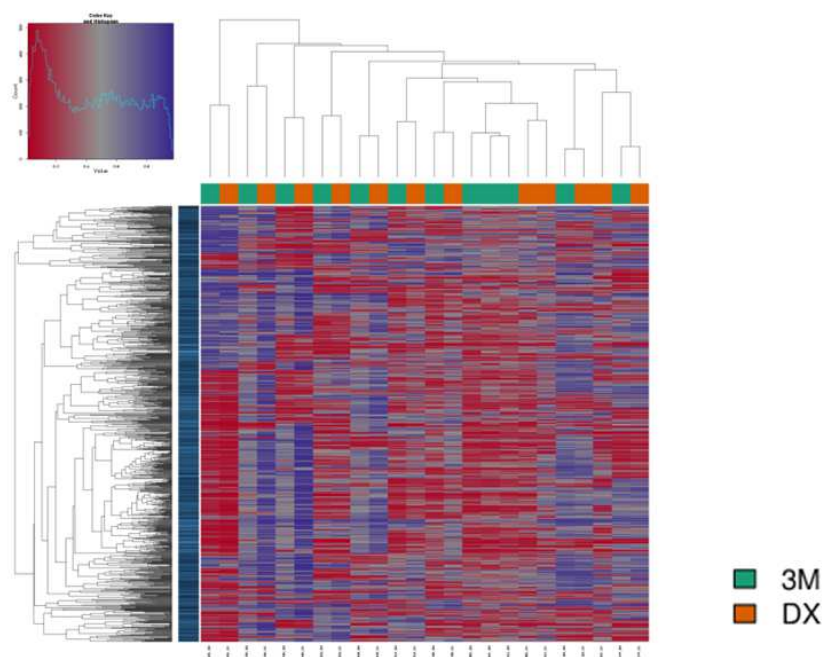
*rank*, es van identificar un total de 85 sondes localitzades en regions promotores de 69 gens. Hi havia 6 gens que tenien més d'una sonda (*CALD1*, *HOXA2*, *KCTD14*, *PCDHGC4*, *SHANK2* i *ZNF518B*), i totes elles presentaven una diferència de metilació superior a 0.2 (mean diff>0.2) entre els dos grups. Només les sondes de la zona promotora del gen *ZNF518B* es trobaven hipometilades en els pacients amb mutacions en *DNMT3A* (metilació mitja=0.164, rang 0.061-0.206) mentre que els pacients amb mutació en *TET2* aquestes sondes tenien un grau de metilació més estàndard (metilació mitja=0.4175, rang 0.343-0.492). Per altra banda, les sondes localitzades en zona promotora dels gens *CALD1*, *HOXA2*, *KCTD14*, *PCDHGC4* i *SHANK2* es trobaven hipometilades en els pacients amb mutacions en *TET2*. Per tant, el gen *ZNF518B* podria ser un gen interessant a estudi, ja que compleix la nostra hipòtesi que les mutacions de *DNMT3A* comportarien una disminució de la metilació, mentre que les mutacions en *TET2* provocarien un augment de la metilació.

Per entendre millor el mecanisme de canvis en la metilació segons les mutacions, vam realitzar un anàlisi de GO d'aquests gens. No vam poder determinar cap associació de gens pel que fa a la funció molecular, processos biològics, components cel·lulars ni vies de senyalització.

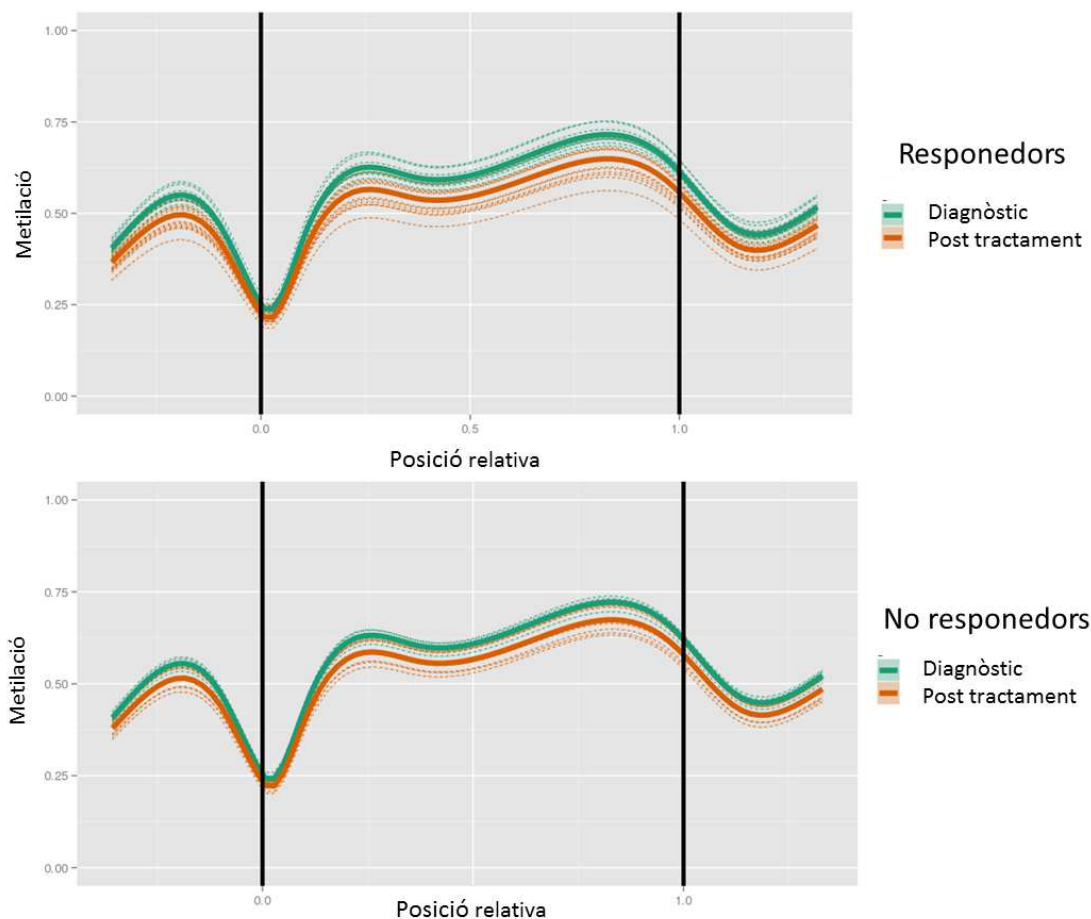
## 2.7- Estudis de metilació global en les mostres de seguiment

Finalment vam realitzar un anàlisi de clusterització no supervisat dels perfils de metilació global amb les mostres de seguiment i vam detectar que les mostres clusteritzaven amb si mateixes més que per la categoria citològica o pel tipus de resposta al tractament (Figura 32). És a dir, la mostra de seguiment d'un pacient s'agrupa amb la del diagnòstic de cada pacient més que per qualsevol altre motiu.

De totes maneres, vam poder observar una disminució a nivell de la metilació global en les mostres de seguiment després del tractament amb AZA. Tot i així, aquesta desmetilació global del genoma es podia detectar tant en els pacients responedors (n=21) com en els no responedors (n=16) (Figura 33) al tractament, però no s'observava en els pacients que havien rebut ICE sense cap tanda d'agent desmetilant (n=17), demostrant la capacitat demetiladora del tractament amb AZA. A nivell de metilació global (valors  $\beta$  globals) no vam poder observar un major desmetilació en els pacients responedors comparat amb els no responedors.



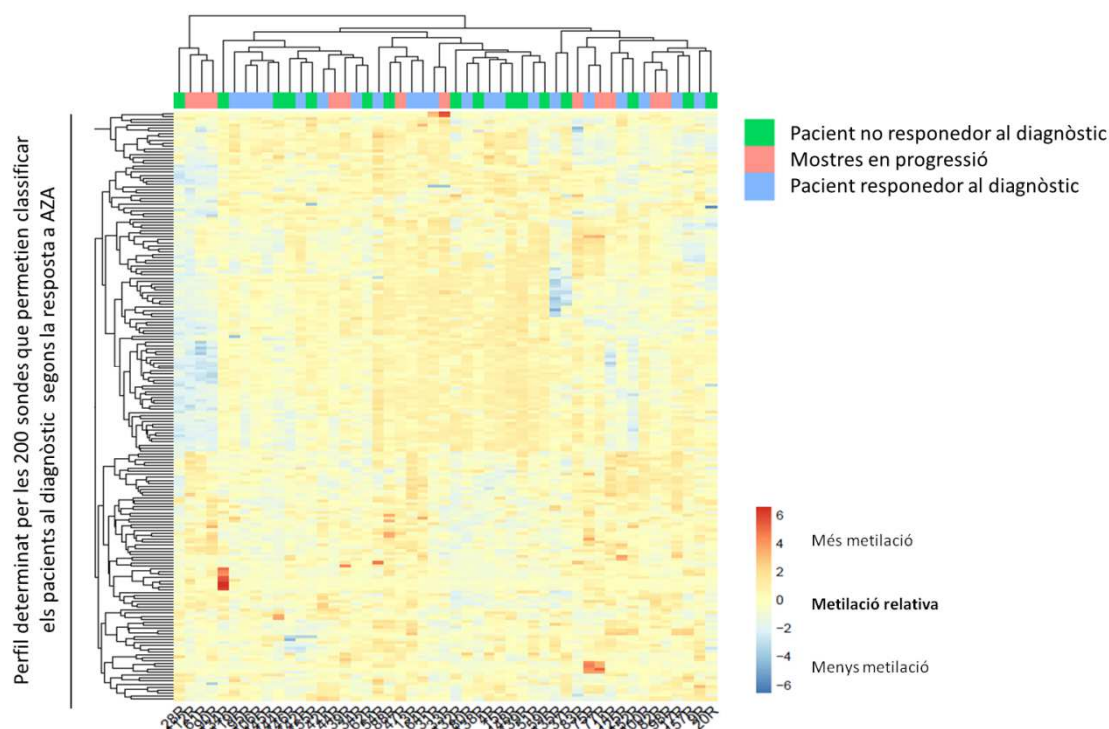
**Figura 32.** Comparació de la metilació global de 12 mostres al diagnòstic (DX) i 12 mostres després de tres mesos (3M) de tractament amb AZA. L'estat de metilació global s'associa per pacient no pas per diagnòstics versus tractats, demostrant la força que té la identitat del pacient.



**Figura 33:** Perfils similars de desmetilació global del genoma després del tractament amb AZA tant en pacients respondors com en pacients no respondors.

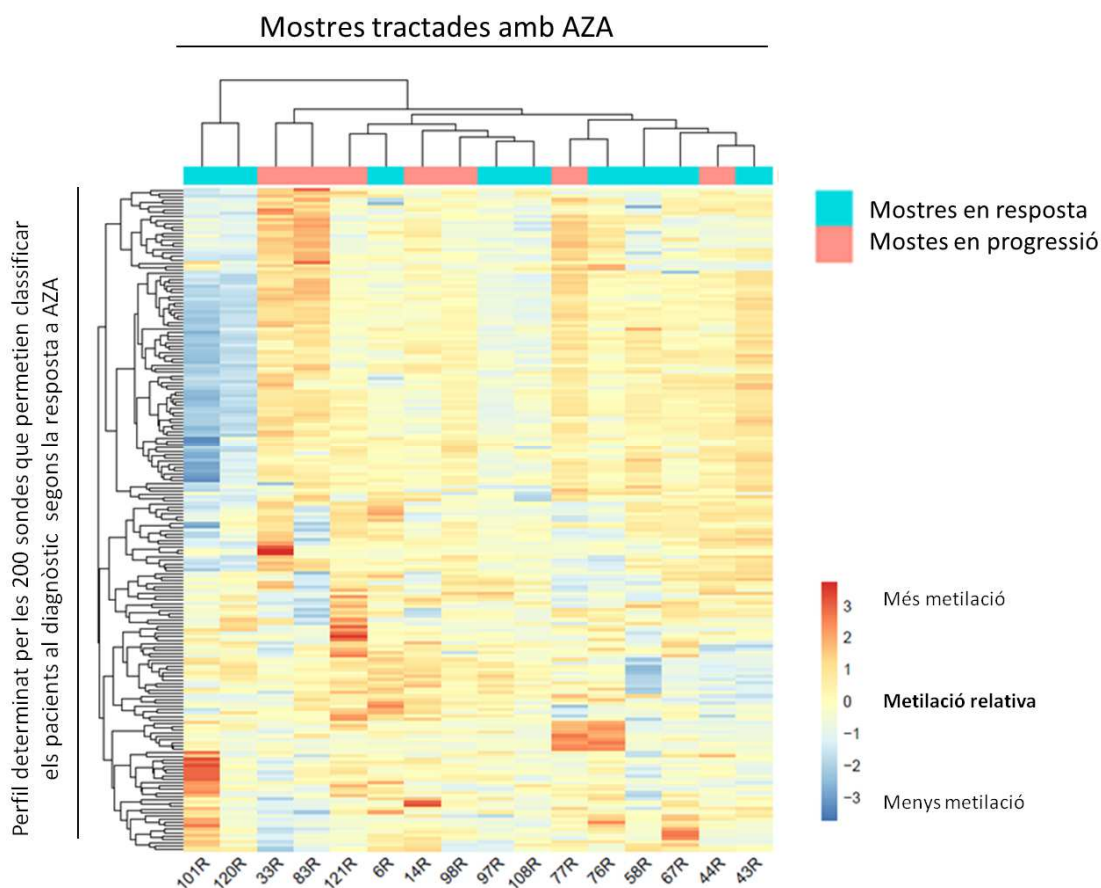
Ens vam centrar en comparar els perfils de metilació de les mostres que estaven en progressió (n=12) respecte les mostres al diagnòstic, per veure si en aquell moment, els perfils de metilació s'assemblaven més al perfil detectat al diagnòstic dels no respondors (n=16) o, per altra banda, seguia més similar al perfil dels respondors (n=21) (Figura 34). No vam poder demostrar la nostra hipòtesi que a la recaiguda o progressió el perfil de metilació tornava a estadis més similars a aquells descrits al diagnòstic per als pacients no respondors.





**Figura 34.** El perfil de metilació definit al diagnòstic que permetia diferenciar quins pacients respondrien al tractament amb azacitidina no és útil per predir els pacients que progressaran. Heatmap on es representa la clusterització jerarquitzada de les 200 sondes utilitzant la tècnica del *combined rank*, segons el perfil de resposta en pacients en progressió (n=12) en comparació amb els responedors (n=21) i els pacients no responedors (n=16) al diagnòstic.

Finalment, també vam explorar les diferències entre els pacients responedors que havien rebut com a mínim 6 cicles d'AZA i estaven en resposta (n=9), i els pacients que havent respost en algun moment havien progressat a LAMs (n=7) (Figura 35). El perfil de metilació dels pacients responedors que després van progressar, es mantenia més similar al del grup dels responedors. Vam poder veure que el perfil de metilació que vam definir al diagnòstic i ens ajudava a distingir entre els pacients responedors i no responedors a AZA, no era útil per a les mostres que havien estat tractades, és dir, els pacients en seguiment.



**Figura 35.** El perfil de metilació definit al diagnòstic que permetia diferenciar quins pacients respondrien al tractament amb azacitidina no és útil per classificar les mostres post-tractament. Heatmap on es representa la clusterització jerarquizada de les 200 sondes, utilitzant la tècnica del *combined rank*, de les mostres en resposta després de 6 cicles d’AZA (n=9) i les mostres en progressió (n=7).

## **10. DISCUSSION**

La caracterització genètica de les neoplàsies hematològiques és important no només per a entendre la biologia d'aquestes malalties si no també des d'un punt de vista clínic per a definir millor el diagnòstic, pronòstic i seleccionar el tractament de la forma més personalitzada possible.

Les SMD són un conjunt heterogeni de malalties clonals de les cèl·lules progenitores hematopoètiques. Tradicionalment s'havien considerat les neoplàsies com el resultat d'alteracions cromosòmiques, numèriques i/o estructurals que indueixen mutacions en gens, que permeten tant l'activació d'oncogens com la inactivació de gens supressors de tumors (151). Per altra banda, noves evidències van demostrar que almenys en part, el fenotip tumoral i el comportament biològic diferenciat que tenen les cèl·lules tumorals es deu a la presència de canvis heretables en les formes d'expressió gènica que succeeixen sense que es donin canvis en la seqüència primària dels nucleòtids. Aquesta regulació de l'activitat transcripcional és el resultat d'una reorganització de l'estructura tridimensional de la cromatina, que modula la seva accessibilitat a factors de transcripció i proteïnes implicats en els processos d'expressió gènica, i és el que es coneix com epigenètica (98).

La primera part del treball es centra en caracteritzar genèticament un grup de pacients amb SMD i LAMs que han estat tractats homogèniament amb fàrmacs hipometilants. Tot i que tota la cohort analitzada en aquesta tesi està formada per pacients d'alt risc (segons IPSS o IPSS-R), hem pogut observar que determinats marcadors moleculars són capaços de subclassificar els pacients en diferents grups pronòstics. Per tant, creiem que la detecció d'anomalies genètiques en aquest grup de pacients, amb comportament clínic heterogeni, pot ser d'utilitat a nivell pronòstic. D'acord amb nombrosos estudis i com també nosaltres definim en el primer treball, en les SMD un alt percentatge dels pacients presenta mutacions somàtiques en reguladors epigenètics (44). És per això que el segon treball aborda la malaltia des del punt de vista epigenètic, estudiant els perfils de metilació de l'ADN dels pacients al diagnòstic i durant el tractament. Creiem que l'estudi d'aquest mecanisme epigenètic pot contribuir a la detecció de gens i vies de senyalització implicats en la malaltia, així com ajudar a identificar nous marcadors pronòstics i de resposta al tractament.

## 1. Utilització de tècniques moleculars en l'estudi de les SMD

El diagnòstic de les SMD inclou una revisió citomorfològica de la MO i de la SP, així com un estudi citogenètic en MO. Tot i que l'ús de tècniques moleculars pel diagnòstic de les SMD no és un criteri imprescindible en les guies de diagnòstic de les SMD (122), en l'última revisió de l'OMS s'aborda la importància d'acumular informació genètica pel diagnòstic i classificació de les SMD (3,6). Ara per ara, l'únic marcador molecular utilitzat per a la classificació de les SMD al diagnòstic és la mutació del gen *SF3B1* en els pacients amb SMD i presència d'entre 5-14% de sideroblasts en anell. Però, l'aplicació dels marcadors moleculars van més enllà del diagnòstic (marcador de clonalitat) ja que, la presència de determinades anomalies genètiques s'associen a un valor pronòstic pels pacients. Per exemple, l'OMS recomana avaluar l'estat mutacional de *TP53* en aquells pacients amb SMD i del(5q) per ajudar a identificar un subgrup amb pronòstic advers dins aquesta entitat de generalment bon pronòstic (3,6). Les tècniques més utilitzades per a la detecció de guanys o pèrdues de material genètic i de mutacions són la citogenètica convencional i la seqüenciació Sanger, respectivament. Tot i així, altres tècniques més novadores com els *microarrays* o la seqüenciació massiva s'han aplicat en múltiples estudis per a detectar aquestes mateixes alteracions amb una major sensibilitat.

## 2. Seqüenciació massiva dirigida

Les SMD són una malaltia heterogènia, i també ho són les alteracions genètiques més rellevants que poden presentar, ja que inclouen guanys i pèrdues de regions cromosòmiques, mutacions i modificacions epigenètiques (70,101,152). En els últims anys, les tècniques de seqüenciació massiva han revolucionat els estudis de les malalties hematològiques, ja que han permès caracteritzar l'estat mutacional d'aquestes entitats. Si ens centrem en les SMD, la seqüenciació de gens mitjançant panells dirigits ha identificat un panorama mutacional concret que afecta gens implicats en patologia mieloide que codifiquen per proteïnes de transducció de senyals (*NRAS*, *FLT3*, *CBL*, *JAK2*, *KIT*), factors de transcripció (*RUNX1*, *ETV6*), gens supressors tumorals (*TP53*, *WT1*), modificadors epigenètics (*TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *DNMT3A*), relacionat amb la maquinària d'*splicing* de l'ARN (*SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*) i components del complex de cohesines (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3*, *SMC1A*)(29,67,70,101,153,154). Tot i així, hi ha un 10-20% dels pacients amb SMD on no s'han detectat mutacions en aquests gens.

## 2.1 Incidència i caracterització del tipus de mutacions

En la nostra sèrie de pacients, utilitzant un panell de 83 gens relacionats amb l'estirp mieloide, hem estat capaços de detectar mutacions en el 95% dels pacients amb SMD d'alt risc i LAMs. Aquest percentatge és més elevat que el detectat per altres grups que també han analitzat pacients amb SMD, possiblement degut a que els nostres pacients són d'alt risc i donaria suport a la idea que ens els estadis avançats de la malaltia hi ha major complexitat genòmica. Només 5 gens (*TP53*, *DNMT3A*, *SRSF2* i *U2AF1*) estaven presents en més del 10% dels pacients de la nostra cohort. Vam trobar mutacions en 30 gens més (Taula 12), però en una freqüència molt més baixa i no vam detectar cap mutació en la resta dels gens estudiats (n=48) (Taula 12). Els nostres resultats corroboren l'heterogeneïtat mutacional que ha estat descrita en les SMD per altres autors. També és cert que molts grups no utilitzen teixit control quan fan estudis de NGS, molt possiblement degut a l'encariment que això suposa pel projecte, però nosaltres hem pogut demostrar la utilitat per a poder discriminar variants germinals respecte variants somàtiques. En el nostre estudi, gràcies a la disponibilitat de cèl·lules CD3+ com a teixit control, hem estat capaços de descartar una mitja de dues variables per mostra que no havien estat descrites com a polimorfismes en bases de dades poblacionals i que si no haguéssim disposat de teixit control les haguéssim hagut de classificar com de significat incert. Per tant, hauríem incrementat de forma errònia el nombre de mutacions detectades per pacient.

A nivell de gens en concret, està descrit que en les SMD el percentatge de mutacions de *TP53* és aproximadament del 20% (155), però en la nostra sèrie aquest percentatge augmenta fins a prop del 50%. Això es podria explicar perquè en la nostra cohort només hi ha SMD d'alt risc i LAMs, les quals s'associen a cariotips complexes (46% de la nostra sèrie) i és ben conegut que les mutacions de *TP53* són freqüents en pacients d'aquestes característiques citogenètiques (79,156). Una altra explicació podria ser que el nombre de pacients inclosos en la nostra sèrie hagi pogut influenciar en aquest percentatge, simplement per atzar.

## 2.2 Impacte de les mutacions en el pronòstic de la malaltia

Malgrat els avenços significatius que s'han donat en els últims anys gràcies a les tècniques de seqüenciació massiva i la millora en les tècniques bioinformàtiques, la traducció d'aquestes dades en informació útil per a la pràctica clínica continua sent un repte (157). Tot i així, diversos grups estan treballant en la incorporació de dades moleculars als índexs pronòstics en

pacients amb SMD (29,40,158,159). Com que les mutacions de *TP53* s'han associat en múltiples estudis amb una disminució de la supervivència global i a altes taxes de transformació a LAM (33,67) sembla ser un bon candidat per a ser incorporat a aquests sistemes de puntuació pronòstica. Nosaltres també hem corroborat aquesta dada en el nostre estudi, ja que les mutacions de *TP53* són l'únic marcador que mantenia el seu significat pronòstic en l'anàlisi multivariant per a la supervivència lliure de progressió i una tendència per a la supervivència global.

Les mutacions de *TP53* també s'han associat a una pitjor supervivència global després del trasplantament al·logènic (50,76). En concordança amb aquests estudis, i tot i que a la nostra sèrie només hi havia 5 pacients trasplantats, els tres pacients que tenien mutacions en *TP53* van ser èxits en menys d'un any després del diagnòstic de SMD tot i haver estat trasplantats, mentre que els dos pacients sense alteracions en *TP53* seguien vius més de tres anys després del diagnòstic. Molt recentment, Bernard i col·laboradors han publicat un article on demostren que una mutació de *TP53* per si sola, no comporta un pitjor pronòstic sinó que seria necessari la presència de mutacions bial·lèliques en aquest gen (o en el seu defecte una mutació i una deleció o pèrdua d'heterozigotisme de *TP53*) per a tenir un impacte en la supervivència i en el risc de transformació (160). En el nostre estudi no hem pogut analitzar l'impacte de les mutacions bial·lèliques ja que el projecte ja estava tancat quan s'ha publicat aquest estudi i haguéssim necessitat realitzar estudis de *SNP arrays* en aquelles mostres que tenien una mutació en *TP53* i per citogenètica no presentaven una monosomia del cromosoma 17 o una pèrdua del braç llarg del cr17 (17p), per poder acabar de caracteritzar l'estat d'aquest gen.

Per altra banda, està ben establert que les mutacions en gens que afecten al spliceosoma, com ara *SRSF2*, *SF3B1* o *U2AF1*, són mútuament excloents entre ells, però solen coexistir amb mutacions en modificadors epigenètics, que cooperen per donar els fenotip de SMD (161). En la nostra cohort hem vist aquesta associació entre els gens *SRSF2* i *TET2*. El paper de les mutacions de *SRSF2* en les SMD no està ben conegut, ja que hi ha estudis en els que aquestes mutacions s'associen a pitjor SG i una alta taxa de transformació a LAM (37), mentre que altres grups observen que les mutacions de *SRSF2* no tenen impacte en la SG (40). En la nostra cohort les mutacions de *SRSF2* van ser una variable independent per a una millor SG i SLP en l'anàlisi univariant i juntament amb l'estat mutacional de *TP53* ens permetia estratificar els pacients en tres grups de risc, sent el de millor pronòstic aquells pacients *SRSF2* mutat/*TP53* wild-type i el de pitjor pronòstic *SRSF2* wild-type/*TP53* mutada (Figura 24). Tot i així, aquests resultats s'han d'analitzar amb precaució, ja que en la nostra sèrie 4 dels 7 pacients amb mutació en *SRSF2* presentaven també mutacions en *TET2* (les quals han estat definides com un factor de

resposta a agents hipometilats, particularment quan *ASXL1* no es troba mutat(49)) i cap d'aquests quatre pacients presentava mutacions en *ASXL1*. Si tenim en compte el nombre limitat de pacients amb mutacions de *SRSF2* en el nostre estudi, el bon pronòstic de les mutacions de *SRSF2* s'hauria de confirmar en una cohort més gran de pacients amb SMD d'alt risc.

També hi ha estudis que han demostrat una correlació entre un major nombre de mutacions oncogèniques i un pitjor pronòstic del pacient (70,159). En la nostra cohort no hem pogut demostrar aquesta correlació, possiblement degut a l'elevada proporció de pacients amb mutació de *TP53*, que ja per si sola conferia un pitjor pronòstic al pacient.

## 2.3 Impacte de les mutacions durant l'evolució de la malaltia

Respecte l'arquitectura de les SMD, s'ha descrit que la majoria de casos amb SMD són clonalment heterogenis, amb una clona fundacional i múltiples subclones addicionals. Gràcies a la utilització de tècniques de seqüenciació massiva ha estat possible trobar mutacions *driver* involucrades en l'evolució clonal de la malaltia (29,70,162). Les mutacions *driver* es defineixen com mutacions en la cèl·lula mare hematopoètica immadura amb capacitat d'autorenovació, que típicament implica un gen que afecta al *splicing* de l'ARN o a la metilació de l'ADN, fet que proporciona una avantatge selectiva i determina l'expansió clonal (33,70).

Per dilucidar el rol diferencial de les mutacions en les SMD, vam investigar la dinàmica clonal mitjançant la seqüenciació de panells dirigits en 11 pacients al diagnòstic, en resposta i a la progressió. La majoria de mutacions que vam trobar al diagnòstic era en gens que controlen el cicle cel·lular (*TP53*), implicats en la metilació de l'ADN (*DNMT3A*) i en la maquinària d'*splicing* de l'ARN (*SRSF2*). El nombre mig de mutacions gèniques en pacient amb SMD acostuma a ser més elevat en els subtipus d'alt risc, donant suport a la idea que algunes cèl·lules mare tenen capacitat de proliferar a través de l'acumulació de mutacions, donant lloc a l'expansió clonal i a la progressió de la malaltia (33). En el moment de la progressió, la majoria de pacients de la nostra cohort experimentaven un increment en el nombre de mutacions, en la seva diversitat i en la mida de les clones, amb alteracions freqüentment trobades en les clones dominants amb i sense esborrament de les clones prèvies. S'ha descrit que la presència de noves mutacions *driver*, encara que siguin en subclones, poden tenir implicacions rellevants pel futur de l'evolució de la malaltia. En la nostra cohort vam observar dos pacients que presentaven un



augment del nombre de mutacions tot i haver assolit una millora hematològica, i aquests pacients progressaven d'una manera més ràpida que els altres. Estudiar l'evolució de les mutacions durant el seguiment del pacient ens permetria identificar pacients en els quals la seva malaltia evolucionarà de manera més ràpid, inclús abans de que apareguin els símptomes.

## 2.4 Impacte de les mutacions en la resposta al tractament

Tot i que hi ha diversos estudis que correlacionen l'estat mutacional de diversos gens amb la resposta al tractament (49,83,84,163,164), nosaltres no hem pogut demostrar aquest impacte dins la nostra cohort. Aquest fet es pot explicar pel nombre limitat de pacients avaluable per la resposta al tractament o degut a diferències entre el disseny dels estudis.

En resum, tot i que som conscients que comparat amb altres estudis, la nostra sèrie és limitada pel nombre de mostres analitzades, tenim però, una de les cohorts millor estudiades d'un subtipus concret de SMD tractat homogèniament, en la qual l'ADN de les cèl·lules CD3+ ha estat utilitzat com a teixit control per a descartar els polimorfismes no descrits en bases de dades poblacionals que podrien ser classificats com a variants de significat incert. Les nostres troballes corroboren l'alta incidència de les mutacions de *TP53* en les SMD d'alt risc, que els marcadors moleculars com *TP53* i *SRSF2* proporcionen informació pronòstica addicional i permeten orientar millor les decisions clíniques en les SMD d'alt risc i que a més a més l'ús de tècniques d'anàlisi de mutacions durant el seguiment pot ajudar a identificar pacients que progressaran abans de que apareguin els primers símptomes de la progressió de la malaltia.

Tots aquests fets posen èmfasi en la importància d'introduir dades genètiques en els models pronòstics per a poder estratificar millor els pacients al diagnòstic. Tot i això, es necessiten estudis en cohorts més grans de pacients que estiguin tractats de manera homogènia amb AZA per a poder consolidar els nostres resultats.

### 3. Metilació global de l'ADN

La metilació aberrant de l'ADN juga un paper essencial en tot tipus de càncer, incloses les malalties hematològiques com ara les SMD i les LAM. S'ha descrit que els blasts de les SMD tenen altes taxes de mutacions en modificadors epigenètics i presenten patrons de metilació aberrants de l'ADN (96). La metilació dels promotors han demostrat tenir un paper important en la patogènia i progressió de les SMD, però encara no s'ha identificat un marcador clar de metilació que sigui predictiu de la resposta al tractament. En aquest estudi, nosaltres volíem tenir un millor coneixement tant dels perfils de metilació en les mostres de pacients amb SMD d'alt risc i LAMs, com veure quins canvis induïa el tractament amb AZA, per veure si d'aquesta manera podríem identificar algun perfil de metilació predictor de resposta al tractament.

#### 3.1. Alteracions en la metilació de l'ADN en les SMD i LAMs respecte donants sans

A nivell de metilació global hem detectat grans diferències entre els metilomes dels donants sans respecte l'observat en les mostres al diagnòstic dels pacients amb SMD i LAMs. Per altra banda, els nivells de metilació global no van ser d'utilitat per classificar els pacients segons el seu grup citològic (SMD versus LAMs), segons la citogenètica (normal versus alterada) o la resposta al tractament.

#### 3.2. Perfil de metilació al diagnòstic predictor de resposta a AZA

L'efectivitat dels agents hipometilants en les malalties mieloides podria estar associat al fet que centenars de gens estan sovint hipermetilats en les SMD, i que el nivell de la hipermetilació al llarg del genoma està unit a un pitjor pronòstic i altes probabilitats de transformació a LAM, com també de recaiguda en les LAM. Fa uns anys Shen i col·laboradors (165) van descriure que podia ser el descens de la metilació durant el tractament, més que la metilació a nivell basal, el que prediria la resposta a la teràpia amb agents desmetilants. De manera contrària, quan nosaltres vam realitzar l'anàlisi del *combined rank* vam observar un patró de metilació definit per 200 sondes que ens permetia predir quins pacients respondrien a AZA, però no vam veure diferències significatives en la disminució de la metilació durant el tractament entre els pacients responedors al tractament amb AZA (n=21) dels pacients no responedors (n=16) (Figura 27). D'una manera similar, Meldi i col·laboradors (166) van

identificar 167 regions diferencialment metilades (DMRs) en l'ADN basal de pacients amb LMMC que permetia distingir els pacients responedors a decitabina dels que no. També Voso i col·laboradors (148) van descriure que la metilació de *BCL2L10* en el diagnòstic podia predir la resposta a AZA en els pacients amb SMD.

Del nostre estudi al diagnòstic vam observar que hi havia 4 gens (*CRADD*, *RDH13*, *BRDT* i *PACRG*) que estaven diferencialment metilats entre els pacients responedors i no responedors a AZA i això els feia interessants per estudiar-los amb més detall. No hi ha massa informació d'aquests gens associats a les SMD d'alt risc o LAMs, però el gen *RDH13* semblava important, ja que era l'únic gen que presentava cinc sondes diferencialment metilades entre els dos grups. El gen *RDH13* codifica per a una proteïna que és una retinol deshidrogenasa, que actua a la mitocòndria i catalitza la reducció i oxidació dels retinoids. L'enzim que codifica està implicat en la producció de l'àcid retinoic (AR), molt important per la regulació de l'expressió gènica i un modulador de la proliferació i diferenciació de nombrosos teixits (167,168), i també protegeix la mitocòndria contra l'estrès oxidatiu. Els metabòlits implicats en la reacció, els retinoids, són cromòfors implicats en la visió, la regulació transcripcional i la diferenciació cel·lular. El fet que els pacients no responedors a AZA tinguessin la zona promotora del gen *RDH13* menys metilada, semblava indicar que un increment en l'expressió de *RDH13* podria comportar una desregulació específica dels gens regulats per l'àcid retinoic. En absència d'AR, els heterodímers formats per un receptor d'àcid retinoic (RAR) i un receptor X de l'àcid retinoic (RXR) s'unirien a les seqüències diana, conegudes com element de resposta a àcid retinoic (RARE, *retinoic acid-response element*), reclutarien el complex corepressor nuclear (format per histones deacetilases) i inhibirien l'activació de la transcripció, mentre que per altra banda, un excés d'AR comportaria que l'heterodímer RAR/RXR s'uniria a les seqüències diana i reclutarien coactivadors (incloent histones acetiltransferases) activant la transcripció d'aquests gens. Alhora, també semblava interessant el gen *PACRG*, ja que es el seu promotor es trobava hipermetilat en els pacients que responien mentre que els pacients que no responien tenien aquesta sonda amb un grau de metilació normal. El gen *PACRG* codifica per una proteïna que forma un gran complex molecular amb xaperones. Recentment s'ha descrit que la proteïna *PACRG* és també important en la senyalització del factor de necrosi tumoral (TNF). Així doncs, *PACRG* té implicació en la resposta immune, fet que explica l'associació de polimorfismes en aquest gen amb una major susceptibilitat a patògens intracel·lulars (169).

Això comporta que dos dels gens que hem detectat que tenen una signatura de metilació diferencial entre els pacients responedors i els no-responedors a AZA, tenen funció de protecció, ja sigui davant l'estrès oxidatiu (*RDH13*) com davant d'una infecció (*PACRG*). I

aquesta seria una nova via d'estudi, veure com la capacitat de la cèl·lula de fer front a situacions d'estrès, pot estar relacionada amb la capacitat de resposta al tractament. Tot i que som conscients de la mida limitada de la nostra sèrie, i que seria necessària una validació dels resultats en una cohort independent, creiem que aquest perfil podria ser una bona eina per a futurs estudis de metilació dirigits.

Diferents autors han reportat que el nivell de metilació de determinats gens podrien tenir una aplicabilitat en predir la resposta al tractament (95,147,148,170,171). En aquest sentit, Voso MT i col·laboradors (148) va reportar que l'eficàcia de la teràpia epigenètica podia estar influenciada per la inactivació de *TP53* mitjançant metilació. Per altra banda, Fandy TE i col·laboradors (172) van concloure que el fet de revertir la metilació d'alguns gens supressors tumorals (*p15INK4B*, *CDH-1*, *DAPK-1* i *SOCS-1*) durant el primer cicle de teràpia no era predictiu de resposta clínica en combinació amb teràpia epigenètica, mentre que per Tran HTT i col·laboradors (171) l'expressió d'ARNm dels gens *CKN2B*, *IGSF4* i *ESR1* estava significativament disminuïda en les SMD, i que els canvis en la metilació contribuïen a la patogènia de la malaltia i podien servir com a marcador per monitoritzar l'eficàcia al tractament. Quan nosaltres vam analitzar l'estat de metilació d'alguns d'aquests gens que havien estat descrits com a predictors de resposta a agents hipometilants (*BCL2*, *CDKN2B* i *TP53*) en la nostra cohort, no vam ser capaços d'observar diferències entre els pacients responedors i els no responedors. Només en *TP53* vam detectar una petita regió que semblava diferent entre els dos grups, però el nombre de pacients en cada grup era baix i ens impedia arribar a cap conclusió ferma.

### 3.3. Diferències en la metilació en pacients amb diferents característiques moleculares

S'han descrit mutacions somàtiques en reguladors epigenètics en més de la meitat dels pacients amb SMD, entre aquestes s'inclouen gens involucrats amb el manteniment de la metilació de l'ADN (*TET2* i *DNMT3A*)(51,173). També s'ha descrit que mutacions en certs gens poden ser predictors de resposta a agents hipometilants en pacients amb LAM o SMD, per exemple Mediros BC i col·laboradors (174) expliquen en el seu article, que les mutacions en *IDH1* i *IDH2* fan augmentar el 2-hidroxiglutarat (2HG) el qual inhibeix alguns enzims com ara *TET2* i diverses histones metiltransferases, fet que comporta una hipermetilació de les histones de l'ADN, altera l'expressió gènica i bloqueja la diferenciació de les cèl·lules progenitores

hematopoètiques. Tot i que les mutacions de *TET2* comporten una pèrdua de funció del gen, i a priori això prediria un augment de la metilació de les citosines de l'ADN i reduiria els nivells de 5hmC, els estudis sobre els efectes de les mutacions de *TET2* sobre els nivells globals de metilació i 5hmC en l'ADN de pacients han donat resultats conflictius (45,175). Ko i col·laboradors (176) van observar que els pacients amb patologia mieloide i mutacions de *TET2* presentaven nivells baixos de 5hmC en l'ADN genòmic en comparació amb les mostres de controls sans, però a la vegada els pacients amb baixos nivells de 5hmC presentaven una hipometilació relativa en la majoria de les unitats CpG diferencialment metilades respecte les mostres controls. Un altre article conclou que no es detecten canvis en la metilació de les illes CpG en la zona promotora quan comparen pacients amb LMMC amb i sense mutacions en *TET2* (177). Tot i que acaben conclouent que les mutacions en *TET2* provoquen hipermetilació de l'ADN fora de la zona promotora (177,178). També l'article de Figueroa i col·laboradors demostra que les mutacions de *TET2* en pacients amb LAM estan associades a un fenotip hipermetilat (56).

En el nostre estudi, la majoria de les sondes diferencialment metilades entre els pacients que presentaven mutacions en gens que afecten a la metilació (*DNMT3A*, *TET2* i *IDH1/2*) respecte els pacients WT es trobaven menys metilades en els pacients mutats. Després de comparar les diferències de metilació entre pacients en mutació en *DNMT3A* respecte pacients en mutació en *TET2*, vam trobar diverses sondes localitzades en la zona promotora de 6 gens (*CALD1*, *HOXA2*, *KCTD14*, *PCDHGC4*, *SHANK2* i *ZNF518B*) que presentaven una metilació diferencial superior a 0.2 entre els dos grups. De tots aquests gens ens va cridar l'atenció *ZNF518B*, ja que les seves sondes eren les úniques que es trobaven hipometilades en els pacients amb mutació en *DNMT3A* (metilació mitja=0.164, rang 0.061-0.206) mentre que els pacients amb mutació en *TET2* aquestes sondes tenien un grau de metilació més estàndard (metilació mitja=0.4175, rang 0.343-0.492), i això anava en concordança amb la hipòtesi que les mutacions de *DNMT3A* comportarien una disminució de la metilació, mentre que les mutacions en *TET2* provocarien un augment de la metilació. No es té massa informació del gen *ZNF518B*, només que és un gen localitzat al cromosoma 4 i està involucrat en la regulació transcripcional, ja que aquest gen codifica per una proteïna que és un factor de transcripció d'unió a l'ADN i específic d'ARN polimerasa II(179). Així doncs, una hipometilació d'aquest gen comportaria un augment de factors de transcripció que podrien alterar la transcripció d'altres gens.

També s'ha descrit que els pacients amb diferents lesions genètiques poden convergir en un mateix estat de metilació que comparteixen mecanismes patogènics i cursos clínics (180), però en la nostra sèrie no hem pogut correlacionar un perfil de metilació global a cap mutació en

concret. El que sí que hem pogut descriure, són un conjunt de sondes que ens permeten distingir pacients amb mutacions en gens modificadors de la metilació (*DNMT3A* i *TET2*), però que no estaven relacionats amb diferències en la resposta al tractament.

### 3.4. Perfils de metilació durant el tractament

També s'ha descrit que canvis en la metilació de determinats gens contribueixen a la patogènia de la malaltia i poden servir com a marcadors per a monitoritzar l'eficàcia al tractament (171). En el nostre estudi, pel que fa als canvis en la metilació global durant el tractament, vam observar que hi havia un agrupament de les mostres basat més en la identitat del propi pacient que en el grau de resposta al tractament, ja que detectàvem una desmetilació global de l'ADN tant en els pacients que responien al tractament com els que no responien.

El perfil de metilació que vam descriure al diagnòstic que ens servia per diferenciar quins pacients anaven a respondre o no al tractament, no ens va ser útil en les mostres ja tractades (seguiments dels pacients) per predir quins recaurien. Degut a això, la nostra hipòtesis de que a la recaiguda o progressió de la malaltia el perfil de metilació retornava a estadis més similars als observats al diagnòstic en els pacients que no responien al tractament, no es va poder demostrar, i ens fa sospitar que els mecanismes que afecten a les recaiguda/progressió de la malaltia són diferents d'aquells que prediuen resposta al diagnòstic.

La metilació de l'ADN és crucial per a la regulació de l'activitat transcripcional, i els perfils de metilació aberrants de l'ADN comporten un silenciament transcripcional que ha estat reconegut com el mecanisme epigenètic clau en el procés de transformació maligne. El nombre creixent de gens afectats per canvis epigenètics revela no només noves visions sobre la patogènesi molecular de les malalties, sinó que també proporcionen nous biomarcadors que poden contribuir a la millora dels mètodes diagnòstics i a una més precisa avaluació del pronòstic. En aquest estudi hem definit un patró de perfil de metilació que permet reconèixer al diagnòstic quins pacients no respondran al tractament amb AZA. Amb aquesta informació els metges podrien tenir una avantatge en la presa de decisions sobre el tractament.

## **11. CONCLUSIONS**

#### Relatives a l'objectiu principal:

- El 95% dels pacients (37/39) analitzats presentava almenys una mutació. Els gens més freqüentment alterats van ser: *TP53* (49%), *DNMT3A* (21%), *SRSF2* (18%), *TET2* (15%) i *U2AF1* (15%). Vam observar una correlació entre les mutacions de *SRSF2* i *TET2* ( $p=0.006$ ) i les dues mutacions eren mútuament excloents amb mutacions de *TP53* ( $p=0.008$ )
- L'anàlisi no supervisat dels perfils de metilació global separava les mostres neoplàsiques de les mostres de controls sans, demostrant homogeneïtat en els controls i l'heterogeneïtat de la resta de mostres. Tot i així no va ser útil per classificar els pacients segons grup citològic (SMD versus LAMs), segons grup citogenètic o segons resposta al tractament.

#### Relatives als objectius secundaris:

- Al diagnòstic, els pacients amb LAMs presentaven més variants que els pacients amb AREB-2, AREB-1 o CRDM. Les mutacions de *U2AF1* es van associar a un menor recompte de neutròfils a SP ( $<0.8 \times 10^9/L$ ) ( $p=0.003$ ). Els pacients sense mutació en *TET2* s'associaven a menys de 5% blasts en SP ( $p=0.021$ ). Les mutacions de *SRSF2* s'associaven a l'absència de cariotip complex ( $p=0.010$ ). Les mutacions en el gen *TP53* s'associaven a una edat més jove ( $<70$  anys) ( $p=0.007$ ), cariotip alterat ( $p=0.003$ ), la majoria amb cariotip complex ( $p<0.001$ ) i amb grups d'alt risc segons el IPSS-R ( $p=0.003$ ). No vam trobar cap associació entre el número de mutacions i la SG o SLP. Les mutacions en *TP53* estaven associades a menor SG i SLP, mentre que les mutacions en *SRSF2* correlacionaven amb millor SG i SLP. Considerant conjuntament l'estat mutacional de *SRSF2* i *TP53*, els pacients es podien estratificar en tres grups significativament diferents en quant a SG i SLP, sent el de millor pronòstic aquells pacients *SRSF2* mutat/*TP53* wild-type i el de pitjor pronòstic *SRSF2* wild-type/*TP53* mutada. En l'anàlisi multivariant només l'estat mutacional de *TP53* mantenia el seu impacte per a la SLP. La taxa de resposta global va ser del 55% (17/31) i no vam detectar cap mutació gènica que s'associés a la resposta al tractament.
- Vam poder definir tres models evolutius de la malaltia segons els estudis mutacionals. En el primer model la freqüència al·lèlica de la variant (VAF), o el nombre de mutacions, disminueix a la resposta i augmenta a la progressió. En el segon model les VAFs de les mutacions, o el nombre de mutacions, es mantenen o augmenten a la resposta (citològica) indicant que tot i que el pacient es trobi en milloria de les



característiques hematològiques, la càrrega mutacional no ha disminuït i per tant, seria el preludi de la progressió de la malaltia. En el tercer model les VAFs de les mutacions, o el nombre de mutacions, disminueix o desapareix a la progressió de la malaltia indicant que la causa de la progressió no és deguda a les mutacions trobades al diagnòstic. Per tant, els estudis de NGS serien útils per monitoritzar la malaltia en els casos dels models 1 i 2, però no el tercer model.

- Es descriu un patró de metilació, definit per 200 sondes, que permetia diferenciar al diagnòstic els pacients que responien al tractament amb AZA respecte els que no responien.
- Post-tractament les mostres clusteritzaven amb la mostra del propi pacient al diagnòstic, enlloc d'agrupar-se per categoria citològica o per resposta al tractament. El tractament amb AZA produïa una disminució a nivell de metilació global en les mostres de seguiment, tot i que no s'observava major desmetilació en els pacients responedors comparat amb els no responedors. La signatura de metilació definida al diagnòstic que ajudava a distingir entre els pacients responedors i no responedors, no va ser d'utilitat al seguiment ja que no permet detectar quins pacients seran els que progressaran.

## **12. LÍNIES DE FUTUR**

Les línies de futur que es desprenen d'aquesta investigació són:

- Estudiar les mostres incloses en el protocol CET-AZA-16 de pacients amb SMD d'alt risc no candidats a trasplantament, mitjançant seqüenciació massiva d'un panell de 32 gens associats amb patologia mieloide (on s'han exclòs aquells gens que no s'havien trobat alterats en l'estudi pilot de 83 gens). En aquest cas l'estudi es realitza al diagnòstic, als sis mesos d'inici de tractament amb azacitidina i en el moment de la progressió de la malaltia. La intenció és utilitzar aquesta cohort de pacients com a cohort de validació dels resultats obtinguts en el protocol CETLAM SMD-2009 descrits en aquesta tesi i fer una altra publicació. Fins el moment de dipositar aquest treball s'ha analitzat per panells de NGS 45 pacients amb SMD d'alt risc al diagnòstic, 16 als 6 mesos i 5 a la recaiguda.
- Posar-nos en contacte amb altres grups que hagin fet estudis de metilació en pacients amb SMD tractats amb AZA, per si estan interessats en analitzar el patró de metilació de les 200 sondes que hem detectat al diagnòstic i que permetia distingir els pacients que responien a azacitidina respecte els que no responien. Això ens permetria validar els nostres resultats amb una cohort independent de pacients.

## **13. BIBLIOGRAFIA**

1. Woessner Casas S, Florensa Brichs L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Madrid: Acción Médica; 2006.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC; 2008.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391–406.
4. Germing U, Strupp C, Kuendgen A, Isa S, Knipp S, Hildebrandt B, et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2006;91:1596–604.
5. Malcovati L, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: A basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005;23:7594–603.
6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edition. Lyon, France: IARC; 2017.
7. Mufti GJ, Galton DAG. Myelodysplastic syndromes: Natural history and features of prognostic importance. *Clin Haematol*. 1986;15:953–71.
8. Jansen AJG, Essink-Bot ML, Beckers EAM, Hop WCJ, Schipperus MR, Van Rhenen DJ. Quality of life measurement in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2003;121:270–4.
9. Ruutu P. Granulocyte function in myelodysplastic syndromes. *Scand J Haematol Suppl*. 1986;45:66–70.
10. Mufti GJ, Stevens JR, Oscier DG, Hamblin TJ, Machin D. Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. *Br J Haematol*. 1985;59:425–33.
11. Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T, Canizo MC, Torrabadella M, Garcia S, et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: A multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood*. 1989;74:395–408.

12. Sanz-De Pedro M, Wang W, Kanagal-Shamanna R, Khoury JD. Myelodysplastic Syndromes: Laboratory Workup in the Context of New Concepts and Classification Criteria. *Curr Hematol Malig Rep.* 2018;13:467–76.
13. Kao JM, McMillan A, Greenberg PL. International MDS risk analysis workshop (IMRAW)/IPSS reanalyzed: Impact of cytopenias on clinical outcomes in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 2008;83:765–70.
14. The European LeukemiaNet. Guidelines for standardized diagnostic and prognostic procedures in adult myelodysplastic syndromes. *Leuk Guidel.* 2008;version 09:1–9.
15. Martín E, Woessner S, Lafuente R, Florensa L, Vilalta J, Sans-Sabrafen J. La biopsia medular en el estudio de las anemias refractarias adquiridas. *Med Clin (Barc).* 1986 Oct 18;87:491–5.
16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982;51:189–99.
17. Ohyashiki K, Nishimaki J, Shoji N, Miyazawa K, Kimura Y, Ohyashiki J. Re-evaluation of refractory anemia with excess blasts in transformation. *Leuk Res.* 2001;25:933–9.
18. Mallo M, Cervera J, Schanz J, Such E, García-Manero G, Lúo E, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia.* 2011;25:110–20.
19. Tanaka TN, Bejar R. MDS overlap disorders and diagnostic boundaries. *Blood.* 2019;133:1086–95.
20. Valent P, Horny HP. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: Update and open questions. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:548–53.
21. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, Wimazal 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.* 2012;36:1–5.
22. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126:9–16.

23. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:2488–98.
24. Porwit A, Van De Loosdrecht AA, Bettelheim P, Eidschink 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;28:1793–8.
25. Rajab A, Porwit A. Screening bone marrow samples for abnormal lymphoid populations and myelodysplasia-related features with one 10-color 14-antibody screening tube. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2015;88:253–60.
26. You JS, Jones PA. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell*. 2012;22:9–20.
27. Shallis RM, Ahmad R, Zeidan AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2018;101:260–71.
28. Ciabatti E, Valetto A, Bertini V, Ferreri MI, Guazzelli A, Grassi S, et al. Myelodysplastic syndromes: Advantages of a combined cytogenetic and molecular diagnostic workup. *Oncotarget*. 2017;8:79188–200.
29. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28:241–7.
30. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478:64–9.
31. Abrahamsson AE, Geron I, Gotlib J, Dao KHT, Barroga CF, Newton IG, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:3925–9.
32. 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;118:6239–46.
33. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its

- clinical relevance. *Blood*. 2013;122:4021–34.
34. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365:1384–95.
  35. Martín I, Such E, Navarro B, Vicente A, López-Pavía M, Ibáñez M, et al. Negative impact on clinical outcome of the mutational co-occurrence of SF3B1 and DNMT3A in refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Leuk Lymphoma*. 2017;58:1686–93.
  36. 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*. 2015;27:617–30.
  37. Thol F, Kade S, Schlarmann 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;119:3578–84.
  38. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 2012;120:3080–8.
  39. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2017;49:204–12.
  40. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, Abdel-Wahab O, Steensma DP, Galili N, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012;30:3376–82.
  41. Przychodzen B, Jerez A, Guinta K, Sekeres MA, Padgett R, Maciejewski JP, et al. Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood*. 2013;122:999–1006.
  42. Graubert TA, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2011;44:53–7.
  43. Wu S, Tang J, Lin C, Kuo Y, Li L, Tseng M, et al. Clinical implications of U2AF1 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression. *Am*



- J Hematol. 2013;88:277–82.
44. Heuser M, Yun H, Thol F. Epigenetics in myelodysplastic syndromes. *Semin Cancer Biol.* 2018;51:170–9.
  45. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:599–612.
  46. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia.* 2014;28:485–96.
  47. Rasmussen KD, Jia G, Johansen J V., Pedersen MT, Rapin N, Bagger FO, et al. Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis. *Genes Dev.* 2015;29:910–22.
  48. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev.* 2016;30:733–50.
  49. Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood.* 2014;124:2705–12.
  50. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P, et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2014;32:2691–8.
  51. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2011;25:1153–8.
  52. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;363:2424–33.
  53. Kim SJ, Zhao H, Hardikar S, Singh AK, Goodell MA, Chen T. A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. *Blood.* 2013;122:4086–9.
  54. Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarrokhi a, Jankowska a M, Hasrouni E, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia.* 2014;28:78–87.
  55. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The Common

- Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting  $\alpha$ -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17:225–34.
56. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18:553–67.
57. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical implications of Genetic mutations in Myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2017;35:968–74.
58. DiNardo CD, Jabbour E, Ravandi F, Takahashi K, Daver N, Routbort M, et al. IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia*. 2016;30:980–4.
59. Lin CC, Hou HA, Chou WC, Kuo YY, Liu CY, Chen CY, et al. IDH mutations are closely associated with mutations of DNMT3A, ASXL1 and SRSF2 in patients with myelodysplastic syndromes and are stable during disease evolution. *Am J Hematol*. 2014;89:137–44.
60. Krell D, Mulholland P, Frampton AE, Krell J, Stebbing J, Bardella C. IDH mutations in tumorigenesis and their potential role as novel therapeutic targets. *Future Oncol*. 2013;9:1923–35.
61. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24:1062–5.
62. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell*. 2012;22:180–93.
63. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012;5:1–6.
64. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2008;647:21–9.
65. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones A V., et al. Inactivating

- mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet.* 2010;42:722–6.
66. Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med.* 2013;210:2627–39.
67. 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;364:2496–506.
68. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S, et al. Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood.* 2000;96:3154–60.
69. Chen CY, Lin LI, Tang JL, Ko BS, Tsay W, Chou WC, et al. RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome - The mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *Br J Haematol.* 2007;139:405–14.
70. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122:3616–27.
71. Damm F, Chesnais V, Nagata Y, Yoshida K, Scourzic L, Okuno Y, et al. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood.* 2013;122:3169–77.
72. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, et al. Myelodysplastic syndromes, version 2.2017: Clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2017;15:60–87.
73. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 2013;45(10):1232–7.
74. Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2016;769:47–62.
75. 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;160:660–72.
76. Lindsley RC, Saber W, Mar BG, Redd R, Wang T, Haagenson MD, et al. Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2017;376:536–47.
77. Della Porta MG, Gallì A, Bacigalupo A, Zibellini S, Bernardi M, Rizzo E, et al. Clinical effects of driver somatic mutations on the outcomes of patients with myelodysplastic syndromes treated with allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2016;34:3627–37.
78. Bally C, Adès L, Renneville A, Sebert M, Eclache V, Preudhomme C, et al. Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. *Leuk Res.* 2014;38:751–5.
79. Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, Maciejewski JP, Nazha A, Sekeres MA, et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia.* 2019;33:1747–58.
80. 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;29:1971–9.
81. Mallo M, del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoiz MJ, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): Influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol.* 2013;162:74–86.
82. Caceres G, McGraw K, Yip BH, Pellagatti A, Johnson J, Zhang L, et al. TP53 suppression promotes erythropoiesis in del(5q) MDS, suggesting a targeted therapeutic strategy in lenalidomide-resistant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:16127–32.
83. Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O’Laughlin M, Fulton RS, et al. TP53 and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2016;375:2023–36.
84. Chang CK, Zhao YS, Xu F, Guo J, Zhang Z, He Q, et al. TP53 mutations predict decitabine-induced complete responses in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J*

- Haematol. 2017;176:600–8.
85. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366:1090–8.
  86. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28:1057–68.
  87. Jones PA, Issa JPJ, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet*. 2016;17:630–41.
  88. Laird PW. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet*. 2005;14:R65–76.
  89. Jones P, Baylin S. The Epigenomics of Cancer. *Cell*. 2007;128:683–92.
  90. Issa JPJ, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3938–46.
  91. Batty N, Malouf GG, Issa JPJ. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Lett*. 2009;280:192–200.
  92. Qin T, Youssef EM, Jelinek J, Chen R, Yang AS, Garcia-Manero G, et al. Effect of cytarabine and decitabine in combination in human leukemic cell lines. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4225–32.
  93. Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*. 1999;21:103–7.
  94. Issa JP. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24:317–30.
  95. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev*. 2006;20:1–13.
  96. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy TE, Paietta E, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*. 2009;114:3448–58.
  97. Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:497–510.
  98. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev*

- Genet. 2002;3:415–28.
99. Benetatos L, Vartholomatos G. Enhancer DNA methylation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75:1999–2009.
  100. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349:2042–54.
  101. Nybakken GE, Bagg A. The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic design for myelodysplastic syndromes. *J Mol Diagnostics.* 2014;16:145–58.
  102. Licht JD. DNA Methylation Inhibitors in Cancer Therapy: The Immunity Dimension. *Cell.* 2015;162:938–9.
  103. Leone G, Teofili L, Voso MT, Lübbert M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica.* 2002;87:1324–41.
  104. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: Pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med.* 2001;134:573–86.
  105. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980;20:85–93.
  106. Issa JPJ, Kantarjian HM, Kirkpatrick P. Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:275–6.
  107. Sanz GF, Sanz MA, Greenberg PL. Prognostic factors and scoring systems in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 1998;83:358–68.
  108. Cazzola M. Risk assessment in myelodysplastic syndromes and MDS/MPN. *Hematology.* 2011;96:349–52.
  109. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89:2079–88.
  110. Steensma DP, Tefferi A. Risk-based management of myelodysplastic syndrome. *Oncology.* 2007;21:43–54.
  111. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al.

- Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2007;25:3503–10.
112. Voso MT, Fenu S, Latagliata R, Buccisano F, Piciocchi A, Aloe-Spiriti MA, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO prognostic scoring system: Validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian regional. *J Clin Oncol.* 2013;31:2671–7.
  113. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes Revised International. *Blood.* 2012;120:2454–65.
  114. 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;30:820–9.
  115. Lambertenghi-Delilieri G, Orazi A, Luksch R, Annaloro C, Soligo D. Myelodysplastic syndrome with increased marrow fibrosis: a distinct clinico-pathological entity. *Br J Haematol.* 1991;78:161–6.
  116. Porta MGD, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2009;27:754–62.
  117. Kantarjian H, Giles F, List A, Lyons R, Sekeres MA, Pierce S, et al. The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplasia syndromes. *Cancer.* 2007;109:1705–14.
  118. Aul C, Gattermann N, Heyll A, Germing U, Derigs G, Schneider W. Primary myelodysplastic syndromes: Analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia.* 1992;6:52–9.
  119. Gonzalez-Porrás JR, Córdoba I, Such E, Nomdedeu B, Vallespi T, Carbonell F, et al. Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer.* 2011;117:5529–37.
  120. Córdoba I, Gonzalez-Porrás JR, Such E, Nomdedeu B, Luño E, De Paz R, et al. The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.*

- 2012;36:287–92.
121. Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2014;99:956–64.
  122. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD). Guías Españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y de la leucemia mielomonocítica crónica. Segunda edición (2020). *Boletín del Grup Español Síndromes Mielodisplásicos*. 2020;8:4–55.
  123. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, Holland JF, Backstrom JT, Beach CL, et al. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: Studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol*. 2006;24:3895–903.
  124. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009;10:223–32.
  125. Estey E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *J Clin Oncol*. 2007;25:1908–15.
  126. Beran M, Shen Y, Kantarjian H, O'Brien S, Koller CA, Giles FJ, et al. High-dose chemotherapy in high-risk myelodysplastic syndrome: Covariate-adjusted comparison of five regimens. *Cancer*. 2001;92:1999–2015.
  127. Estey EH, Thall PF, Cortes JE, Giles FJ, O'Brien S, Pierce SA, et al. Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood*. 2001;98:357–83.
  128. Kantarjian H, Beran M, Cortes J, O'Brien S, Giles F, Pierce S, et al. Long-term follow-up results of the combination of topotecan and cytarabine and other intensive chemotherapy regimens in myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2006;106:1099–109.
  129. Tobiasson M, Kittang AO. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. *J Intern Med*. 2019;286:41–62.



130. Steensma DP. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018;8:47.
131. Adès L, Boehrer S, Prebet T, Beyne-Rauzy O, Legros L, Ravoet C, et al. Efficacy and safety of lenalidomide in intermediate-2 or high-risk myelodysplastic syndromes with 5q deletion: Results of a phase 2 study. *Blood.* 2009;113:3947–52.
132. Dezern AE. Treatments targeting MDS genetics: a fool’s errand? *ASH Educ Progr B.* 2018;277–85.
133. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood.* 2006;108:419–25.
134. Simons A, Shaffer LG, Hastings RJ. Cytogenetic nomenclature: Changes in the ISCN 2013 compared to the 2009 edition. Vol. 141, *Cytogenetic and Genome Research.* Basel, Switzerland: Karger; 2013.
135. Roche Nimblegen I. SeqCap EZ Library SR User’s Guide version 4.2. 2013.
136. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008;456:53–9.
137. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17:333–51.
138. Zymo research. EZ DNA Methylation kit.
139. Illumina. Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide. 2010.
140. Sandoval J, Heyn HA, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics.* 2011;6(6):692–702.
141. Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet.* 2012;13:705–19.
142. Ma X, Wang YW, Zhang MQ, Gazdar AF. DNA methylation data analysis and its application to cancer research. *Epigenomics.* 2013;5:301–16.

143. Wilhelm-Benartzi CS, Koestler DC, Karagas MR, Flanagan JM, Christensen BC, Kelsey KT, et al. Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data. *Br J Cancer*. 2013;109:1394–402.
144. Assenov Y, Müller F, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat Methods*. 2014;11:1138–40.
145. Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, Bartlett T, Tegner J, Gomez-Cabrero D, et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics*. 2013;29:189–96.
146. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.
147. Quesnel B, Fenaux P. P15INK4b Gene Methylation and Myelodysplastic Syndromes. *Leuk Lymphoma*. 1999;35:437–43.
148. Voso MT, Fabiani E, Piciocchi A, Matteucci C, Brandimarte L, Finelli C, et al. Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic syndromes treated with 5-Azacytidine. *Leukemia*. 2011;25:1910–3.
149. Raj K, John A, Ho A, Chronis C, Khan S, Samuel J, et al. CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia*. 2007;21:1937–44.
150. Cabezón M, Bargay J, Xicoy B, García O, Borrás J, Tormo M, et al. Impact of mutational studies on the diagnosis and the outcome of high-risk myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia patients treated with 5-azacytidine. *Oncotarget*. 2018;9:19342–55.
151. Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet*. 2003;33:238–44.
152. Pellagatti A, Boulton J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015;95:3–15.
153. Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2013;162:587–605.

154. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:5–19.
155. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol*. 2016;91:76–89.
156. Sallman DA, Komrokji R, Vaupel C, Cluzeau T, Geyer SM, McGraw KL, et al. Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016;30:666–73.
157. Nazha A, Sekeres MA. Improving Prognostic Modeling in Myelodysplastic Syndromes. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11:395–401.
158. 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;30:2214–20.
159. Montalban-Bravo G, Takahashi K, Patel K, Wang F, Xingzhi S, Nogueras GM, et al. Impact of the number of mutations in survival and response outcomes to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget*. 2018;9:9714–27.
160. Bernard E, Nannya Y, Yoshizato T, Hasserjian R, Devlim S, Tuechler H, et al. Implications of TP53 Allelic State for Genome Stability, Clinical Presentation and Outcomes in Myelodysplastic Syndromes . *ASH 61th Annu Meet*. 2019;Abstract nr. 675.
161. Visconte V, Makishima H, Maclejewski JP, Tiu R V. Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia*. 2012;26:2447–54.
162. Walter MJ, Shen D, Shao J, Ding L, White B, Kandoth C, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27:1275–82.
163. Wang H, Li Y, Lv N, Li Y, Wang L, Yu L. Predictors of clinical responses to hypomethylating agents in acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2018;97:2025–38.
164. Unnikrishnan A, Papaemmanuil E, Beck D, Deshpande NP, Verma A, Kumari A, et al. Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine

- Therapy in Myelodysplastic Syndromes. *Cell Rep.* 2017;20:572–85.
165. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2010;28:605–13.
  166. Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol JB, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2015;125:1857–72.
  167. Vilhais-Neto GC, Pourquié O. Retinoic acid. *Curr Biol.* 2008;18:191–2.
  168. Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Daniel MT, Fenaux P, Castaigne S, et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: Structure-function relationship. *Blood.* 1990;76:1710–7.
  169. Meschede J, Šadić M, Furthmann N, Miedema T, Sehr DA, Müller-Rischart AK, et al. The Parkin-coregulated gene product PACRG promotes TNF signaling by stabilizing LUBAC. *Sci Signal.* 2020;13:eaav1256.
  170. Helbo AS, Treppendahl M, Aslan D, Dimopoulos K, Nandrup-Bus C, Holm MS, et al. Hypermethylation of the VTRNA1-3 promoter is associated with poor outcome in lower risk myelodysplastic syndrome patients. *Genes (Basel).* 2015;6:977–90.
  171. Tran HTT, Kim HNH-J, Lee I-K, Kim Y-K, Ahn J-S, Yang D-H, et al. DNA methylation changes following 5-azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome. *J Korean Med Sci.* 2011;26:207–13.
  172. Fandy TE, Herman JG, Kerns P, Jiemjit A, Sugar EA, Choi SH, et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood.* 2009;114:2764–73.
  173. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood.* 2009;114:144–7.
  174. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia.* 2017;31:272–81.

175. Yamazaki J, Issa JPJ. Epigenetic aspects of MDS and its molecular targeted therapy. *Int J Hematol.* 2013;97:175–82.
176. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature.* 2010;468:839–43.
177. Yamazaki J, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Shen L, et al. Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics.* 2012;7:201–7.
178. Yamazaki J, Jelinek J, Lu Y, Cesaroni M, Madzo J, Neumann F, et al. TET2 mutations affect Non-CpG island DNA methylation at enhancers and transcription factor-binding sites in chronic myelomonocytic Leukemia. *Cancer Res.* 2015;75:2833–43.
179. GeneCards the Human Gene Database. Available from: <https://www.genecards.org/>
180. Reilly B, Tanaka TN, Diep D, Yeerna H, Tamayo P, Zhang K, et al. DNA methylation identifies genetically and prognostically distinct subtypes of myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* 2019;3:2845–58.