



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

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>

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIO DE METILACIÓN EN LOS GENES
CDH1, P15, P16 Y BIK EN PACIENTES AFECTOS
DE MIELOMA MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

MARÍA CHICANO LAVILLA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Mieloma múltiple.....	5
1.1.1 Definición e incidencia.....	5
1.1.2 Características clínico-biológicas.....	5
1.1.3 Diagnóstico.....	7
1.1.4 Pronóstico.....	8
1.1.5 Manejo, tratamiento y progresión de la enfermedad.....	11
1.1.5.1 Factores clínicos de riesgo de progresión clínicos.....	13
1.1.5.2 Estratificación del riesgo de progresión de GMSI y SMM a MM.....	14
1.1.5.3 Marcadores citogenéticos.....	15
1.1.5.4 Marcadores de expresión génica.....	16
1.1.5.5 Marcadores epigenéticos.....	17
1.2 METILACIÓN DEL DNA.....	17
1.2.1 Bases moleculares y regulación.....	17
1.2.2 Metilación del DNA en cáncer.....	19
1.2.3 Metilación en Mieloma Múltiple.....	20
1.2.4 Características de los genes <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i> hipermetilados en MM.....	21
1.2.4.1 <i>CDH1</i>	21
1.2.4.2 <i>P15</i> y <i>P16</i>	22
1.2.4.3 <i>BIK</i>	23
1.3 Técnicas de detección de metilación del DNA.....	23
1.4 Objetivos.....	25
2. PACIENTES Y METODOLOGÍA.....	26
2.1 Pacientes y controles.....	26
2.2 Metodología.....	26

2.2.1	Extracción del DNA.....	26
2.2.2	Tratamiento del DNA con bisulfito.....	27
2.2.3	Técnica de MS-PCR.....	28
2.2.4	Validación de la técnica mediante secuenciación.....	30
2.2.5	Análisis estadístico	30
3.	RESULTADOS	31
3.1	Validación de la técnica MS-PCR para los genes <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i>	31
3.2	Características clínico-biológicas de los pacientes.....	32
3.3	Metilación en los genes <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i>	33
3.3.1	Individuos control.....	33
3.3.2	Pacientes afectos de GMSI, SMM o MM.....	35
3.3.3	Comparación entre individuos control y pacientes	36
3.3.4	Comparación entre los grupos pre-MM y MM	38
3.3.5	Metilación en pacientes de MM al diagnóstico y en el seguimiento.....	39
3.4	Relación entre metilación y variables clínico-biológicas.....	40
3.5	Correlación entre metilación y SG.....	42
3.5.1	Análisis univariante	42
3.5.1.1	Serie total, serie pre-MM y serie MM.....	42
3.5.1.2	MM al diagnóstico y en el seguimiento	46
3.5.2	Análisis multivariante.....	48
4.	DISCUSIÓN.....	50
4.1	Valoración de la metodología utilizada en el análisis de la metilación de los genes a estudio.....	50
4.2	Metilación de los genes <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i> en individuos control.....	51
4.3	Metilación de <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i> en pacientes afectos de estadios pre-MM.....	53
4.4	Metilación de <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i> en pacientes afectos de MM.....	54
4.5	Comparación de la metilación de <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i> entre estadios pre-MM y MM	55

4.6	Comparación de la metilación en <i>CDH1</i> , <i>P15</i> , <i>P16</i> y <i>BIK</i> en MM estudiados al diagnóstico y en el seguimiento.....	57
4.7	Metilación global en MM	58
4.8	Relación entre metilación y parámetros clínico-biológicos	59
4.9	Relación de metilación con SG	59
5.	CONCLUSIONES	62
6.	BIBLOGRAFÍA.....	64

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mieloma múltiple

1.1.1 Definición e incidencia

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia hematológica englobada dentro de las denominadas discrasias de células plasmáticas (CP), que se caracteriza por la proliferación de una población de CP alterada en médula ósea (MO). Dentro de las discrasias de células plasmáticas el MM representa una de las entidades más agresivas.

El MM presenta una incidencia anual en la población de Europa occidental de 6,5 por cada 100.000 individuos y una supervivencia a los 5 años del 48,5% (Howlader *et al.*, 2016). El riesgo de sufrir esta enfermedad es de un 0,7%, representando un 1,8% de todos los tipos de neoplasias y un 13% de las neoplasias hematológicas es la segunda neoplasia hematológica más común (Siegel *et al.*, 2012). El diagnóstico de nuevos casos de MM ha ido aumentando paulatinamente a razón de un 0,8% anual, aunque la supervivencia media a los 5 años también ha aumentado gracias a la incorporación de nuevos tratamientos. La supervivencia media desde el diagnóstico para aquellos pacientes de riesgo alto e intermedio oscila entre 2-7 años, y en algo más de 10 años para los de bajo riesgo (Howlader *et al.*, 2016).

La mediana de edad al diagnóstico de la enfermedad es de 69 años, con un rango de 65-74 años, y es más frecuente en hombres que en mujeres. La incidencia de MM en población afroamericana es dos veces superior a la del resto de poblaciones y se suele presentar a una edad más temprana. En contra de lo esperado, la supervivencia es mayor que en la población caucásica. Esta diferencia podría estar relacionada con la mayor incidencia de estadios indolentes previos al MM en la población afroamericana (Waxman *et al.*, 2015). La diferencia en la incidencia entre poblaciones junto a la existencia de discrasias de CP familiares sugiere una susceptibilidad genética en el origen del MM (Schinasi *et al.*, 2016).

1.1.2 Características clínico-biológicas

La base de la patología es una proliferación alterada de CP atípicas. Mientras que las CP normales encargadas de la producción de las inmunoglobulinas muestran un patrón inmunofenotípico CD38⁺CD138⁺CD19⁺CD45⁺CD56⁻, las CP del MM solo conservan CD38 y

CD138, siendo la mayoría negativas para CD19 y CD45 y positivas para CD56. Si bien no se conoce el porqué de este patrón inmunofenotípico, es de gran ayuda para el diagnóstico la enfermedad (Kuehl *et al.*, 2012). La proliferación alterada de CP atípicas genera una serie de manifestaciones clínicas que tienen un papel importante en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

En condiciones normales las CP secretan las inmunoglobulinas IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. En las discrasias de CP se observa un aumento de secreción de un tipo específico de inmunoglobulina con un incremento de ésta en suero denominado componente monoclonal (CM) o paraproteína. El CM se compone de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, considerándose como cadenas ligeras libres a cadenas ligeras no unidas a la cadena pesada que las propias CP secretan en pequeñas concentraciones, y que pueden ser de dos tipos, cadenas *kappa* o cadenas *lambda* (Figura 1). El tipo de CM y el tipo de cadena ligera libre también es importante en el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de la enfermedad. El CM en concentraciones elevadas puede producir daños renales, siendo una de las complicaciones más comunes de esta enfermedad.

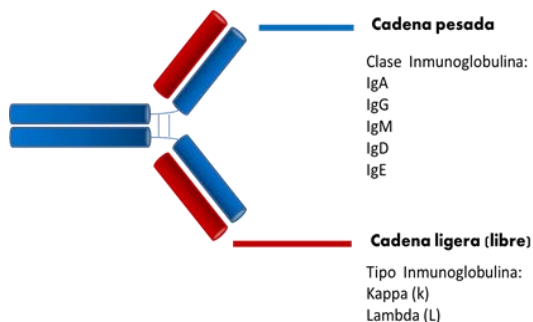


Figura 1. Esquema de la Inmunoglobulina

En rojo las cadenas ligeras, dependiendo del tipo se clasifican en *kappa* o *lambda*. En azul las cadenas pesadas, dependiendo de la clase se denominan IgA, IgG, IgM, IgD o IgE.

Entre un 70-95% de los pacientes presenta lesiones óseas líticas, que aumenta tanto la morbilidad como la mortalidad de los que las sufren. En el MM la dinámica de generación y destrucción ósea se encuentra alterada. La interacción entre las CP alteradas y el microambiente de la MO genera una disminución de la actividad de los osteoblastos y un aumento de la actividad osteoclástica. Esta dinámica ocurre debido a la producción de una serie de factores ya sea bien por las mismas CP o por la interacción entre éstas y las células del estroma. Las CP secretan factores estimuladores de la actividad osteoclástica y angiogénica como la MIP-1 α o el VEGF. Además, provocan la producción de otros factores activadores de los osteoclastos como RANKL por parte de las células del estroma. En el suero de pacientes con MM se encuentran niveles aumentados de inhibidores de la actividad osteoblástica tales como IL3, IL7 o TGF β . Por otra parte la secreción del inhibidor de actividad osteoblástica DKK1 por parte de las CP, junto a la disminución del inhibidor de osteoclastos OPG secretado por los

osteoblastos, aumentan la actividad osteoclástica. Cerrando el ciclo de retroalimentación, la interacción entre las CP y el resto de tipos celulares del entorno genera una secreción de IL6 que favorece un medio idóneo para la supervivencia del clon neoplásico de CP a través de la angiogénesis (Minter *et al.*, 2011; Palumbo *et al.*, 2011; Kuehl *et al.*, 2012) (Figura 2).

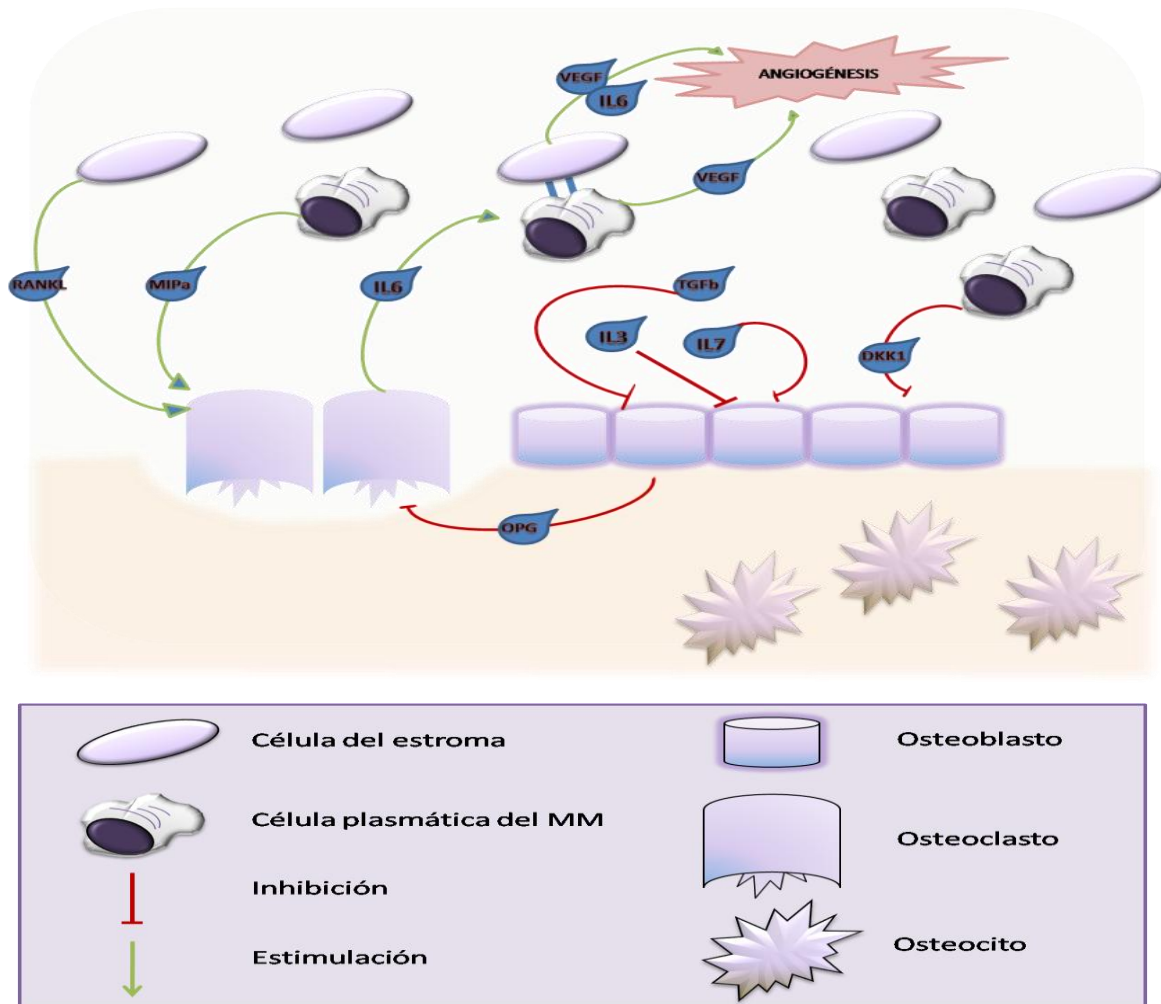


Figura 2. Interacciones en el microambiente del MM

La interacción entre las CP del MM y su microambiente es esencial para su supervivencia. Las interacciones entre los distintos tipos celulares producen una serie de citoquinas y factores de crecimiento como IL6, VEGF que intervendrán en la creación de un medio idóneo para la supervivencia del clon neoplásico de CP. Otros factores como IL3, IL7, TGFb y DKK1 se secretan al medio por los distintos tipos celulares e inhiben la actividad osteoblástica, reduciendo la regeneración del hueso. La actividad osteoclástica aumenta debido principalmente a la secreción de MIPa y de RANKL (Minter *et al.*, 2011; Palumbo *et al.*, 2011; Kuehl *et al.*, 2012)

1.1.3 Diagnóstico

En el MM se ha descrito un estadio premaligno asintomático denominado Gammapatía Monoclonal de Significado incierto (GMSI) y un estadio intermedio denominado *Smoldering Multiple Myeloma* (SMM) o mieloma asintomático. Existe además una entidad denominada

GMSI de cadenas ligeras que engloba a aquellas GMSI, que no secretan CM pero que presentan un aumento en la concentración de cadenas ligeras libres o *free light chain* (FLC). La entidad intermedia entre este tipo de GMSI y el MM de cadenas ligeras se denomina proteinuria idiopática *Bence Jones*, que es bastante similar al estadio SMM. Se considera que todo MM viene precedido de estas entidades.

En el momento del diagnóstico de la enfermedad es importante identificar el estadio en el que se encuentra el paciente, ya que en la mayoría de pacientes afectados de GMSI o SMM no se requiere tratamiento, pero si un seguimiento exhaustivo de la enfermedad (Mateos *et al.*, 2013; Rajkumar, 2014,2015).

El MM se caracteriza por la presencia de más de un 10% de CP en MO y por presentar manifestaciones clínicas en diversos órganos, englobadas bajo las siglas CRAB:

- C) Hipercalcemia: aumento de calcio en suero de más de 11,5mg/dL, producido por la actividad osteolítica generada por la misma enfermedad.
- R) Fallo renal: presencia de niveles de creatinina en suero mayores a 2mg/dL.
- A) Anemia: cuando existe menos de 10g/dL de hemoglobina en sangre.
- B) Lesiones líticas óseas: evidencia de afectación ósea ya sea por la presencia de lesiones líticas o bien por osteoporosis.

Tabla 1. Características clínicas para el diagnóstico del MM

Diagnóstico Mieloma Múltiple
≥ 10% células plasmáticas en MO
Presencia de componente monoclonal en suero y/u orina
≥ 1 manifestación CRAB:
- C: ≥ 11,5mg/dL de calcio en suero
- R: Fallo renal, creatinina >2mg/dL en suero
- A: Anemia, Hb <10g/dL
- B: Afectación ósea, presencia de lesiones líticas u osteoporosis

Los criterios de diagnóstico se basan principalmente en el porcentaje de CP, presencia de CM y al menos una de las manifestaciones CRAB, tal y como se muestran en la tabla 1 (Rajkumar *et al.*, 2016).

1.1.4 Pronóstico

La supervivencia media en el MM es de 5-7 años, pero existe una amplia variación dependiendo de un conjunto de factores como son la carga tumoral, medida por el estadio de la enfermedad, el componente biológico, representado por las posibles alteraciones cromosómicas y la respuesta a tratamiento (Rajkumar *et al.*, 2016). Según la presencia o ausencia de estos factores se obtienen unas tablas de estratificación de la enfermedad en base al riesgo.

Actualmente el sistema más utilizado es el *International Staging System (ISS)* que se basa en la carga tumoral. Este sistema estratifica el MM según dos factores, los niveles de β 2-microglobulina (B2M) y los de albúmina en suero. El aumento de los niveles de B2M se correlaciona con un aumento de carga tumoral y con fallo renal, mientras que la reducción de los niveles de albúmina está relacionada con un aumento de citoquinas que se producen en el seno del microambiente creado por el mismo MM. Este sistema clasifica al MM en tres estadios según la supervivencia global (SG) (Tabla 2) (Greipp *et al.*, 2005).

Tabla 2. Clasificación ISS. Clasifica el MM en tres estadios según los niveles de B2M y albúmina en suero correlacionándolos con la supervivencia media (Greipp *et al.*, 2005).

Clasificación ISS		
Estadio	Criterios	Media supervivencia (meses)
I	- B2M <3,5 mg/L Albúmina \geq 3,5 mg/L	62
II	Ni estadio I ni estadio III: - B2M <3,5 mg/L y albúmina <3,5 mg/L - B2M de 3,5 a <5,5 mg/L independientemente del nivel de albúmina	44
III	- B2M \geq 5,5 mg/L	29

Sin embargo, este sistema solo estratifica el MM a grandes rasgos y puede perderse información de valor pronóstico. Para aumentar la capacidad de estratificar según el pronóstico al ISS se le han añadido otros biomarcadores.

Las características citogenéticas permiten clasificar en dos grandes grupos: los MM con hiperdiploidía (50-60% de pacientes) y aquellos con reordenamiento del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, situado en 14q32 (40-50% de pacientes) (Kumar *et al.*, 2009). El primer grupo se caracteriza por presentar trisomías de uno o más cromosomas impares, exceptuando el 1, el 13 y el 21. El segundo grupo engloba las translocaciones del gen *IGH*, siendo las más recurrentes t(11;14), t(4;14), t(6;14), t(14;16) y la t(14;20) que dan lugar a la

sobreexpresión de los oncogenes *CCND1*, *FGFR3/MMSET*, *CCND3*, *C-MAF* y *MAF-B* respectivamente. Otras alteraciones citogenéticas importantes en el pronóstico del MM son la monosomía del cromosoma 13 o deleción de 13q14, deleción de 17p implicando a la pérdida de *TP53*, ganancias de 1q31, pérdidas de 1p con pérdida de *CDKN2C* y *FAF1*, y reordenamientos del gen *MYC* en 8q24 (Bhutani *et al.*, 2015; Rajan *et al.*, 2015).

Actualmente las alteraciones citogenéticas son los marcadores moleculares con mayor relevancia en proporcionar un valor pronóstico. Según las alteraciones cromosómicas que se presentan al diagnóstico del MM se puede realizar una estratificación del riesgo (Rajkumar, 2014) (Tabla 3)

Tabla 3. Estratificación del riesgo por las alteraciones citogenéticas (Rajkumar, 2014; Rajan *et al.*, 2015)

Estratificación de riesgo según citogenética	
Grupo de riesgo	Alteración cromosómica
Riesgo estándar	- Trisomías (Hiperdiploidía) - t(11;14) - t(6;14)
Riesgo intermedio	- t(4;14) - Ganancias de 1q*
Riesgo alto	- t(14;16) - t(14;20) - del(17p)

*El riesgo se convierte en alto si se encuentra acompañado de una o más alteraciones citogenéticas de alto riesgo.

Los niveles elevados de Lactato-deshidrogenasa (LDH) se correlacionan con una enfermedad más agresiva lo que sugiere un aumento en la proliferación celular y, en especial, con presencia de enfermedad extramedular (Terpos *et al.*, 2010). En 2014 el grupo internacional de MM, englobando todos los marcadores de pronóstico, revisó el ISS e introdujo los grupos de riesgo citogenéticos y los niveles de la LDH.

Tabla 4. Clasificación R-ISS. Sistema Internacional de clasificación por pronóstico revisado. Se tienen en cuenta los grupos de riesgo citogenéticos así como los niveles de LDH además de los incluidos en la ISS (Palumbo *et al.*, 2015).

Clasificación R-ISS		
Estadio	Criterios	Supervivencia a los 5 años (%)
Estadio I	- ISS I (B2M <3.5 mg/L, Albúmina ≥3.5 mg/L) - Alteraciones cromosómicas de riesgo estándar - Niveles de LDH normales	82

Estadio II	Ni estadio I ni estadio III	62
Estadio III	- ISS III (B2M \geq 5.5 mg/L) - Alteraciones cromosómicas de alto riesgo o niveles elevados de LDH	40

Teniendo en cuenta estos marcadores se obtiene una nueva clasificación con un mayor valor pronóstico, la R-ISS (Tabla 4)(Palumbo *et al.*, 2015).

1.1.5 Manejo, tratamiento y progresión de la enfermedad

A lo largo del tiempo el tratamiento ha ido evolucionando y actualmente se utilizan fármacos dirigidos. En un principio se utilizó Melphalan-Prednisona como tratamiento monoterapia. En los años 90 se introdujo el trasplante autólogo y a finales del siglo XX se comenzó a utilizar la talidomida, fármaco inmunomodulador, como tratamiento de rescate. En solo 10 años las pautas han evolucionado considerablemente con la incorporación de nuevos fármacos como el bortezomib, la dexametasona y la lenalidomida (inmunomodulador de segunda generación), adaptando el tratamiento en función del riesgo según la clasificación R-ISS. Todo ello ha contribuido a un aumento en la supervivencia media de los pacientes (Figura 3). Asimismo, en los últimos años se han ido incorporando nuevos fármacos como el carfilzomib, la pomalidomida (inmunomodulador de tercera generación) o anticuerpos monoclonales como el daratumumab.

Actualmente el tratamiento se divide en cuatro fases: terapia inicial, trasplante autólogo, terapia de mantenimiento y terapia tras la recaída.

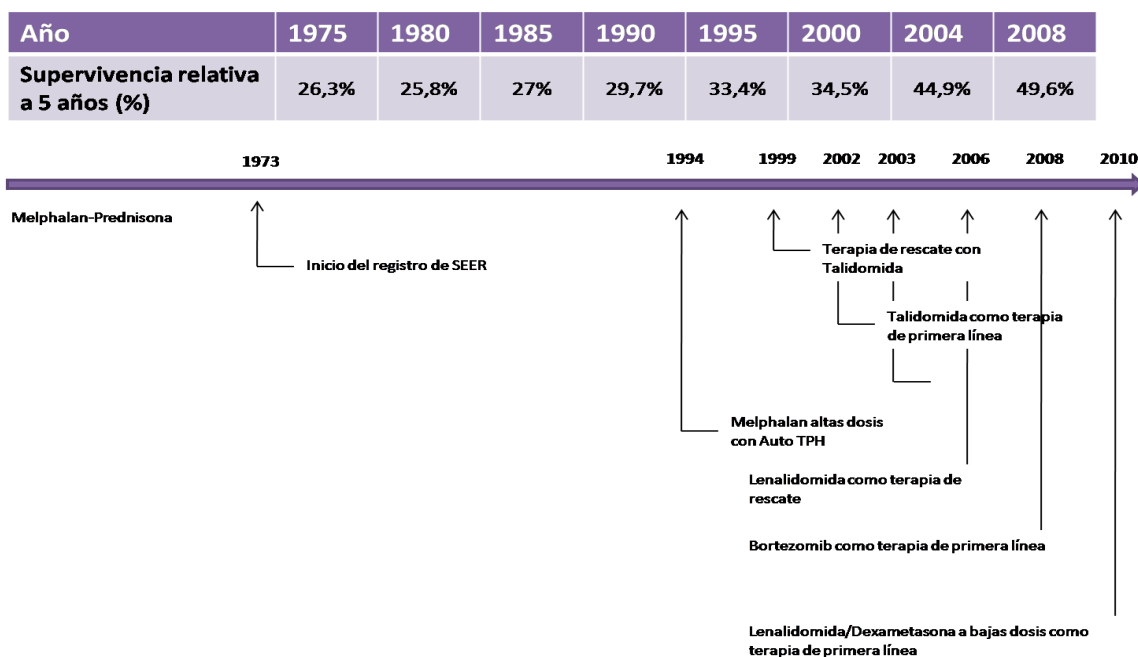


Figura 3. Evolución del tratamiento del MM a lo largo de los años (modificado de Waxman et al 2010 y de *Surveillance, epidemiology and end results program (SEER)* (Waxman *et al.*, 2015; Howlader *et al.*, 2016)

En las últimas dos décadas la introducción de nuevos fármacos y tratamientos en el manejo del MM ha tenido como consecuencia un aumento de la supervivencia a los 5 años.

Existen diversos protocolos de tratamiento del MM, según las guías del grupo internacional de MM. En pacientes de riesgos estándar e intermedio la terapia inicial recomendada es la administración concomitante de tres drogas, siendo una de las combinaciones más utilizadas bortezomib, lenalidomida y dexametasona (VRD). En pacientes de alto riesgo se recomienda la sustitución de bortezomib por carfilzomib. Tras cuatro ciclos de terapia de inducción, en aquellos pacientes que sean candidatos se recomienda el trasplante autólogo.

Tras el trasplante en aquellos pacientes de riesgo estándar y que no hayan alcanzado remisión completa o muy buena respuesta parcial se les trata con lenalidomida. A los pacientes de riesgo intermedio o alto se les trata con bortezomib durante dos años tras el trasplante, utilizando carfilzomib en el caso de pacientes de riesgo alto (Rajkumar *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado, los estudios de seguimiento de la enfermedad realizados en series amplias de pacientes afectados de MM han evidenciado que en la gran mayoría de casos la enfermedad viene precedida de una alteración de CP premaligna asintomática, la GMSI (Landgren *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2009). Esta alteración se caracteriza por tener menos de 3g/dL de proteína monoclonal en suero, menos de un 10% de CP en MO y por no sufrir afectación orgánica. La GMSI es la discrasia de CP más frecuente, con una incidencia anual de 120 por cada 100.000 individuos de 50 años, y aumenta a razón de 530 por cada 100.000 en individuos de 90 años, siendo la media de edad al diagnóstico de 72 años (Therneau *et al.*, 2012).

Al ser un estadio precursor, la GMSI puede progresar no solo a MM sino también a otros tipos de discrasias de CP como la amiloidosis, e incluso a otras enfermedades linfoproliferativas. El riesgo de progresión anual a MM de las GMSI es de un 1%, aumentando al 17% a los 10 años y al 39% a los 25 años (Kyle *et al.*, 2004).

Como se ha indicado, en el transcurso de la progresión a MM se ha descrito un estadio intermedio, el SMM. Este estadio está caracterizado por presentar más de 3g/dL de proteína monoclonal en suero y/o más de un 10% de CP en MO, y, como la GMSI, por no sufrir afectación orgánica. La incidencia anual de SMM, dependiendo de las series publicadas oscila entre el 10-15% con una edad media al diagnóstico de 65-70 años (Bladé *et al.*, 2010) siendo el riesgo de progresión anual a MM del 10% en los primeros 5 años, manteniéndose estable a partir de los 10 años con solo un 1% de riesgo de progresión anual (Kyle *et al.*, 2007).

El MM es una enfermedad que, como resultado de la acumulación de diversas alteraciones clínico-biológicas, va evolucionando a una patología cada vez más agresiva. Se postula que el

MM siempre viene precedido de una GMSI que a su vez progresará a SMM y éste al estadio sintomático de la enfermedad. El MM puede evolucionar a enfermedad extramedular, momento en el que las CP migran a diferentes zonas del cuerpo creando diversos focos de enfermedad. El último estadio en la evolución de la enfermedad es la leucemia de CP o fase leucemizada del MM (Figura 4).

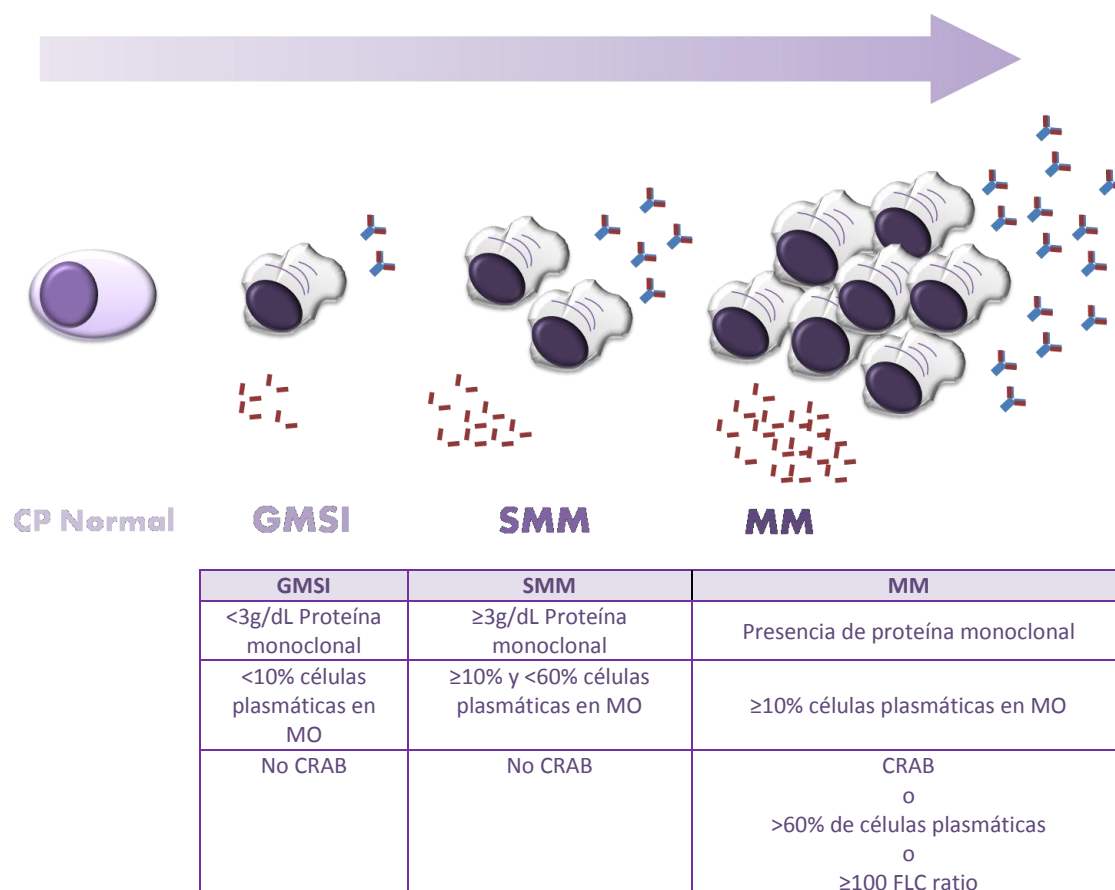


Figura 4. Criterios de diagnóstico de GMSI, SMM y MM

FLC: Free Light Chain, CRAB: Hipercalcemia, fallo renal, anemia, lesiones líticas (Kyle *et al.*, 2007; Bladé *et al.*, 2010)

Todavía se desconoce por qué solo algunas GMSI progresan a MM ni se ha descrito un marcador molecular que ayude a diferenciar el clon premaligno del maligno. Sin embargo, existen una serie de factores clínicos que ayudan a elaborar una estratificación de riesgo de progresión de GMSI a MM, entre ellos los más importantes son los niveles de CM, el tipo de cadenas ligeras libres y el porcentaje y atipias de las CP.

Según el tipo de inmunoglobulina que secreten las GMSI se las puede subdividir en GMSI IgM o no-IgM, siendo más frecuente la progresión de las no-IgM a MM. El tipo de inmunoglobulina más frecuente en GMSI suele ser IgG (70%), seguido de IgM (15%) e IgA (12%), estas dos últimas presentan un mayor riesgo de progresión (Kyle *et al.*, 2010,2014). Un aumento

progresivo del CM en el primer año tras el diagnóstico tanto de la GMSI como del SMM es un factor de riesgo de progresión a MM importante (Rosiñol *et al.*, 2007).

La ratio de los dos tipos de FLC es también importante ya que un incremento en la concentración de una de ellas supone un riesgo de progresión de enfermedad mayor al de los pacientes con ratio normal (0,26-1,65). En el caso de GMSI con una ratio de FLC fuera del rango el riesgo de progresión es del 17% a los 10 años y del 35% a los 20 años (Rajkumar *et al.*, 2005). En el SMM una ratio de FLC $\leq 0,125$ o ≥ 8 se asocia a un mayor riesgo de progresión aumentando considerablemente cuando la ratio es mayor a 100 (Dispenzieri *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2013).

Tanto el porcentaje de CP en médula, como el de CP atípicas y el de CP en circulación son factores de riesgo de progresión (Pérez-Persona *et al.*, 2010).

1.1.5.2 Estratificación del riesgo de progresión de GMSI y SMM a MM

El riesgo de progresión de las GMSI se puede estimar siguiendo un modelo que contempla el tipo y concentración del CM, y la ratio de FLC. Este modelo subdivide las GMSI en cuatro grupos de riesgo representados en la tabla 5 (Rajkumar *et al.*, 2010).

Tabla 5. Grupos de riesgo de progresión en GMSI. Dependiendo del número de factores de riesgo se estima un porcentaje de riesgo de progresión a MM en 20 años y se establecen cuatro grupos de riesgo que son el riesgo bajo sin presencia de factores de riesgo y el riesgo alto, presencia de tres factores de riesgo (Rajkumar *et al.*, 2010).

Grupo de Riesgo	Factores de riesgo	Riesgo de progresión en 20 años (%)
GMSI riesgo bajo	Ningún factor de riesgo	5%
GMSI riesgo bajo/intermedio	1 factor de riesgo	21%
GMSI riesgo intermedio/alto	2 factores de riesgo	37%
GMSI riesgo alto	3 factores de riesgo	58%

En el caso de los SMM es más difícil establecer un modelo de agrupación por riesgo ya que existen diferentes factores que por sí solos conllevan un elevado riesgo de progresión, como la concentración de CM en suero (aumento significativo de ésta en sucesivos controles), la ratio de FLC, el porcentaje de CP con inmunofenotipo alterado y la presencia de alteraciones

citogenéticas de alto riesgo. Los factores de riesgo elevado a tener en cuenta en SMM se encuentran indicados en la tabla 6 (Rajkumar *et al.*, 2015).

Tabla 6. Factores de riesgo de progresión en SMM (Kyle *et al.*, 2014)

≥ 10% de células plasmáticas en MO y uno o más de los siguientes factores de riesgo:		
Marcador clínico	Factor de riesgo	Progresión a los dos años del diagnóstico en %
Proteína monoclonal	- Isotipo IgA - ≥ 3g/dL	50%
	- Reducción de los otros isotipos de inmunoglobulinas - Aumento de la concentración de ≥ 25% en dos controles sucesivos en un periodo de 6 meses	65%
Ratio FLC	- ≥ 8 (pero <100)	40%
Células plasmáticas	- 50-60% CP en MO - ≥ 95% de CP con inmunofenotipo aberrante - Incremento de CP circulantes	50%
Citogenética	- t(4;14), o del(17p)	50%
Imagen	- Resonancia magnética con 1 lesión focal	

Existen tres factores de riesgo en SMM que conllevan a una elevada probabilidad de progresión a MM, que son: una ratio FLC ≥ a 100, CP en MO ≥ 60% o más de una lesión focal por resonancia magnética. Ante la presencia de alguno de estos factores se recomienda el tratamiento del SMM como enfermedad sintomática, indistintamente de la proporción de CP en MO (Kyle *et al.*, 2014).

1.1.5.3 Marcadores citogenéticos

Los marcadores moleculares han aportado un valor pronóstico y han ayudado a clasificar mejor la patología y planificar el plan terapéutico a seguir. Sin embargo, la búsqueda de marcadores moleculares de progresión de la enfermedad, sobre todo en lo que respecta a la evolución de enfermedad asintomática a MM, es todavía un campo en estudio.

Las neoplasias de CP se caracterizan por presentar frecuentemente alteraciones citogenéticas, y por ello se ha intensificado su estudio como posibles marcadores potenciales de progresión.

A lo largo del curso de la enfermedad se han identificado diversas alteraciones cromosómicas recurrentes, algunas de las cuales se postula que aparecen durante la transformación a GMSI y otras durante la evolución de la enfermedad. Dependiendo del momento de aparición, las

alteraciones cromosómicas se pueden clasificar en dos grupos: alteraciones primarias y secundarias (Rajan et al., 2015).

Las alteraciones primarias engloban las trisomías y los reordenamientos de *IGH*. Se postula que estas alteraciones ocurren en una fase muy temprana de la patología, concretamente en la transición de la CP normal a estadio premaligno clonal o GMSI. De todas las alteraciones únicamente la translocación t(4;14) se ha relacionado con un mayor riesgo de progresión de SMM a MM (Neben et al., 2013; Rajkumar et al., 2013), probablemente por la asociación entre ésta y la alta ratio de FLC (Kumar et al., 2010). Sin embargo, el hecho de encontrar todas estas alteraciones cromosómicas en un porcentaje similar tanto en MM como en los estadios asintomáticos previos, GMSI y SMM, las descartan como potencial marcador de progresión (Mailankody et al., 2010).

Las alteraciones secundarias engloban aquellas que aparecen más adelante, en cualquiera de las etapas a lo largo de la transformación o progresión de la enfermedad. Una de las primeras alteraciones descritas en MM, la monosomía del cromosoma 13 o delección en 13q14, es bastante frecuente en GMSI y por tanto no sugiere que juegue un papel importante en la evolución de GMSI a MM (Fonseca et al., 2002).

Las delecciones de 17p y ganancias de 1q21 se han relacionado con un riesgo elevado de progresión de la enfermedad, encontrándose ambas tanto en SMM como en MM. Las ganancias de 1q21 no se han descrito en GMSI, por lo que se les podría asociar a la progresión de la enfermedad. A lo largo de la evolución de la enfermedad se han detectado también delecciones de 1p32 y alteraciones en el gen *MYC*. Las primeras coexisten frecuentemente con las ganancias de 1q21 y por tanto se les asocia a mal pronóstico, sin embargo a las alteraciones en *MYC* todavía no se les ha atribuido un valor pronóstico (Hanamura et al., 2006).

1.1.5.4 Marcadores de expresión génica

Se han elaborado diferentes clasificaciones de MM utilizando el perfil de expresión génica pero todavía no se utilizan en el manejo de la enfermedad (Zhan et al., 2006; Broyl et al., 2010).

Aunque la enfermedad tiene un perfil de expresión génica diferenciado del de las CP normales, no existen grandes diferencias entre los perfiles de las diferentes etapas de esta patología, presentando las tres entidades, GMSI, SMM y MM un perfil de expresión muy similar entre ellas (Davies et al., 2003; López-Corral et al., 2014). Se han realizado diversos estudios con el propósito de obtener perfiles de expresión identificativos de los diferentes estadios de la patología. El resultado ha evidenciado un mayor número de genes con diferencias de

expresión entre el paso de CP normal al estadio de GMSI, pero se han observado muy pocos genes con diferencias de expresión entre GMSI a MM (Davies *et al.*, 2003; Shaughnessy *et al.*, 2007). Analizando las diferencias de expresión entre GMSI y MM Lopez-Corral *et al.* (2014) observaron únicamente 11 genes sobreexpresados en MM, todos ellos pertenecientes a snoRNAs, y solamente tres genes con menor expresión respecto GMSI.

1.1.5.5 Marcadores epigenéticos

Existen mecanismos celulares que controlan la expresión génica sin la modificación de la secuencia de DNA y algunos de ellos han sido objeto de estudio en MM como posibles marcadores de evolución de la enfermedad, por ejemplo los microRNA (miRNA) y la metilación del DNA (Dimopoulos *et al.*, 2014).

Los miRNA son pequeñas moléculas monocatenarias de RNA de aproximadamente 22 nucleótidos, no codificantes, y capaces de regular la expresión génica. Los genes que codifican para miRNA pueden actuar como protooncogenes o como genes supresores de tumor y se encuentran mutados en gran variedad de neoplasias (Zhang *et al.*, 2007). La expresión de miRNAs en MM se encuentra significativamente alterada con respecto a la de CP normales, asociándose a proliferación y confiriendo valor pronóstico. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de miRNA entre GMSI y MM, lo que indicaría que tendrían más bien un impacto temprano en la evolución clonal de las CP (Jones *et al.*, 2012; Seckinger *et al.*, 2015).

Otro mecanismo epigenético que regula la expresión génica es la metilación del DNA, más concretamente, la metilación de las islas CpG situadas en los la región promotora de los genes. En condiciones normales, el promotor de los genes transcripcionalmente activos se encuentra desmetilado, mientras que los genes silenciados tienen el promotor metilado. Se ha observado que el patrón de metilación del DNA es diferente en células normales y células neoplásicas, de manera que ciertos genes supresores de tumor se encuentran hipermetilados en gran número de neoplasias (Esteller, 2008; Biswas *et al.*, 2017).

1.2 METILACIÓN DEL DNA

1.2.1 Bases moleculares y regulación

La metilación del DNA se basa en la incorporación de un grupo metilo CH₃ en la posición C5 de una citosina, convirtiéndola en 5-metilcitosina. Generalmente esta modificación ocurre en las

citiosinas que preceden a una guanina (CpG). Estas CpGs se suelen concentrar en las regiones promotoras de los genes y se denominan islas CpG. Las DNA metiltransferasas (DNMTs) son las enzimas encargadas de la catalización de la reacción, transfiriendo el grupo metilo de una S-adenosil-metionina a una citosina (Figura 5).

De la familia de DNMTs solamente DNMT1, DNMT3a y DNMT3b están involucradas en la metilación de las citosinas. DNMT1 actúa como enzima de mantenimiento de metilación copiando el patrón de la metilación a la cadena hija en cada replicación, mientras que DNMT3a y DNMT3b son las encargadas de la metilación *de novo* que ocurre durante la embriogénesis (Zhang *et al.*, 2017).

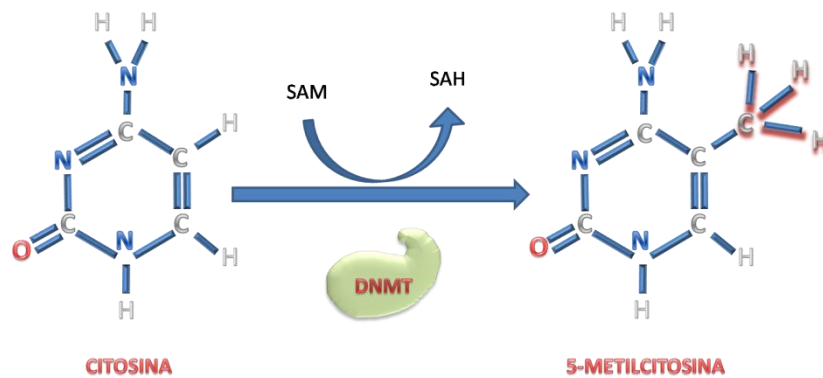


Figura 5. Reacción de metilación. Las DNMTs catalizan la reacción de metilación incorporando un grupo metilo a la posición 5 de una citosina, convirtiéndola en 5-metilcitosina gracias a la donación de un grupo metilo por parte de una S-adenosil-metionina. (SAM: S-adenosil-metionina, SAH: S-adenosil-homocisteína).

Todavía se desconoce el mecanismo preciso por el que los genes con promotores metilados se encuentran silenciados, las hipótesis proponen que existiría una inhibición del anclaje del complejo de transcripción. Se ha descrito que la metilación de estas islas CpG podría crear una barrera física para el anclaje de determinados factores de transcripción. Un ejemplo sería la metilación de la secuencia correspondiente al lugar de anclaje del factor de transcripción CTCF que impide su unión y, por tanto, la transcripción de diversos genes (Kulis *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2010).

Otra hipótesis más extendida de mecanismo de inhibición de expresión mediado por la metilación del DNA es el reclutamiento de proteínas *methyl-binding domain* (MBD) que a su vez reclutarían deacetilasas de histonas provocando una mayor compactación del DNA (Kulis *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2015) (Figura 6).

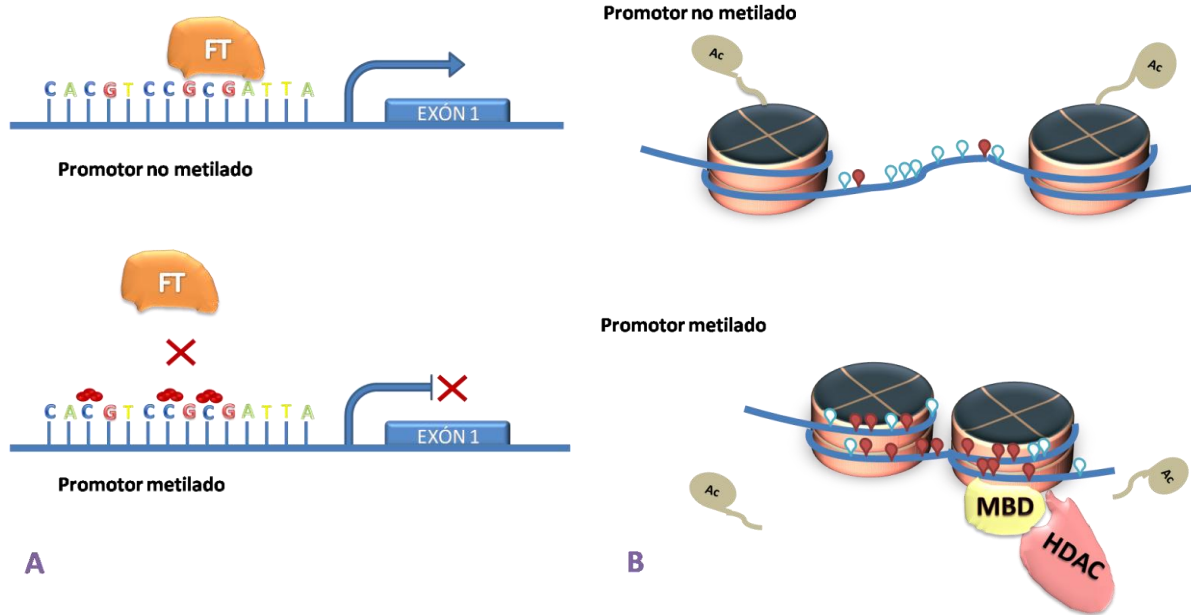


Figura 6. Hipótesis de silenciamiento de genes mediada por metilación del DNA

A) Hipótesis de barrera física para factores de transcripción; la metilación de CpG en el promotor de genes impediría el anclaje de determinados factores de transcripción y, por tanto, la transcripción del gen (FT: Factor de transcripción).

B) Hipótesis de reclutamiento de HDAC mediado por MBD; la metilación de CpG reclutaría a proteínas MBD que a su vez reclutarían a deacetilasas de histonas provocando una compactación de la cromatina (MBD: Proteínas *Methyl-binding domain*, HDAC: Deacetilasa de histonas, Ac: Acetilación).

1.2.2 Metilación del DNA en cáncer

En la gran mayoría de neoplasias se ha observado que el patrón de metilación del DNA va cambiando a lo largo de la progresión de la enfermedad y respecto al patrón de las células normales. Durante este proceso generalmente se observa una hipometilación global que suele afectar a regiones ricas en secuencias repetitivas de DNA, localizadas en zonas de heterocromatina o secuencias de DNA repetitivo (Ej. elementos LINE, SINE, Alu). Estas regiones se encuentran normalmente metiladas y una hipometilación puede generar una inestabilidad genómica que ayuda a la progresión de la enfermedad. Aunque menos descrita, la hipometilación de promotores de oncogenes también podría influir en esta progresión. También se ha descrito que la hipometilación en las regiones exónicas de determinados genes podría facilitar el anclaje del complejo de transcripción y crear transcritos que podrían, a su vez, influir en la progresión de la neoplasia (Portela *et al.*, 2010).

En el transcurso de la enfermedad también se observa hipermetilación de promotores de ciertos genes que en el tejido normal permanecen desmetilados. La mayoría de estos genes son supresores de tumor y su hipermetilación conlleva a una desregulación de importantes

vías de señalización. Genes como *GSTP1* en cáncer de próstata, *BRCA1* en cáncer ovario y mama, *DAPK* en cáncer de pulmón, *P16* en colon y pulmón, *P15* en leucemias, *MGMT* en glioma o *CDH1* en cáncer gástrico, se han encontrado frecuentemente metilados (Esteller *et al.*, 2000; Grady *et al.*, 2000; Cairns *et al.*, 2001; Hegi *et al.*, 2005).

Aunque con frecuencia determinados genes se encuentren metilados en más de un tipo de neoplasia, cada patología tiene un patrón de metilación que puede caracterizarla e incluso utilizarse como marcador de progresión o de detección precoz de la enfermedad. De la misma manera la búsqueda de genes hipermetilados podría ser una herramienta para identificar estos posibles marcadores (Esteller, 2008).

1.2.3 Metilación en Mieloma Múltiple

En el MM se ha observado un proceso de hipometilación global en una fase temprana que va incrementando durante el progreso de la enfermedad. Por otra parte, también se ha observado hipermetilación de regiones promotoras y regiones ricas en islas CpG que inactiva genes implicados en procesos como: la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA o la apoptosis (Salhia *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011).

Diversos estudios de metilación global en neoplasias de CP han mostrado una disminución de ésta al comparar entre CP normales y neoplásicas, además han encontrado diferencias significativas entre los diferentes estadios de la enfermedad (Bollati *et al.*, 2009; Salhia *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011; Agirre *et al.*, 2015). Recientemente, la hipometilación global se ha relacionado con mal pronóstico y con una posible transición de CP normales a CP clonales en estadios de GMSI o MM (Bollati *et al.*, 2009; Salhia *et al.*, 2010; Agirre *et al.*, 2015; Sive *et al.*, 2016). Específicamente, Aoki *et al.* (2012) observaron que la hipometilación de secuencias LINE-1 podría relacionarse no solo con la progresión de la enfermedad, sino con un peor pronóstico en MM, asociándose a cariotipos no hiperdiploides. En dicho trabajo postulan que la hipometilación de secuencias repetitivas podría derivar en pérdidas o aumento de alteraciones cromosómicas.

La hipermetilación en promotores de genes supresores de tumor también se ha descrito en MM. En los estudios que analizan la metilación global, si bien no se encuentra tan frecuentemente como la hipometilación, se observa que existe un aumento de metilación de promotores de genes a lo largo de la evolución de la enfermedad (Salhia *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011; Agirre *et al.*, 2015). En estos estudios, la hipermetilación en promotores de determinados genes, como *GPX3*, *RBP1*, *SPARC*, *TGFB1* y *CDKN2A*, se ha correlacionado con un

mal pronóstico de la enfermedad y con factores de pronóstico adverso como la t(4;14)(Kaiser *et al.*, 2013; Agirre *et al.*, 2015). Sin embargo, el número reducido de pacientes estudiados en los estadios previos a MM (GMSI y SMM) no permite concluir que exista una relación directa entre la progresión de la enfermedad y la metilación de los genes mencionados.

Diversos estudios de metilación en genes concretos han mostrado varios genes hipermetilados en MM, entre ellos inhibidores del ciclo celular (*CDKN2A*, *CDKN2B*), implicados en apoptosis (*DAPK*), reguladores de la vía de señalización JAK/STAT (*SOCS1*, *SHP1*) o relacionados con quimioresistencia (*TGFB1*, *SPARC*) (Wong and Chim, 2015). Algunos de estos estudios han comparado la metilación de estos genes en diferentes estadios de la enfermedad. En genes como *CDKN2A*, *SOCS1*, *SHP1* o *CDH1* se han encontrado diferencias significativas entre pacientes con GMSI y MM en la metilación de sus promotores (Sharma *et al.*, 2010).

1.2.4 Características de los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* hipermetilados en MM

1.2.4.1 *CDH1*

El gen *CDH1* se sitúa en la región cromosómica 16q22.1 y codifica para una proteína con importancia en el fenotipo epitelial creando uniones célula-célula. La pérdida de expresión de *CDH1* es una de las causas principales del proceso de des-diferenciación de células epiteliales a células mesenquimales observado en determinados tumores sólidos (Hay, 1995). *CDH1* no solo media la estabilidad de la adhesión celular, sino que su unión con β -cateninas y α -cateninas a nivel intracelular crea una serie de cascadas de señalización que regulan la expresión de determinados genes. Una de estas vías de señalización es la de Wnt, la que permite la translocación de β -catenina citoplasmática al núcleo, donde activa la expresión de genes de proliferación celular como *C-MYC* (Gumbiner, 1995; Taddei *et al.*, 2002).

CDH1 se ha catalogado como un gen supresor de metástasis debido a su capacidad supresora de invasión celular. El estado de metilación del promotor de *CDH1* se ha analizado en diversas neoplasias, su expresión está reducida o silenciada en algunos tipos de cáncer de mama, gástrico, colorectal, pancreático o el hepatocarcinoma (Field, 1992; Shirahama *et al.*, 1996; Zhai *et al.*, 2008; Molina-Ortiz *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2011). Debido a su expresión reducida o silenciada en diversos tumores sólidos, y a que podría tener un papel en la maduración de los progenitores eritropoyéticos y en la apoptosis, también se ha analizado su metilación en

algunas neoplasias hematológicas, encontrándose hipermetilado en las leucemias agudas y en los síndromes mielodisplásicos (Corn *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2008).

En MM el gen *CDH1* se encuentra hipermetilado en el 22-56% de los pacientes, sin embargo hay pocos estudios que analicen la frecuencia de metilación de este gen en GMSI. En éstos se encuentran diferencias entre las frecuencias de metilación en GMSI y MM, sugiriendo que pudiera ser un posible marcador de evolución de la enfermedad (Galm *et al.*, 2004; Chim *et al.*, 2007; Seidl *et al.*, 2004).

1.2.4.2 *P15* y *P16*

p15^{INK4B}/CDKN2B y *p16^{INK4A}/CDKN2A* están implicados en la regulación del ciclo celular y son dos miembros de la familia INK4 que se encuentran en el locus *INK4b-ARF-INK4a* localizado en 9p21, y actúan como inhibidores de las kinasas dependientes de ciclina (CDK), específicamente de CDK4 y CDK6. Estas CDK inducen la activación de la E-CDK2, responsable de la fosforilación de la familia de proteínas del retinoblastoma, permitiendo así la transcripción de los genes bajo el control de los factores de transcripción E2F. La activación de CDK es necesaria para la iniciación de la síntesis de DNA, salir del estado de quiescencia y progresar a la fase S. La regulación de este mecanismo lo realizan de *p15^{INK4B}* y *p16^{INK4A}*, que son los responsables de detener la progresión del ciclo celular de G1 a S, inhibiendo la regulación positiva de la progresión que ejercen las CDK. Esto hace que estos dos genes se encuentren implicados en las principales vías de supresión de tumores, participando en la regulación de la senescencia celular y apoptosis. Es por ello que han sido objeto de estudio en tumores donde estas vías están frecuentemente alteradas (Gil *et al.*, 2006).

Debido a ser genes importantes en la regulación de la apoptosis y genes supresores de tumor conocidos, la metilación de los genes del locus *INK4b-ARF-INK4a* se ha analizado tanto en MM como en GMSI, siendo de *p16^{INK4A}* del que se tiene más información (Ng *et al.*, 1999; Chim *et al.*, 2003).

En MM la metilación de *p16^{INK4A}* se ha observado entre el 7-53% de los casos (Braggio *et al.*, 2010; Yuregir *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010). Algunos estudios han descrito diferencias significativas en las frecuencias de metilación entre MM y GMSI (Mateos *et al.*, 2001; Chim *et al.*, 2007). Además han observado relación entre metilación de *p16^{INK4A}* y algunas características clínico-biológicas como CP, de B2M y LDH así como con peor pronóstico, lo que relaciona a la metilación de *p16^{INK4A}* con una progresión de la enfermedad (Galm *et al.*, 2004; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2010).

La metilación de $p15^{INK4B}$ en MM la presentan entre el 2-35% de los casos, y solo existen cinco estudios que comparen la metilación de $p15^{INK4B}$ entre MM y GMSI, no encontrando ninguno de ellos diferencias significativas entre las frecuencias de metilación (Guillerm *et al.*, 2001; Seidl *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2008; Stanganelli *et al.*, 2010; Geraldés *et al.*, 2016).

1.2.4.3 *BIK*

El gen *BIK* pertenece a la familia de proteínas pro-apoptóticas BH3-only *bcl2* y se encuentra en 22q13.3. Se localiza en el retículo endoplasmático y se postula que su papel en la apoptosis es a través de vías de señalización mitocondriales (Chinnadurai *et al.*, 2008).

Debido a su función pro-apoptótica, ha sido objeto de estudio en diferentes neoplasias como el glioma, cáncer colo-rectal, o linfoma B periférico donde se han descrito deleciones y mutaciones (Arena *et al.*, 2003; Bredel *et al.*, 2005). En el carcinoma de células renales la expresión de *BIK* es menor respecto a células normales de riñón, y se ha observado una pérdida de heterocigosidad tanto por deleción como por silenciamiento epigenético de su promotor (Daniel *et al.*, 1999). Dai *et al.* (2006) observan un aumento en la expresión de *BIK* en líneas celulares de diferentes tumores sólidos al tratarlas con azacitidina, lo que podría indicar que este gene estaría silenciado epigenéticamente (Dai *et al.*, 2006).

En lo referente a su metilación en MM solamente existe un estudio en el que se relaciona con resistencia al tratamiento. Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio en una serie de pacientes afectados de GMSI (Hatzimichael *et al.*, 2012).

1.3 Técnicas de detección de metilación del DNA

Como se ha mencionado, la metilación del DNA se basa en la incorporación de un grupo metilo a una CpG, por tanto los métodos utilizados en el análisis de metilación están dirigidos a la detección de CpG metiladas.

Existen tres métodos fundamentales para el análisis de metilación, los basados en enzimas de restricción metil-sensibles, en la inmunoprecipitación de cromatina, y en la conversión del DNA mediante bisulfito, siendo este último el más ampliamente utilizado en el estudio de metilación de promotores génicos.

Enzimas de restricción metil-sensibles

Esta técnica fue de las primeras en describirse y se basa en el reconocimiento, por parte de enzimas de restricción como HpaII, SacII, NotI, y BstUI, de secuencias diana no metiladas, no pudiendo cortar las secuencias metiladas. Tiene la desventaja de detectar únicamente aquellas CpG que se encuentran en la secuencia diana para una enzima de restricción (Kulis *et al.*, 2010). No ha sido muy utilizada en el estudio de metilación del DNA en MM, donde se han utilizado otras técnicas más sencillas y específicas (Mateos *et al.*, 2002).

Inmunoprecipitación de cromatina

Esta técnica se basa en la detección de CpG metiladas por anticuerpos de forma que ensayos tipo ELISA permiten detectar el porcentaje de CpG metiladas. También puede servir para, tras inmunoprecipitación de los fragmentos metilados, realizar un análisis mediante *microarrays* (MeDIP)(Kulis *et al.*, 2010). Es una técnica útil a la hora de identificar y cuantificar la metilación global, sin embargo en MM existen pocos estudios que utilicen esta técnica (Kalushkova *et al.*, 2010; Aoki *et al.*, 2012).

Conversión del DNA mediante bisulfito

Esta técnica se basa en la propiedad del bisulfito de convertir las citosinas en uracilos. Las citosinas metiladas adquieren una protección ante esta conversión, de manera que solo aquellas citosinas no metiladas se convertirán en uracilo mientras que las metiladas permanecerán como citosinas.

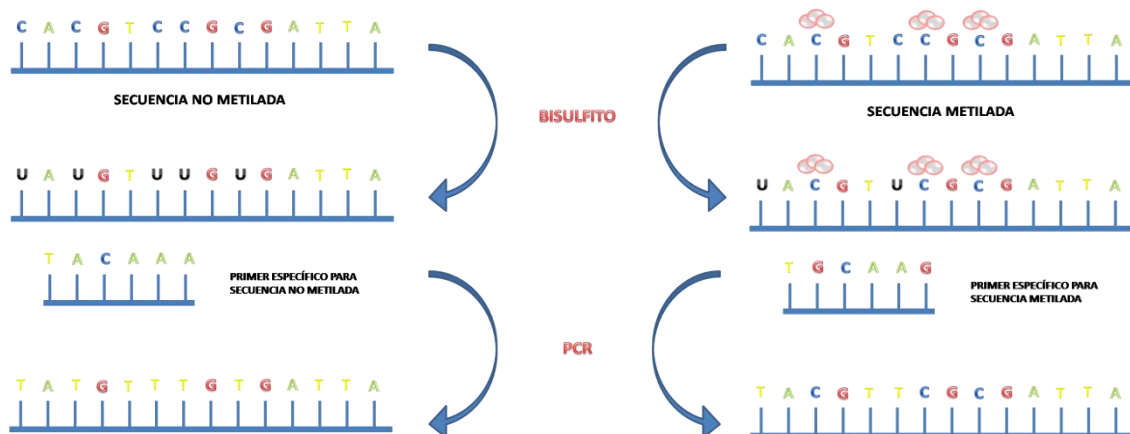


Figura 7. Técnica de detección de metilación MS-PCR. El DNA se trata con bisulfito que convertirá solamente aquellas citosinas no metiladas en uracilos, dejando las metiladas como citosinas. La MS-PCR se basa en la elaboración de *primers* específicos tanto para la secuencia metilada como para la no metilada, de esta manera tras la PCR se obtiene una u otra secuencia dependiendo de si la cadena original se hallaba o no metilada.

A partir de esta base existen diferentes técnicas para la detección de CpG metiladas. La técnica más rápida y sencilla es la PCR específica de metilación (MS-PCR), que se basa en la elaboración de *primers* específicos tanto para la secuencia metilada como para la no metilada (Herman *et al.*, 1996) (Figura 7). También se pueden utilizar técnicas de cuantificación específicas de metilación, o técnicas de secuenciación como la pirosecuenciación o secuenciación masiva para el análisis de múltiples CpG.

En los estudios de metilación de promotores génicos en MM la conversión mediante bisulfito es la técnica que más se ha utilizado, tanto para el análisis por PCR convencional como para secuenciación masiva (Salhia *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011; Kaiser *et al.*, 2013).

1.4 Objetivos

1. Realizar la puesta a punto de la técnica de extracción de DNA a partir de células de MO fijadas tras cultivo celular en nuestro laboratorio.
2. Realizar la puesta a punto de la técnica de MS-PCR para los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK*.
3. Analizar la presencia de metilación en el promotor de los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en:
 1. Individuos control sanos.
 2. Una serie de pacientes afectos de GMSI, SMM o MM.
3. Establecer la frecuencia de metilación en pacientes en los diferentes estadios de la enfermedad:
 1. Comparar la frecuencia de casos con metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* entre estadios asintomáticos y MM.
 2. Comparar la frecuencia de metilación al diagnóstico y en el seguimiento de la enfermedad en MM para detectar posibles marcadores de progresión de la enfermedad.
 3. Analizar la metilación global mediante la comparación del número de genes metilados entre estadios asintomáticos y MM.
4. Evaluar la relación entre metilación y variables clínico-biológicas relevantes en pacientes afectos de GMSI, SMM y MM.
5. Evaluar la posible relación entre metilación en los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* y supervivencia global.

2. PACIENTES Y METODOLOGÍA

2.1 Pacientes y controles

Se realizó un estudio retrospectivo en 103 pacientes diagnosticados de MM, GMSI o SMM entre los años 1990 y 2014, 46 provenían del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona), 23 del Hospital del Mar (Barcelona), 18 del Hospital de Galdakao (Bilbao), y 16 del Hospital Morales Messeguer (Murcia). El estudio fue aprobado por los comités de ética de dichos hospitales y se dispone del consentimiento informado previo firmado por los pacientes.

De todos los pacientes incluidos, 41 presentaban GMSI, 7 SMM y 55 MM. De los pacientes afectos de MM 25 se estudiaron al diagnóstico y 30 en algún momento del seguimiento de la enfermedad (enfermedad refractaria o recaída). Se descartaron aquellas muestras de pacientes sin enfermedad visible post tratamiento. También se descartaron las muestras de aquellos pacientes sometidos a trasplante tanto autólogo como alogénico.

Como controles de metilación de los genes *CDH1*, *P15*, *P16*, *BIK* se utilizaron las muestras de SP de 33 individuos sanos de edades comprendidas entre los 25 y los 45 años.

2.2 Metodología

2.2.1 Extracción del DNA

El DNA de los pacientes y de 15 controles fue extraído mediante el protocolo de extracción de DNA convencional con fenol-cloroformo a partir de células de MO fijadas en Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) tras el cultivo celular destinado al estudio citogenético de dichos pacientes. El DNA de las 18 muestras control restantes se realizó a partir de SP total. Antes de proceder a la extracción del DNA se midió la turbidez del material fijado mediante la lectura de la absorbancia a 580 nm, descartando aquellas muestras con una turbidez inferior a 0,5 ya que mostraban una concentración muy baja e insuficiente de DNA para la realización de los estudios, tal y como se había demostrado anteriormente (Chicano, 2012). A continuación se realizó un lavado con una solución Tris-HCl 1M, MgCl₂ 1M, NaCl 5M, tras el cual se procedió a la digestión con proteinasa K a 37°C durante una noche y a la extracción de DNA.

El DNA obtenido se precipitó con 1/10 volúmenes de NaCl 3M y 1,5 volúmenes de etanol absoluto. Si no se observaba la formación de la medusa de DNA se dejaba precipitar en el congelador toda la noche. Tras una centrifugación a máxima velocidad, se realizó un lavado del

pellet de DNA con etanol al 70%, centrifugando de nuevo a máxima velocidad y dejando secar el *pellet* a temperatura ambiente (TA). El DNA obtenido se resuspendió en 20-50 μ L de tampón Tris-EDTA dependiendo del tamaño del botón original.

La concentración de DNA se determinó en un espectrofotómetro mediante la lectura de la absorbancia a 260nm. Sólo se consideraron adecuadas aquellas muestras con concentraciones superiores a 200 μ g/mL o con un volumen suficiente para la determinación de la metilación de los cuatro genes a analizar. Para determinar la pureza del DNA relativa a las proteínas se consideró adecuada una ratio de absorbancia 260/280 nm de un valor superior a 1,6. El estado de la calidad del DNA se comprobó mediante un gel de agarosa al 2% en el que se cargaron 200ng de DNA por muestra. Se descartaron aquellas muestras que presentaban un DNA totalmente degradado (Fig 8).

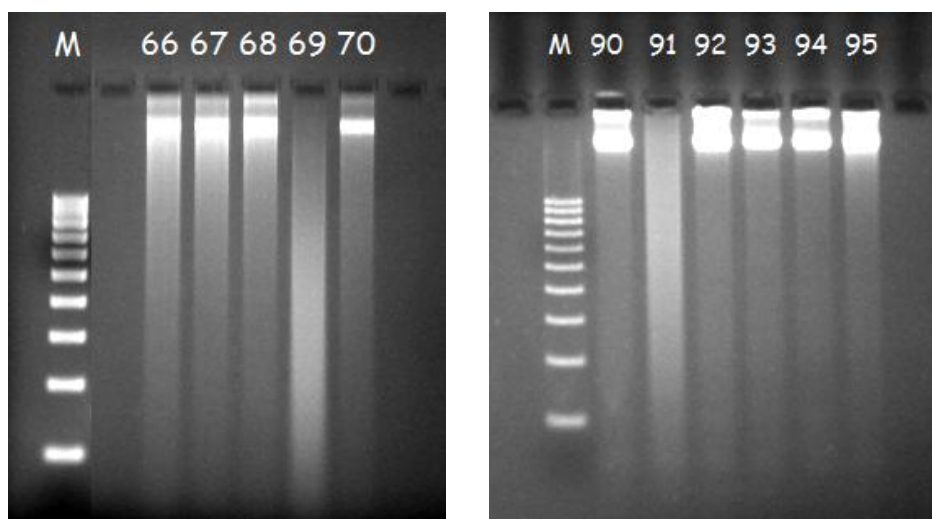


Figura 8. Estado del DNA a partir de muestras fijadas en Carnoy

En las imágenes se observa que el DNA de las muestras 69 y 91 se encuentra degradado, descartándose este tipo de muestras para el posterior análisis de metilación

2.2.2 Tratamiento del DNA con bisulfito

El tratamiento del DNA con bisulfito sódico se realizó utilizando el kit *EZ DNA methylation-Gold™* kit (Zymo Research, Irvine, USA), siguiendo los pasos indicados por la casa comercial. Este kit integra los pasos de desnaturalización y conversión del DNA mediante bisulfito en uno solo gracias a la introducción de ciclos de incubación a 98 $^{\circ}$ C y 64 $^{\circ}$ C.

Para el tratamiento con bisulfito se utilizaron de 250 ng a 2 μ g de DNA en un volumen de 20 μ L de H₂O, de acuerdo con las especificaciones del kit de metilación. A los 20 μ L de muestra se le añadieron 130 μ L del reactivo de conversión, previamente reconstituido con *buffer* de dilución,

buffer de disolución y agua destilada. El programa del termociclador utilizado para la conversión constó de un paso de 10 min a 98°C y un paso de 2h30min a 64°C. El producto obtenido se pasó por una columna que contenía 600µL de *buffer* de unión, y se mezclaron por inversión. Tras una centrifugación a máxima revolución de 30s se descartó el diluyente y se lavó la columna con *buffer* de lavado. A continuación se descartó el diluyente y a la columna se añadió el *buffer* de desulfonación y se dejó incubar a TA durante 20 min. Tras la incubación se realizaron otros dos lavados de la columna y por último se añadieron 10µL de tampón de elución, se centrifugó la muestra 30s a máxima revolución y esta vez no se descartó el diluyente.

Una vez obtenido el DNA modificado se midió su concentración final utilizando el *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo, Wilmington, USA). La muestra se diluyó en el mismo tampón de elución proporcionado por el kit a fin de obtener una concentración final de DNA de 20ng/µL.

2.2.3 Técnica de MS-PCR

La amplificación por PCR de los genes *P15*, *P16*, *CDH1* y *BIK* se realizó utilizando los *primers* diseñados tanto para la secuencia metilada como para la no metilada descritos en la literatura y cuyas características se indican en la tabla 7.

La puesta a punto de la la PCR específica de secuencia no metilada se realizó con DNA obtenido de material fijado en Carnoy de un individuo sano, mientras que la de secuencia metilada se realizó con DNA genómico totalmente metilado, *CpGenome™ Universal Methylated DNA* (Intergen, New York, USA). Para las reacciones de PCR se utilizó una Taq *HotStart* a fin de reducir las inespecificidades, en este caso la Taq utilizada fue *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen, Brazil).

Para los genes *P15* y *P16* las concentraciones finales de los reactivos de la MS-PCR fueron: 1X de *Buffer*, 1,5mM de Cloruro de Magnesio, 0,2mM de dNTPs, 0,2µM de cada *primer*, *forward* y *reverse*, 1U de Taq y 50ng de DNA. Para los genes *CDH1* y *BIK* las concentraciones utilizadas fueron las mismas que las anteriores excepto la concentración de Cloruro de Magnesio que fue de 2mM. En cada reacción de PCR se utilizaron 50ng de DNA obtenido en la conversión por bisulfito.

Las condiciones de los ciclos de amplificación de la MS-PCR para los cuatro genes se indican en la tabla 8.

Tabla 7. Detalle de las secuencias utilizadas para la amplificación de los productos metilados y no metilados así como el tamaño del producto para cada uno de los cuatro genes analizados.

GEN	Secuencia	Tamaño producto (pb)	Referencias
<i>CDH1</i>	Metilado Forward	GTG GGC GGG TCG TTA CTT TC	(Herman <i>et al.</i> , 2003)
	Metilado Reverse	CTC ACA AAT ACT TTA CAA TTC CGA CG	
	No metilado Forward	GGT GGG TGG GTT GTT AGT TTT GT	
	No metilado Reverse	AAC TCA CAA ATC TTT ACA ATT CCA ACA	
<i>P15</i>	Metilado Forward	GCG TTC GTA TTT TGC GGT T	(Herman <i>et al.</i> , 1996)
	Metilado Reverse	CGT ACA ATA ACC GAA CGA CCG A	
	No metilado Forward	TGT GAT GTG TTT GTA TTT TGT GGT T	
	No metilado Reverse	CCA TAC AAT AAC CAA ACA ACC AA	
<i>P16</i>	Metilado Forward	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC	(Herman <i>et al.</i> , 1996)
	Metilado Reverse	GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA	
	No metilado Forward	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT	
	No metilado Reverse	CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A	
<i>BIK</i>	Metilado Forward	GGG AGT CGT GTT TAG GTT TTA TC	(Hatzimicha el <i>et al.</i> , 2012)
	Metilado Reverse	GAA CAA AAA AAA TAC GTT TCG AA	
	No metilado Forward	GGG GAG TTG TGT TTA GGT TTT ATT	
	No metilado Reverse	CAA ACA AAA AAA ATA CAT TTC AAA	

pb = pares de bases

Tabla 8. Características de la MS-PCR para cada gen

Condiciones finales de las PCRs para la amplificación de los productos metilados y no metilados de cada uno de los cuatro genes analizados.

	Pre-desnaturalización	Amplificación			Elongación final	
		Ciclos	Desnaturalización	Annealing		
<i>CDH1 M</i> <i>CDH1 U</i>	95°C --- 5min	40	94°C --- 30s	58°C --- 30s 58°C --- 30s	72°C --- 30s	72°C --- 7min
<i>P15 M</i> <i>P15 U</i>	95°C --- 5min	35	94°C --- 30s	61°C --- 60s 59°C --- 60s	72°C --- 60s	72°C --- 10min
<i>P16 M</i> <i>P16 U</i>	95°C --- 5min	35	94°C --- 30s	63°C --- 60s 51°C --- 60s	72°C --- 60s	72°C --- 10min
<i>BIK M</i> <i>BIK U</i>	95°C --- 5min	40	94°C --- 30s	56°C --- 30s 56°C --- 30s	72°C --- 30s	72°C --- 7min

M=Secuencia metilada, U=Secuencia no metilada

2.2.4 Validación de la técnica mediante secuenciación

Los productos de la MS-PCR de cada gen, tanto los de la secuencia metilada como los de la no metilada, se validaron por secuenciación SANGER. Para ello se purificaron los productos de PCR de un individuo control, del DNA control metilado y de cuatro pacientes que presentaban metilación en alguno de los cuatro genes estudiados. Tras la purificación se secuenciaron bidireccionalmente y se analizaron en un secuenciador automático en el *Servei de Genòmica i Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB)* en la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa *Chromas Lite vs 2.3* (Technelysium Pty Ltd, Australia). Se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia de cada gen convertida con bisulfito sódico utilizando la herramienta facilitada en la web de *Zymo Research Bisulfite Primer Seeker 12S* (<http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker>).

2.2.5 Análisis estadístico

Para las variables categóricas, en la correlación entre el estado de metilación de cada gen y las diferentes variables clínico-biológicas, así como los diferentes estadios de la patología se utilizó el test de Fisher o el test de Chi-cuadrado. Para las variables cuantitativas se utilizó el test no paramétrico de U Mann-Whitney, tras comprobar la normalidad por los estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. La SG se analizó mediante curvas Kaplan Meyer y las diferencias se estimaron por el test *log-rank*. Tanto para el análisis de los *Hazard ratios* (HR) como para el análisis multivariante de la SG se utilizó la regresión de Cox. Se consideraron como valores estadísticamente significativos aquellos con una p igual o inferior a 0,05.

El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS (SPSS, PAWS Statistics 21).

3. RESULTADOS

3.1 Validación de la técnica MS-PCR para los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK*

La validación de la técnica de MS-PCR para cada uno de los genes se realizó mediante la secuenciación de los productos amplificados en la misma. Para la validación de la MS-PCR de la secuencia no metilada se secuenció el producto del DNA de un individuo control sin metilación en los cuatro genes, y para la validación de la MS-PCR de la secuencia metilada, el DNA control metilado y el DNA de un paciente con un gen metilado, este último para verificar la metilación completa del producto amplificado.

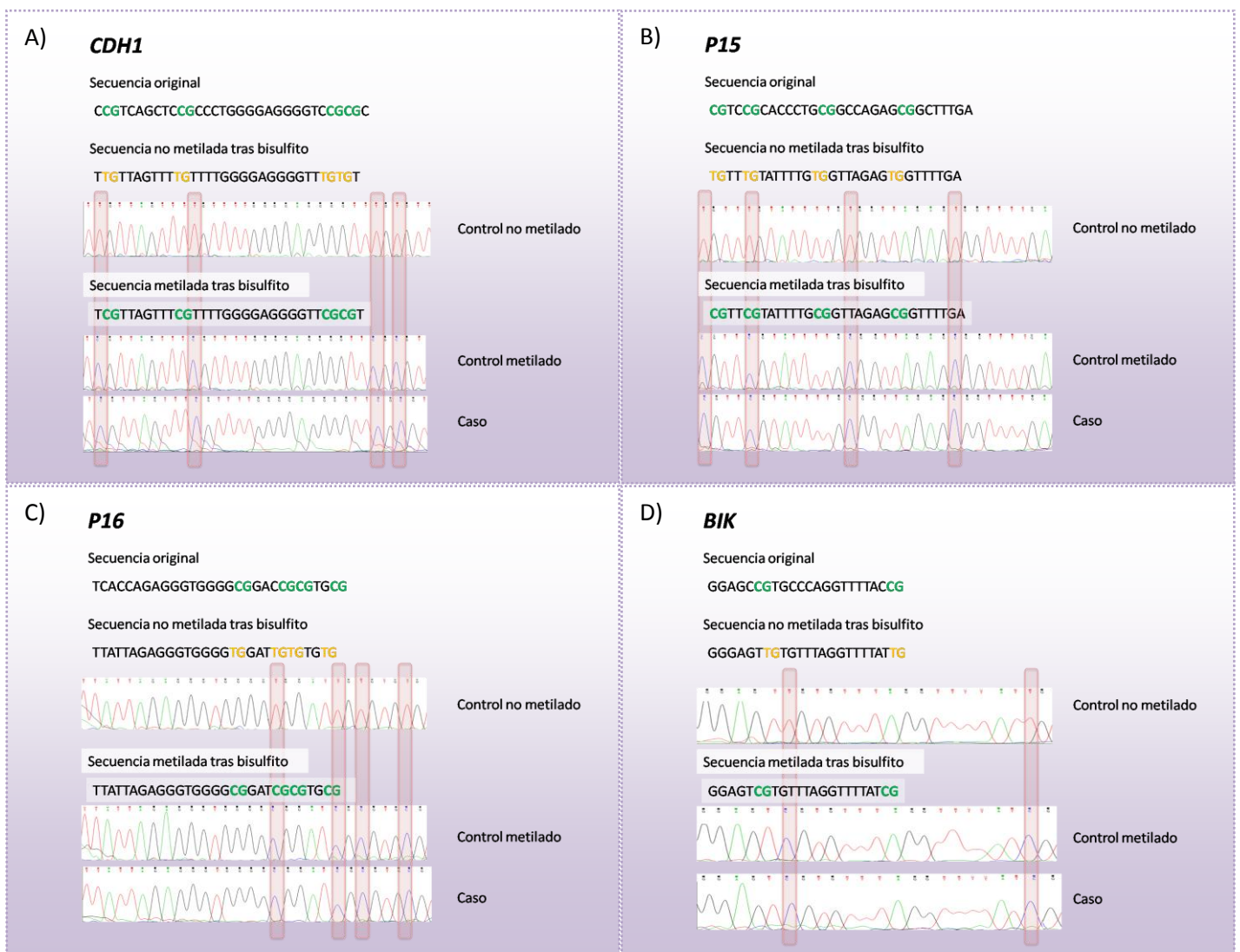


Figura 9. Resultados de la secuenciación de los productos de la MS-PCR para los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK*
Secuencia original y resultado de la secuenciación de los productos de DNA de un individuo control sano, DNA control metilado y DNA de un paciente con metilación: A) Gen *CDH1*, B) Gen *P15*, C) Gen *P16*, D) Gen *BIK*.

En la figura 9 se muestra un fragmento de las secuencias originales del promotor de cada uno de los genes así como las secuencias, tanto metiladas como no metiladas, post modificación con bisulfito para dicho fragmento y el resultado de la secuenciación para cada gen. Se puede observar que en las secuencias no metiladas las citosinas originales han pasado a timinas, mientras que en las secuencias metiladas esto solo ocurre en las citosinas no metiladas. De esta forma se comprobó que los productos obtenidos en la MS-PCR correspondían exactamente a la secuencia modificada con bisulfito de referencia de cada gen.

Con estos resultados queda validada la técnica de MS-PCR con DNA obtenido de muestras fijadas con Carnoy.

3.2 Características clínico-biológicas de los pacientes

De todos los pacientes estudiados se recogieron los datos clínico-biológicos más relevantes para el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad. La determinación de los marcadores bioquímicos se realizó en suero, excepto el porcentaje de CP que se realizó en MO. Las características clínico-biológicas de todos los pacientes se resumen en la tabla 9.

Tanto en GMSI, SMM como MM, el sexo más frecuente fue el femenino, los isotipos del CM más frecuentes fueron IgA e IgG, siendo esta última la más frecuente en los tres grupos. Los pacientes afectados de GMSI y SMM presentaron con más frecuencia una cadena ligera tipo *kappa* mientras que en los pacientes afectados de MM las frecuencias de ambos tipos fueron muy similares.

De acuerdo con lo esperado, los parámetros de riesgo de enfermedad establecidos por las guías internacionales, la media del CM, el porcentaje de CP en MO y los niveles de B2M fueron superiores en MM respecto a GMSI y SMM, mientras que los niveles de albúmina fueron menores.

El resto de parámetros analizados no presentaron diferencias destacables entre GMSI, SMM y MM.

Tabla 9. Características clínico-biológicas de los pacientes con GMSI, SMM o MM expresadas en porcentaje para las variables categóricas y en media o mediana junto con el rango para las variables continuas.

Características clínico-biológicas (rango)	GMSI (n=41)	SMM (n=7)	MM (n=55)
Sexo (F/M)	23/18	5/2	35/20
Mediana Edad (rango)	74 (40-86)	69 (39-82)	67 (38-90)
Isotipo (%)			
IgA	12 (29,3%)	1 (14,3%)	15 (27,3%)
IgG	23 (56,1%)	6 (85,7%)	30 (54,5%)
IgM	4 (9,8%)	0	1 (1,8%)
IgD	0	0	1 (1,8%)
Cadenas ligeras	1 (2,4%)	0	7 (12,7%)
ND	1 (2,4%)	0	1 (1,8%)
Cadena ligera (%)			
Kappa	25 (61%)	4 (57,1%)	27 (50%)
Lambda	15 (36,6%)	2 (28,6%)	26 (48,1%)
ND	1 (2,4%)	1 (14,3%)	2 (3,9%)
Media [CM] en suero (rango)	0,98 (0,15-3,7)	1,47 (0,74-2,36)	2,79 (0,1-11,1)
Media % CP en MO (rango)	3,53 (0,4-10)	6,15 (1,3-12)	27,04 (0,2-97)
Media B2M en suero (rango)	3,78 (1,24-16,45)	2,3 (1,3-2,8)	4,54 (1,1-16)
Media LDH en suero (rango)	352,02 (167-638)	333 (228-431)	363,74 (110-1427)
Media Albúmina en suero (rango)	4,11 (2,52-4,9)	3,9 (2,82-4,76)	3,61 (1,8-4,72)
Media Calcio en suero (rango)	9,45 (8,40-10,3)	9,61 (8,85-9,55)	9,45 (6,61-14,6)
Media Creatinina en suero (rango)	1,06 (0,6-2,93)	0,84 (0,56-1,34)	1,04 (0,38-2,6)

F=Femenino, M=Masculino, [CM]=Concentración componente monoclonal, ND=No disponible

3.3 Metilación en los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK*

3.3.1 Individuos control

En la cohorte de individuos control el porcentaje de casos con metilación para el gen *CDH1* mostró una incidencia del 51,5%, del 6,1% en *P15* y del 12,1% en *BIK*. Ninguno de los individuos analizados mostró metilación en el gen *P16* (tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia de individuos control con metilación en SP en los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK*.

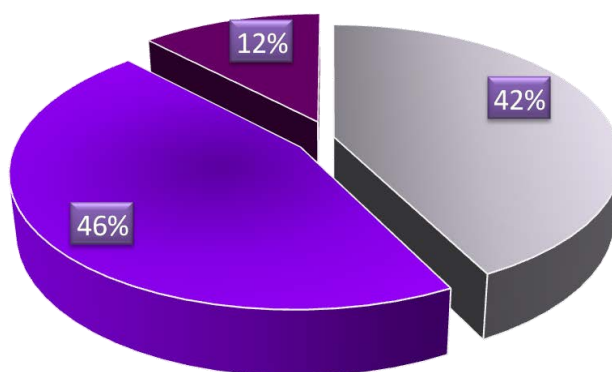
	CONTROLES	
	Metilados	No metilados
<i>CDH1</i>	51,5% (17/33)	48,5% (16/33)
<i>P15</i>	6,1% (2/33)	83,9% (31/33)
<i>P16</i>	0% (0/33)	100% (33/33)
<i>BIK</i>	12,1% (4/33)	87,9% (29/33)

En cuanto al número de genes que presentaban metilación, el 42,4% de los individuos no mostró metilación en los genes analizados. El 45,5% mostró metilación en uno de los genes, la mayoría correspondía a *CDH1* (n=13). Solamente el 12,1% mostró metilación en dos genes (*BIK* y *CDH1*). Ninguno de los individuos mostró metilación en tres o más genes (Fig 10).

Figura 10. Frecuencias de individuos control que presentaron metilación en 0,1,2 genes

Número de genes metilados		
0	1	2
42,4% (14/33)	45,5% (15/33)	12,1% (4/33)

Número de genes metilados



■ 0 genes metilados ■ 1 gen metilado ■ 2 genes metilados

3.3.2 Pacientes afectados de GMSI, SMM o MM

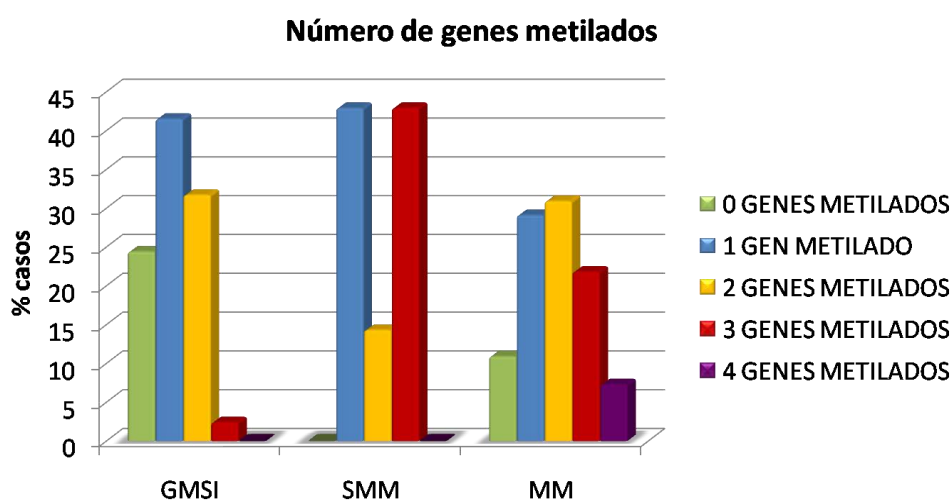
En la tabla 11 se indica el porcentaje de pacientes con metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en cada una de las cohortes de pacientes.

Tabla 11. Frecuencia de pacientes con metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en pacientes afectados de GMSI, SMM y MM.

	GMSI	SMM	MM
CDH1	61% (25/41)	85,7% (6/7)	72,7% (40/55)
P15	22% (9/41)	28,6% (2/7)	43,6% (24/55)
P16	12,2% (5/41)	28,6% (2/7)	40% (22/55)
BIK	17,1% (7/41)	57,1% (4/7)	29,1% (16/55)

Se observó como la frecuencia de casos con metilación aumentaba de GMSI a MM. Este aumento se observó para los cuatro genes analizados, mostrando diferencias significativas para los genes *P15* y *P16* ($p=0,027$, $p=0,003$ respectivamente por asociación lineal por lineal).

Figura 11. Porcentaje de pacientes que presentaban metilación en 0, 1, 2, 3, 4 genes en GMSI, SMM y MM



	Número de genes metilados				
	0	1	2	3	4
GMSI	24,4% (10/41)	41,5% (17/41)	31,7% (13/41)	2,4% (1/41)	0% (0/41)
SMM	0% (0/7)	42,9% (3/7)	14,3% (1/7)	42,9% (3/7)	0% (0/7)
MM	10,9% (6/55)	29,1% (16/55)	30,9% (17/55)	21,8% (12/55)	7,3% (4/55)

La metilación de los cuatro genes se observó únicamente en cuatro pacientes afectos de MM. El porcentaje de casos con tres genes metilados fue superior en SMM y MM respecto a GMSI donde solamente se encontró metilación de tres genes en un paciente. El porcentaje de casos con metilación en un solo gen se observó con una frecuencia similar en las tres cohortes y de dos genes metilados la incidencia fue similar en GMSI y MM, siendo más baja en SMM. El porcentaje de casos en los que ninguno de los cuatro genes presentaba metilación fue mayor en GMSI, presentándose esta situación solo en cuatro pacientes afectos de MM y en ninguno de los siete pacientes con SMM.

El porcentaje de casos con metilación en 0, 1, 2, 3 y 4 genes, para cada una de las cohortes, se encuentra indicado en la figura 11.

3.3.3 Comparación entre individuos control y pacientes

Para el análisis de los resultados en pacientes se les subdividió en dos grupos, el grupo pre-MM que engloba a los pacientes afectos de GMSI y SMM de bajo riesgo y el grupo de MM que engloba a los pacientes afectos de MM y a aquellos afectos de SMM que por sus características clínicas de acuerdo a la literatura se consideraron de alto riesgo y fueron sometidos a tratamiento. De los siete pacientes afectos de SMM de la serie, dos se clasificaron de alto riesgo asignándoles un estadio I según la clasificación ISS. Así, el grupo pre-MM comprendía a los pacientes afectos de GMSI y los cinco SMM de bajo riesgo, y el grupo MM, todos los pacientes afectos de MM y los dos SMM de alto riesgo.

Los porcentajes de pacientes con metilación en alguno de los cuatro genes de los diferentes grupos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Frecuencia de casos que presentaban metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* o en *BIK* en individuos control, en pacientes pre-MM y en MM.

	CONTROLES	PRE-MM	MM
<i>CDH1</i>	51,5% (17/33)	63% (29/46)	73,7% (42/57)
<i>P15</i>	6,1% (2/33)	19,6% (9/46)	45,6% (26/57)
<i>P16</i>	0% (0/33)	13% (6/46)	40,4% (23/57)
<i>BIK</i>	12,1% (4/33)	21,7% (10/46)	29,8% (17/57)

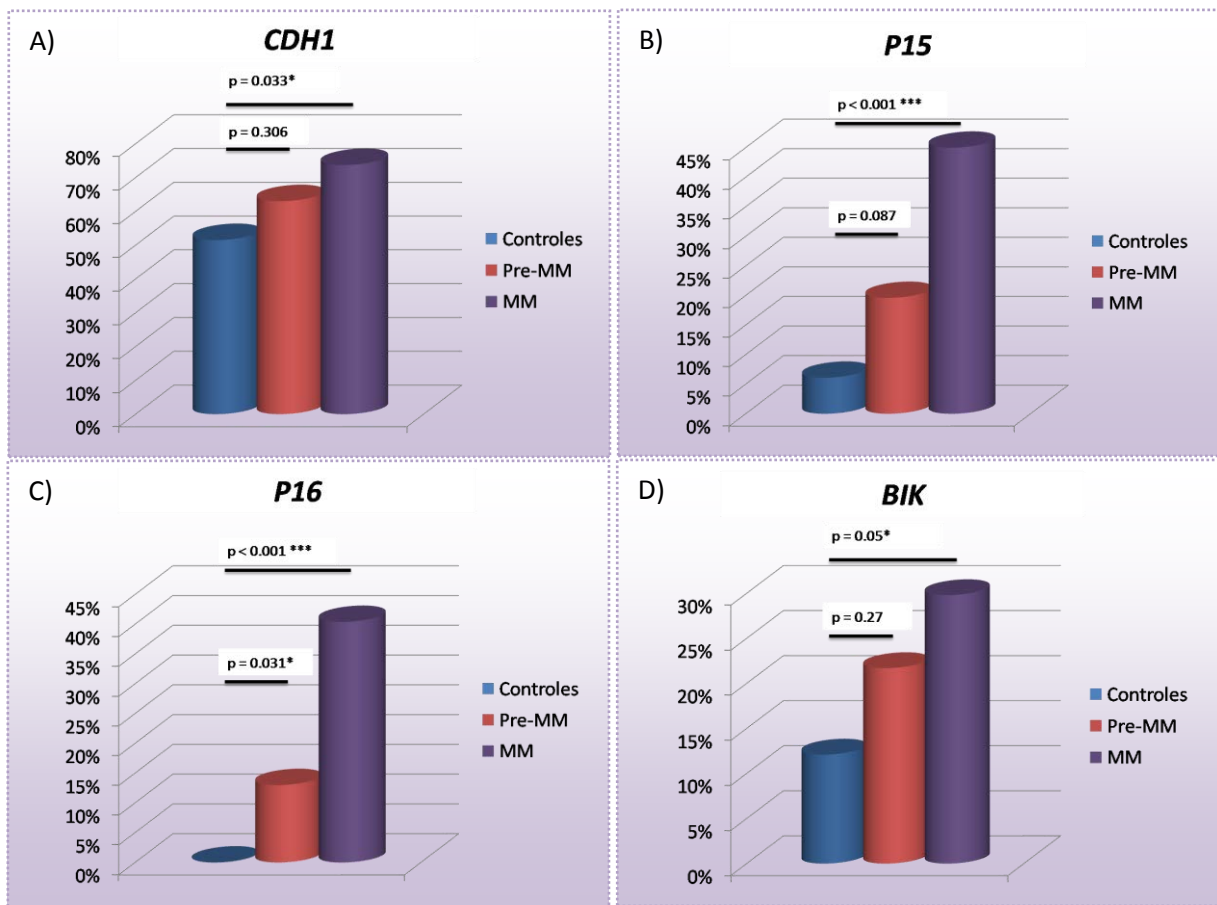


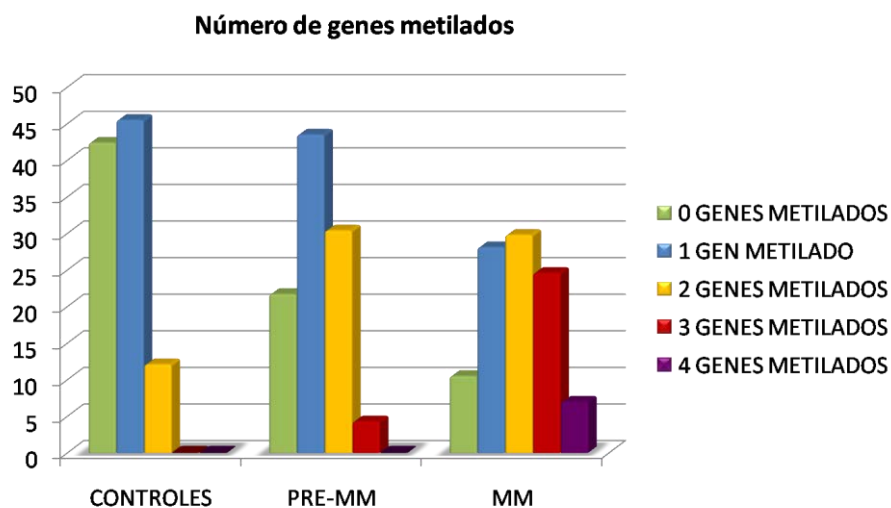
Figura 12. Comparación de las frecuencias de casos con metilación para cada uno de los cuatro genes entre individuos control y pacientes afectados de pre-MM o de MM. A) En el gen *CDH1*, B) En el gen *P15*, C) En el gen *P16*, D) En el gen *BIK*.

Se compararon las frecuencias de casos con metilación entre individuos control y pacientes clasificados bien como pre-MM o como MM. Al comparar los individuos control y pre-MM se observó que el porcentaje de casos con metilación en *CDH1*, *P15* y *BIK* no presentaba diferencias significativas, mostrando una frecuencia de casos con metilación en *P16* significativamente superior en pacientes pre-MM vs controles ($p=0,031$) y una tendencia a un mayor porcentaje de metilación en *P15* en pacientes pre-MM respecto al grupo control ($p=0,087$)(Figs 11-B,C). Al comparar las frecuencias de casos con metilación entre individuos control y MM, se observaron diferencias significativas entre las frecuencias de casos con metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* ($p=0,033$, $p<0,001$, $p<0,001$ y $p=0,05$ respectivamente) (Fig 12).

Al comparar los porcentajes del número de genes metilados en cada uno de los tres grupos (individuos control, pre-MM y MM) se observó un aumento en la frecuencia de casos con

metilación de dos, tres y cuatro genes conforme se comparaba controles, pre-MM y MM ($p < 0,001$ asociación lineal por lineal) (Figura 13).

Figura 13. Porcentaje de casos que presentaban metilación en 0, 1, 2, 3, 4 genes al comparar los individuos control, pre-MM y MM



Número de genes metilados					
	0	1	2	3	4
Controles	42,4% (14/33)	45,5% (15/33)	12,1% (4/33)	0% (0/33)	0% (0/33)
Pre-MM	21,7% (10/46)	43,5% (20/46)	30,4% (14/46)	4,3% (2/46)	0% (0/46)
MM	10,5% (6/57)	28,1% (16/57)	29,8% (17/57)	24,6% (14/58)	7% (4/58)

3.3.4 Comparación entre los grupos pre-MM y MM

En la serie de pacientes afectos de pre-MM el gen *CDH1* fue el que presentó una mayor frecuencia de metilación (63%) mientras que *P16* presentó una frecuencia menor (13%). En la serie de pacientes afectos de MM el gen *CDH1* (73,7%) fue también el que presentó la frecuencia mayor de metilación y *BIK* la menor (29,8%) (Tabla 12).

El análisis estadístico de la comparación entre pre-MM y MM de las frecuencias de casos con metilación en los genes *P15* y *P16* evidenció diferencias significativas ($p=0,006$ y $p=0,002$ respectivamente), mientras que en el caso de los genes *CDH1* y *BIK* no se observaron diferencias significativas (Fig 14).

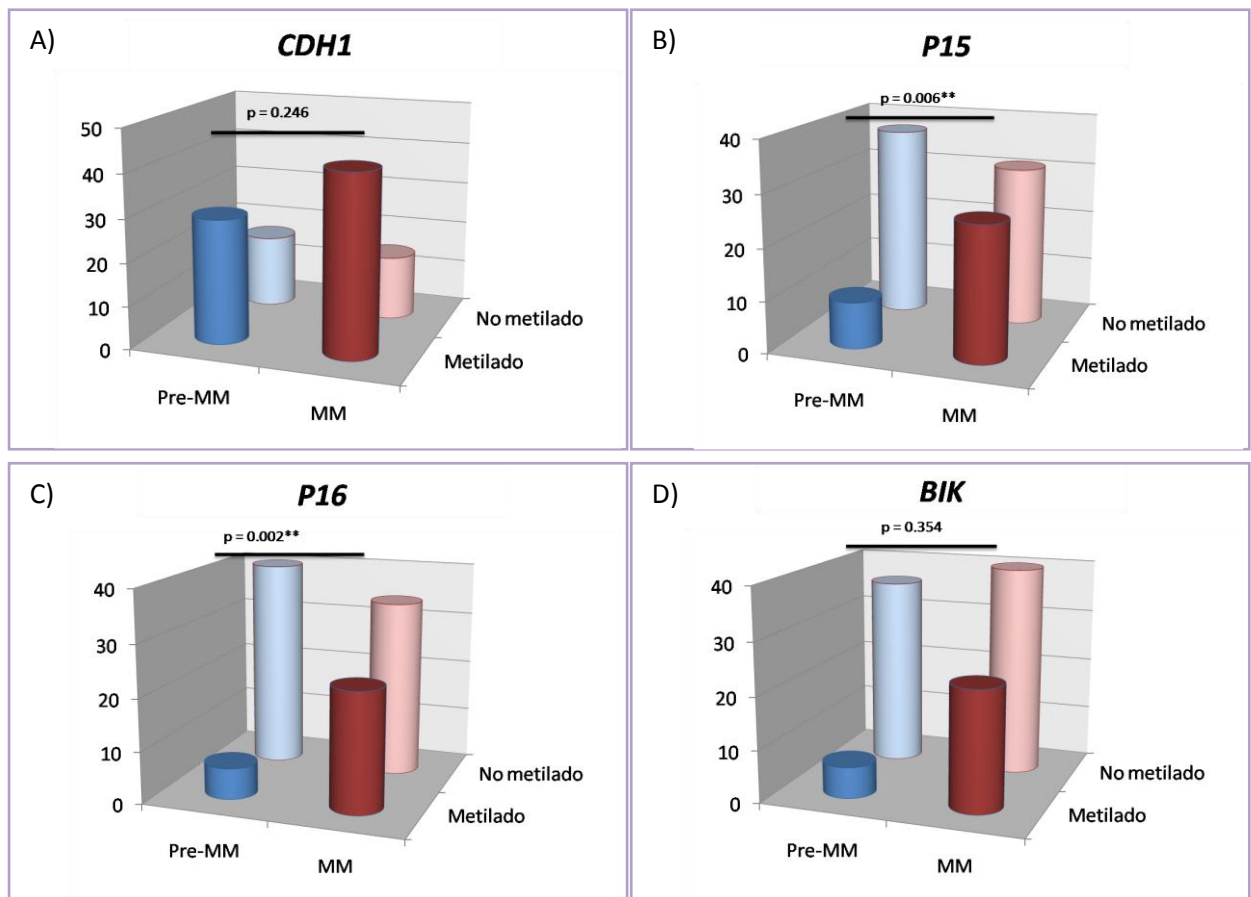


Figura 14. Comparación de las frecuencias de casos con metilación para los cuatro genes analizados entre pacientes afectados de pre-MM y de MM. A) En el gen *CDH1*, B) En el gen *P15*, C) En el gen *P16*, D) En el gen *BIK*.

Al comparar la frecuencia del número de genes metilados entre pre-MM y MM, se observó que existía un aumento en la frecuencia de casos con metilación en tres y cuatro genes. No se observó metilación en los cuatro genes en el grupo pre-MM. Se observó un aumento de metilación significativo entre las dos entidades ($p=0,001$ asociación lineal por lineal) (Fig 13).

3.3.5 Metilación en pacientes de MM al diagnóstico y en el seguimiento

Se analizó el porcentaje de pacientes con metilación de los cuatro genes en los 25 casos con MM estudiados al diagnóstico y los 30 MM estudiados en el seguimiento (Tabla 13). Se observaron frecuencias de casos con metilación para los genes *CDH1* y *P15* mayores en MM al diagnóstico, y en cambio una frecuencia de casos con metilación para los genes *P16* y *BIK* mayor en MM en el seguimiento.

No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de casos con metilación en los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* entre el momento del diagnóstico y del seguimiento, aunque se observó una tendencia a una mayor frecuencia de casos con metilación en *BIK* en los pacientes con MM en el seguimiento al comparar con los de diagnóstico ($p=0,175$).

Tabla 13. Frecuencias de pacientes con metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en MM al diagnóstico y en MM en el seguimiento de la enfermedad

	MM DIAGNÓSTICO	MM SEGUIMIENTO
<i>CDH1</i>	76% (19/25)	70% (21/30)
<i>P15</i>	52% (13/25)	36,7% (11/30)
<i>P16</i>	32% (8/25)	46,7% (14/30)
<i>BIK</i>	20% (5/25)	36,7% (11/30)

En cuatro pacientes afectados de MM se pudo obtener muestra y comparar el estado de metilación en dos momentos distintos de la enfermedad, en todos ellos uno correspondía a recaída post tratamiento (Tabla 14). Es de destacar que la muestra perteneciente a la recaída post tratamiento en todos los casos mostró metilación en el gen *BIK*.

Tabla 14. Resultados de porcentajes de metilación de los cuatro pacientes con dos muestras en distintos puntos de la enfermedad.

	Primera muestra	Fecha extracción 1ª muestra	Genes metilados	Segunda muestra	Fecha extracción 2ª muestra	Genes metilados
Paciente 12	MM seguimiento	7/5/1996	Ninguno	Recaída post tratamiento	9/6/1999	<i>BIK</i>
Paciente 16	MM seguimiento	6/5/1999	<i>P15</i>	Recaída post tratamiento	18/10/1999	<i>P15</i> y <i>BIK</i>
Paciente 143	MM Diagnóstico	3/1/2003	Ninguno	Recaída post tratamiento	7/4/2010	<i>BIK</i>
Paciente 165	GMSI	19/9/2002	Ninguno	Recaída post tratamiento	22/8/2008	<i>BIK</i>

3.4 Relación entre metilación y variables clínico-biológicas

Se analizó la posible relación entre el estado de metilación de los cuatro genes y las variables clínico-biológicas que se muestran en la tabla 9. En el grupo de pacientes que mostraba metilación en *P15* se encontraron niveles superiores de LDH respecto a los que no presentaban metilación ($p=0,045$). La presencia de metilación de *P16* se correlacionó con un porcentaje mayor de CP en MO ($p=0,033$), niveles elevados de B2M y niveles disminuidos de albúmina en suero ($p=0,034$ y $p=0,001$ respectivamente) (Tabla 15). Para los genes *CDH1* y *BIK* no se

encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables clínico-biológicas entre el grupo de pacientes que presentaba metilación y el que no presentaba.

Tabla 15. Correlación entre la presencia o ausencia de metilación en P16 y P15 y las variables clínico-biológicas recogidas; sexo, edad, CP en MO, B2M, LDH, albúmina, calcio y creatinina

	Gen P16		
	No metilado (n=74)	Metilado (n=29)	p valor
Sexo (F/M)	47/27	16/13	0,435
Mediana Edad (rango)	70 (38-89)	72 (39-90)	0,852
Media [CM] en suero (rango)	1,86 (0,1-10)	2,49 (0,2-11,1)	0,252
Media % CP en MO (rango)	14,38 (0,4-85)	25,05 (0,2-97)	0,033
Media B2M en suero (rango)	3,59 (1,1-16,45)	5,49 (1,4-16)	0,034
Media LDH en suero (rango)	329,81 (110-638)	357,26 (140-840)	0,474
Media Albúmina en suero (rango)	3,94 (2,23-4,9)	3,54 (2,77-4,66)	0,001
Media Calcio en suero (rango)	9,38 (7,22-10,9)	9,8 (8,4-14,6)	0,614
Media Creatinina en suero (rango)	1 (0,49-2,93)	1,14 (0,38-2,6)	0,334
	Gen P15		
	No metilado (n=68)	Metilado (n=35)	p valor
Sexo (F/M)	44/24	19/16	0,304
Mediana Edad (rango)	70 (38-86)	73 (45-90)	0,220
Media [CM] en suero (rango)	2,15 (0,15-10)	1,75 (0,1-11,1)	0,118
Media % CP en MO (rango)	16,28 (0,2-97)	19,68 (0,4-85)	0,885
Media B2M en suero (rango)	3,72 (1,24-16,45)	4,88 (1,1-16)	0,112
Media LDH en suero (rango)	321 (110-840)	368,09 (150-638)	0,045
Media Albúmina en suero (rango)	3,86 (2,23-4,9)	3,75 (2,43-4,72)	0,406
Media Calcio en suero (rango)	9,37 (7,22-12,5)	9,75 (8,4-14,6)	0,232
Media Creatinina en suero (rango)	0,97 (0,49-1,93)	1,17 (0,38-2,93)	0,427

F=Femenino, M=Masculino, [CM]=Concentración componente monoclonal

Para los cuatro genes se realizó un análisis de la relación entre metilación y las variables clínico-biológicas con importancia en el diagnóstico y el seguimiento pero de manera dicotomizada, utilizando como valores de corte para cada variable los establecidos en las guías internacionales como valores de referencia en el diagnóstico de la enfermedad ($\geq 10\%$ CP vs $<10\%$ CP, $\geq 3,5$ mg/L B2M vs $<3,5$ mg/L B2M, > 350 LDH vs < 350 LDH, $\leq 3,5$ g/dL albúmina vs $>3,5$ g/dL albúmina, $\geq 11,5$ mg/dL calcio vs $< 11,5$ mg/dL calcio, ≥ 2 mg/dL creatinina vs <2 g/dL creatinina). La metilación de P16 se seguía correlacionando con un mayor porcentaje de CP en

MO ($p=0,038$), niveles más bajos de albúmina ($p=0,008$) y niveles elevados de B2M ($p=0,022$). Además se correlacionaba con niveles mayores de calcio ($p=0,006$). La metilación de *P15* se correlacionaba con niveles elevados de LDH ($p=0,05$) y niveles elevados de creatinina ($p=0,006$). En este análisis no se observó correlación entre las variables clínico-biológicas y la metilación en *CDH1* y *BIK*.

El mismo análisis se realizó para pre-MM y MM por separado. En ninguno de los grupos se observaron diferencias significativas entre metilación y las variables clínicobiológicas. Solamente se observó una tendencia a un porcentaje superior de pacientes afectados de MM con metilación en *P16* y niveles más bajos de albúmina ($p=0,093$).

3.5 Correlación entre metilación y SG

3.5.1 Análisis univariante

3.5.1.1 Serie total, serie pre-MM y serie MM

Al analizar la influencia que ejercía el estado de metilación de cada uno de los genes analizados sobre la SG en el total de pacientes pre-MM y MM, únicamente la metilación en *P16* fue un factor de pronóstico adverso. Los pacientes con metilación en *P16* presentaron una menor SG que aquellos en los que no se encontraba metilado (62 y 113 meses respectivamente, $p=0,01$) (Fig 15).

El análisis de supervivencia de *CDH1* no mostró diferencias significativas ni en el total de pacientes ni en los diferentes grupos de patología (pre-MM y MM). En base a que se mostraba metilado en una elevada frecuencia en controles sanos, se decidió no englobarlo en los posteriores análisis de supervivencia.

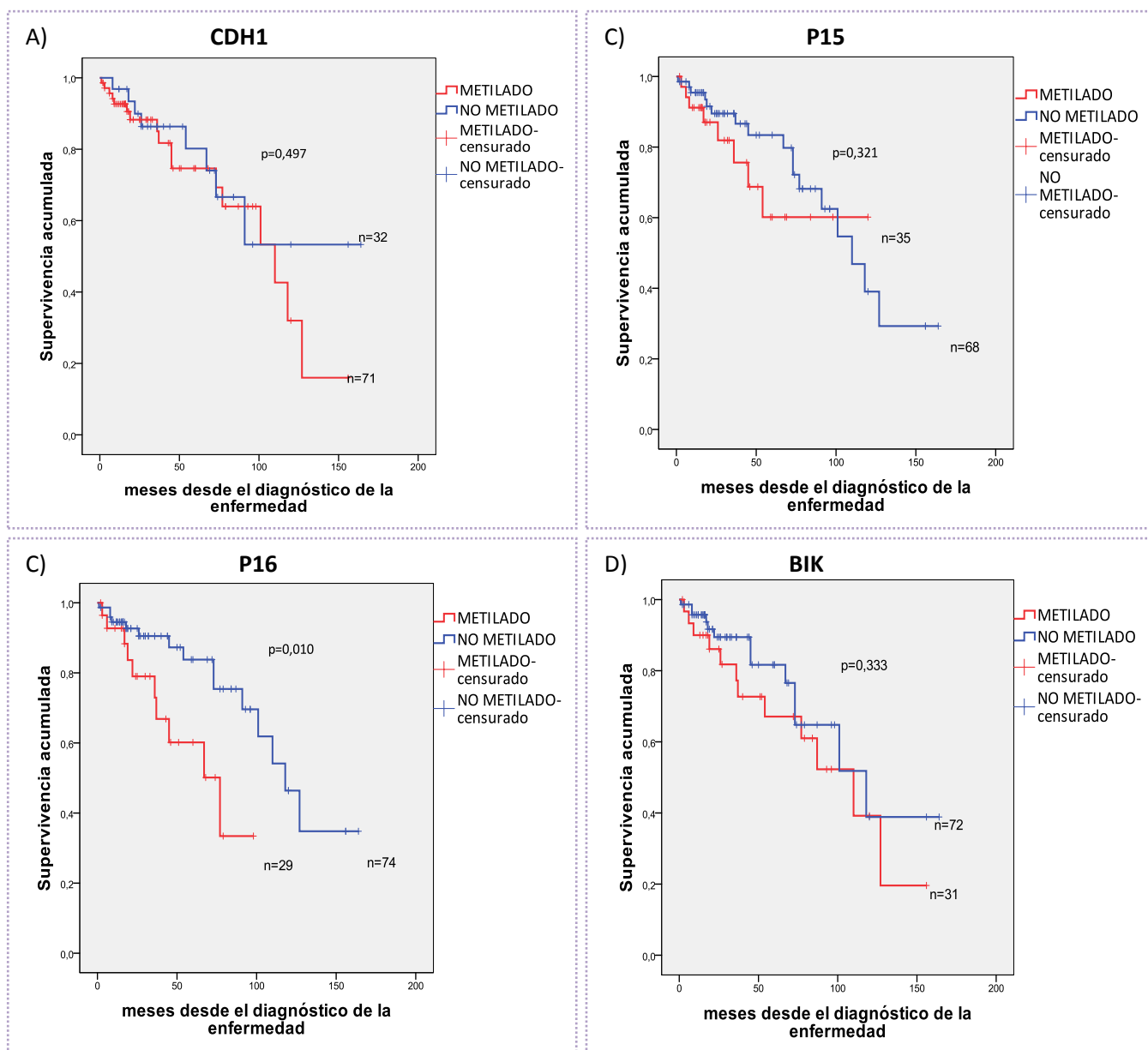


Figura 15. Curvas de SG para los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK*. A) Presencia o ausencia de metilación en *CDH1* (95 meses vs 114 meses), B) Presencia o ausencia de metilación en *P15* (84 meses vs 106 meses), C) Presencia o ausencia de metilación en *P16* (62 vs 113), D) Presencia o ausencia de metilación en *BIK* (90 meses vs 109 meses).

Se analizó el impacto de la frecuencia de metilación global considerada por la metilación de 0 a 3 genes (*P15*, *P16* y *BIK*) en la SG, así como el impacto que ejercía la metilación conjunta de diferentes genes.

En el análisis de supervivencia teniendo en cuenta el número de genes metilados se observó una SG significativamente menor en aquellos pacientes que presentaban metilación en los tres genes respecto al resto de pacientes (24 vs 105 meses, $p < 0,001$). Al comparar la presencia de

0, 1, 2 o 3 genes por parejas, la presencia de metilación en los tres genes aparecía como factor adverso de supervivencia en relación a la ausencia de metilación de los tres genes ($p<0,001$), la metilación de un gen ($p<0,001$) y la metilación de dos genes ($p=0,032$) (Fig 16). En el resto de comparaciones no se obtenían diferencias significativas.

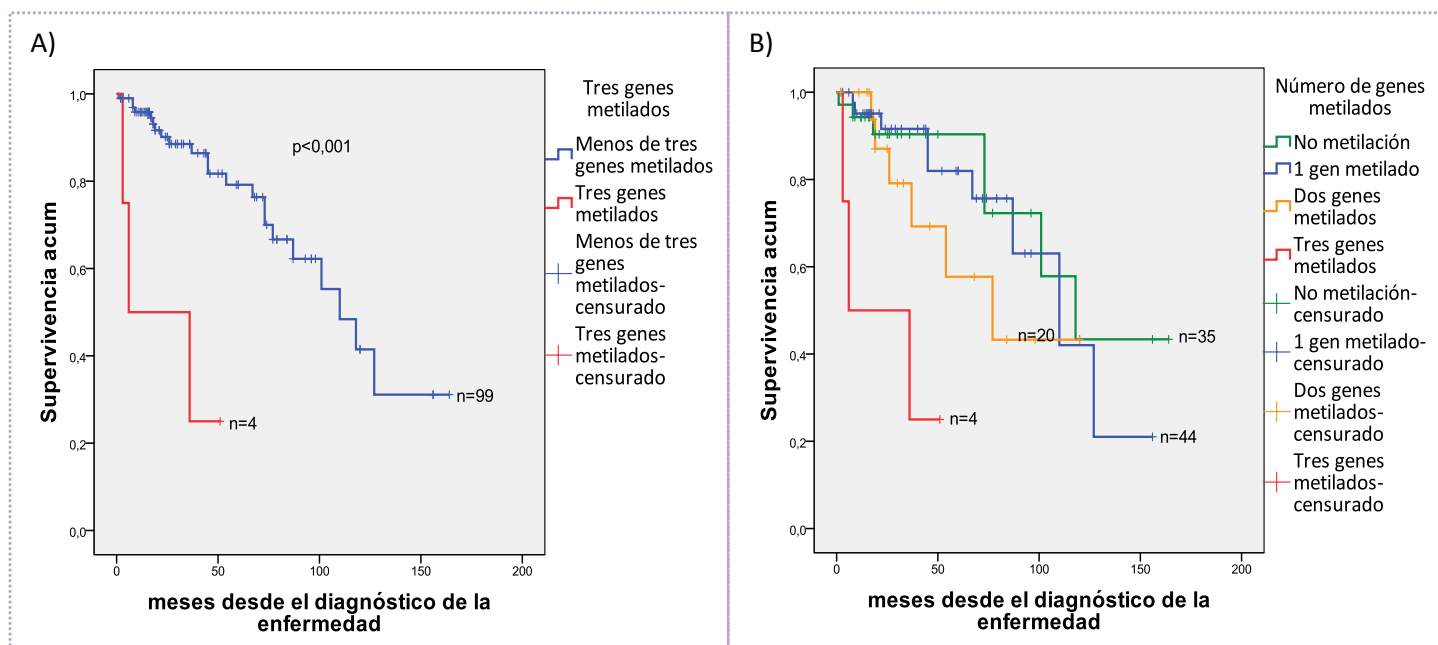


Figura 16. Gráficas de SG en relación al número de genes metilados

A) SG en pacientes con metilación de tres genes, B) SG en pacientes con metilación en relación al número de genes.

A continuación se analizó la presencia de metilación conjunta de dos genes y su papel en la SG. Para ello se realizaron combinaciones de metilación en los tres genes por combinación de parejas; *P15* y *P16*, *P15* y *BIK*, *P16* y *BIK*.

En el análisis de metilación conjunta de los genes *P15*, *P16* y *BIK*, la presencia de metilación de *P16* y *BIK* confería una supervivencia menor que el resto de combinaciones (47 vs 106 meses, $p=0,023$). Al tener en cuenta todos los casos que presentaban metilación de *P16* y *BIK*, indistintamente de la presencia o ausencia de metilación de *P15*, se observó una SG menor que en el resto (40 vs 110 meses, $p<0,001$). Ninguna de las otras dos combinaciones mostraba un impacto sobre la SG, sin embargo, al analizar la presencia indistinta de metilación en el tercer gen, tanto la combinación de *P15* y *BIK* como la de *P15* y *P16* mostraban una tendencia a una supervivencia menor (61 vs 105 meses, $p=0,069$ y 64 vs 105 meses, $p=0,126$ respectivamente) (Fig 17).

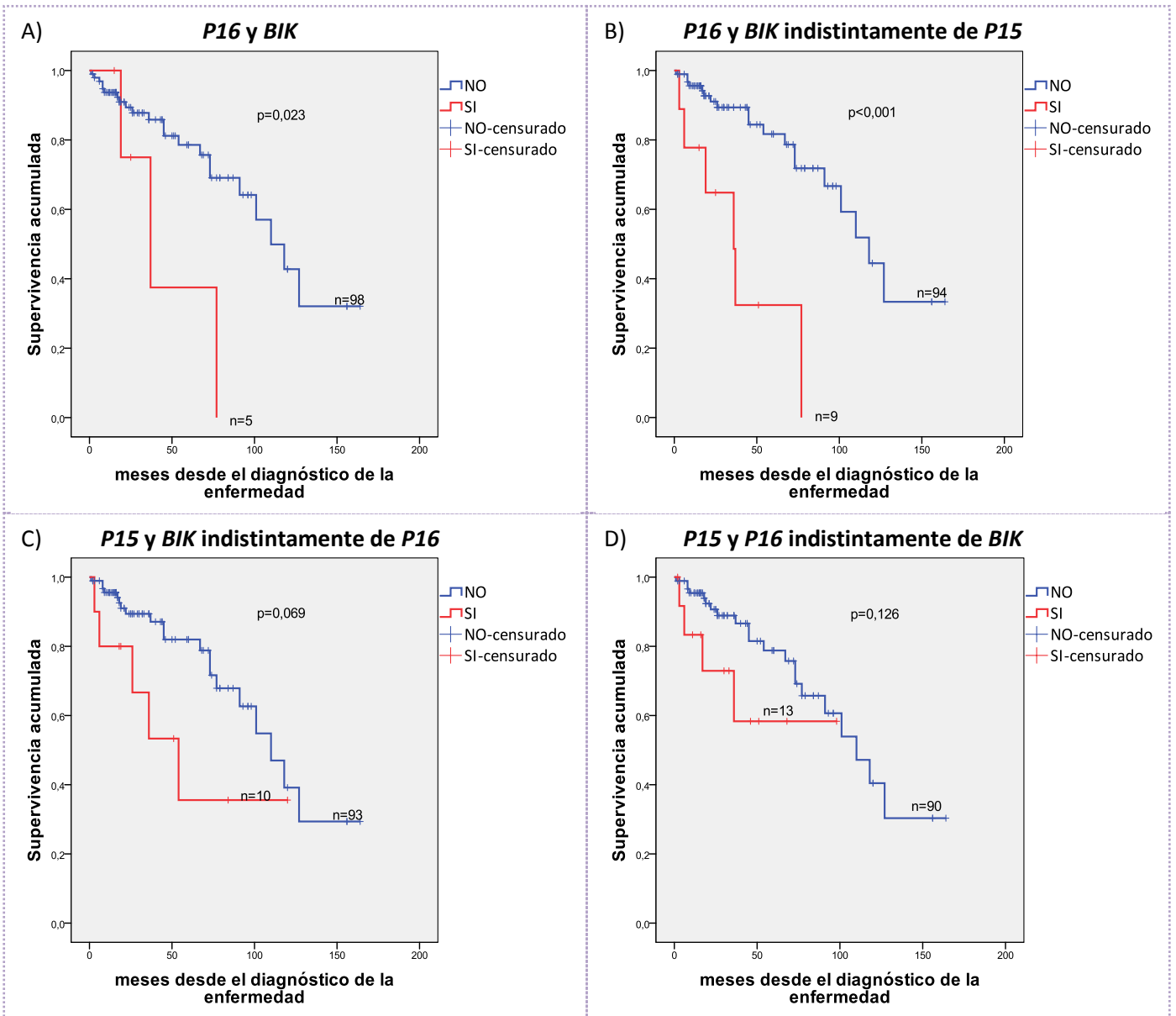


Figura 17. Gráficas de SG de los pacientes con metilación conjunta de dos genes. A) Metilación de *BIK* y *P16*, B) Metilación de *BIK* y *P16* indistintamente de la metilación de *P15*, C) Metilación de *BIK* y *P15* indistintamente de la metilación de *P16*, D) Metilación de *P15* y *P16* indistintamente de la metilación de *BIK*.

El análisis de SG para los grupos de pacientes pre-MM y MM por separado no mostró diferencias significativas según presencia o ausencia de metilación en los genes analizados. Sin embargo, aunque no significativo, sí que mostró una tendencia a una menor supervivencia en aquellos pacientes del grupo de MM con metilación en *P16* respecto a los que no presentaban metilación (62 vs 89 meses, $p=0,147$).

En el grupo de los pacientes pre-MM ninguno mostró metilación en los tres genes y solamente dos pacientes mostraron metilación en dos de los genes analizados. Cuando se considera el

número de genes metilados (*P15*, *P16* y *BIK*) y la influencia que ejercía en la supervivencia, solamente se observaba en el grupo de MM, donde la presencia de tres genes metilados confería peor pronóstico que la presencia de uno ($p=0,002$), dos genes metilados ($p=0,039$) o ausencia de metilación en los genes analizados ($p=0,025$).

Al realizar el análisis de supervivencia y presencia de metilación conjunta de genes para pacientes pre-MM y MM, la metilación de *P16* y *BIK* se asociaba a una tendencia a una menor SG en el grupo de MM ($p=0,062$), llegando a ser significativamente inferior al realizar el análisis independientemente de la presencia o ausencia de metilación en *P15* ($p<0,001$). La metilación conjunta de *P15* y *P16* y la de *P15* y *BIK*, tanto en solitario como independientemente de la metilación del tercer gen, no mostró diferencias significativas en la SG del grupo de MM.

De los dos pacientes del grupo de pre-MM que mostraron metilación de dos genes, uno de ellos mostró metilación de *P15* y *BIK* y el otro de *P16* y *BIK*. Ninguno de estos pacientes murió durante el seguimiento de su enfermedad hasta la fecha final del presente estudio.

3.5.1.2 MM al diagnóstico y en el seguimiento

Se analizó si la presencia de metilación en determinados genes o combinaciones de genes tenía una implicación en la SG de aquellos pacientes con MM estudiados en el seguimiento (MM refractario o en recaída) respecto a los pacientes con MM estudiados al diagnóstico.

Se observó que los pacientes afectos de MM en seguimiento y metilación en *P16* presentaban una tendencia a una peor SG respecto a los que no presentaban metilación (67 vs 99 meses, $p=0,059$). En el subgrupo de pacientes con MM al diagnóstico no se observaron diferencias significativas entre las supervivencias globales para metilación en *P15* y *BIK*, así como para metilación de ninguno de los tres genes.

Debido a que la presencia de los tres genes metilados implicaba por sí mismo una peor supervivencia, las tres combinaciones independientemente de la presencia o ausencia de metilación en el tercer gen conferían peor pronóstico en el grupo de MM al diagnóstico y los dos pacientes con metilación en *P15*, *P16* y *BIK* fueron *exitus* (Fig 18). Sin embargo al analizar las combinaciones de dos genes, en los pacientes con MM en seguimiento la presencia de metilación en *P16* y *BIK* estaba asociada a una supervivencia inferior que aquellos que no presentaban metilación (Fig 19). Ninguna de las otras combinaciones de dos genes mostró diferencias en la SG de pacientes con MM ni al diagnóstico ni en seguimiento.

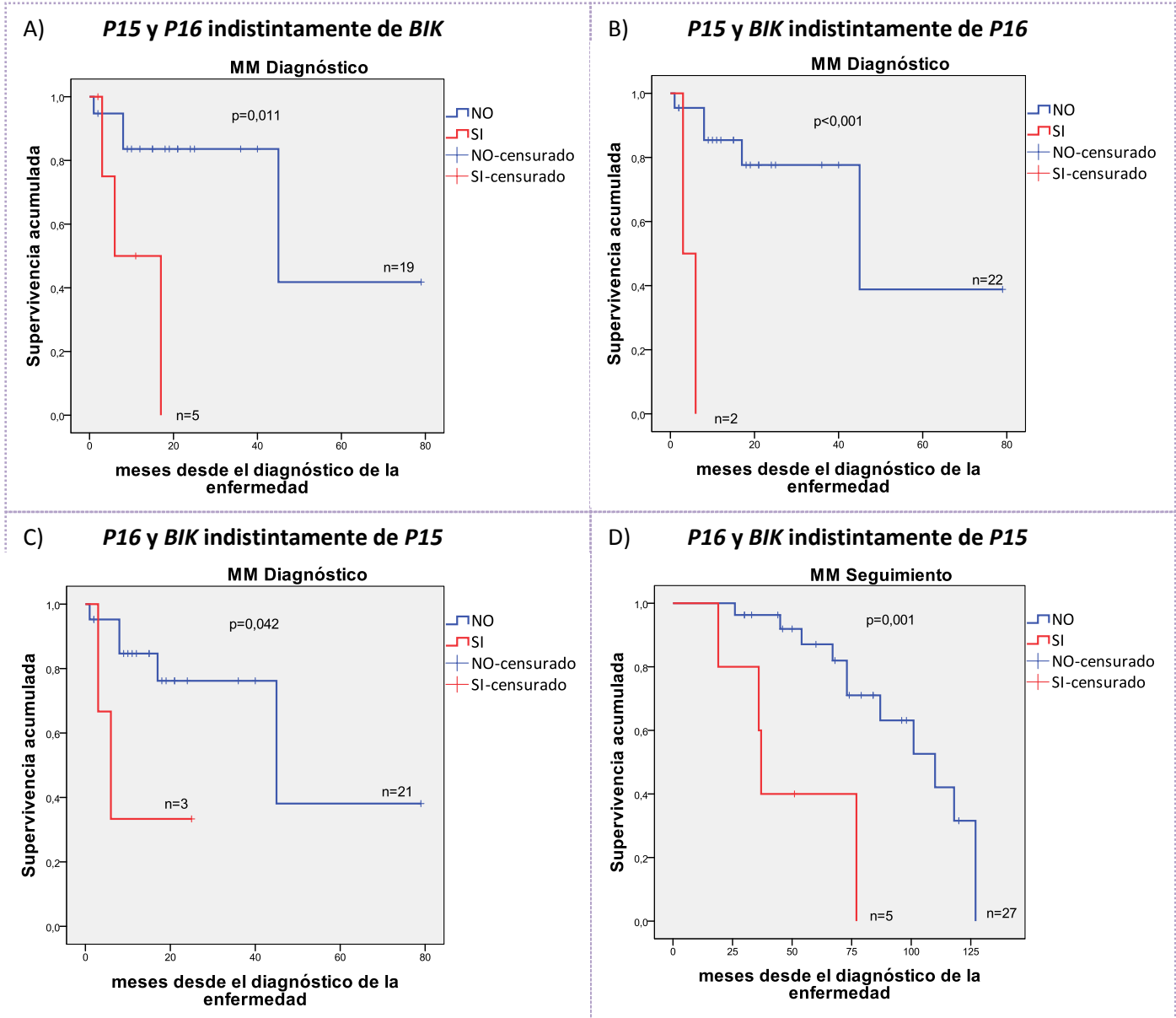


Figura 18. Gráficas de SG por combinación de genes metilados en el intragrupo de MM. A) Metilación de metilación de P15 y P16 indistintamente de la metilación de BIK, B) Metilación de P15 y BIK indistintamente de la metilación de P16, C) Metilación de P16 y BIK indistintamente de la metilación de P15, D) Metilación de P16 y BIK indistintamente de la metilación de P15.

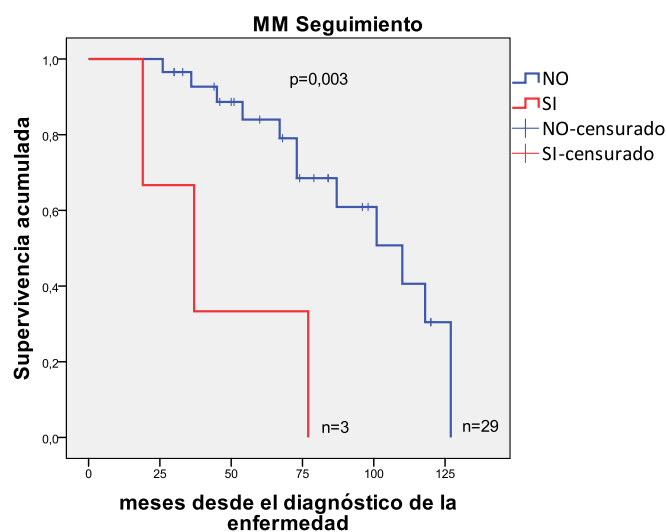


Figura 19. Relación entre SG y metilación de *P16* y *BIK* en pacientes afectados de MM estudiados en el seguimiento de la enfermedad

3.5.2 Análisis multivariante

Se realizó un análisis multivariante con aquellas variables clínico-biológicas que habían mostrado un impacto pronóstico en el análisis univariante, además de aquellas a las que en la literatura se les atribuye un valor pronóstico.

En el grupo de pacientes afectados de MM, y dada la importancia de las variables clínico-biológicas en el pronóstico, se realizó un análisis de SG univariante para todas las variables clínico-biológicas dicotomizadas tal y como se ha indicado anteriormente. De ellas, la única que se asoció a una menor SG fue la presencia de niveles de B2M superiores a 3,5mg/L ($p=0,026$). Los niveles aumentados de LDH y de calcio también presentaron una tendencia a una menor SG ($p=0,06$ y $0,076$ respectivamente).

Las variables analizadas en el modelo multivariante fueron los niveles de B2M, LDH, calcio, creatinina, albúmina y porcentaje de CP, además de la edad, la metilación de tres genes (*P15*, *P16* y *BIK*) y la metilación conjunta de *P16* y *BIK* independientemente de ausencia de metilación en *P15*. Se realizó una regresión de Cox paso a paso hacia atrás manteniendo en el modelo aquellas variables con un índice de Wald $> 1,96$.

Tabla 16. Resultados del análisis univariante y multivariante de la relación entre SG y las distintas variables clínico-biológicas

Análisis Univariado				Variables	Análisis multivariado			
HR	IC 95%		Valor p		HR	IC 95%		Valor p
6,427	1,725	23,953	<0,001	Metilación 3 genes			NS	
5,059	1,838	13,927	<0,001	Metilación <i>P16</i> y <i>BIK</i>	4,036	0,949	17,165	0,059
3,610	0,785	16,590	0,076	Calcio \geq 10mg/dL			NS	
2,783	1,079	7,174	0,026	B2M \geq 3,5mg/L	2,635	0,899	7,725	0,078
2,444	0,930	6,425	0,060	LDH > 350	4,695	1,156	19,070	0,031
2,247	0,509	9,916	0,285	Creatinina \geq 2mg/dL			NS	
1,670	0,682	4,084	0,261	Edad \geq 65 años	3,937	1,049	14,774	0,042
1,495	0,613	3,649	0,377	Albúmina \leq 3,5mg/L			NS	
1,067	0,415	2,743	0,893	% CP \geq 10%			NS	

En el análisis multivariante, únicamente resultaron factores con valor pronóstico independiente los niveles de LDH y la edad ($p= 0,031$ y $p=0,042$ respectivamente). Sin embargo, tanto los niveles de B2M como la metilación conjunta de *P16* y *BIK* mostraron una tendencia con $p=0,078$ y $p=0,059$ respectivamente (Tabla 16).

4. DISCUSIÓN

4.1 Valoración de la metodología utilizada en el análisis de la metilación de los genes a estudio

En la presente tesis el análisis de la metilación de los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* se ha llevado a cabo mediante la técnica MS-PCR. En los estudios de metilación de la literatura en MM así como en otras patologías, es la técnica que, hasta la fecha, más se ha utilizado debido a su rapidez y sencillez en la interpretación de los resultados. Herman *et al.* (1996) observan que la sensibilidad de la MS-PCR (10^{-3}) supera a la de las técnicas de secuenciación de esa época. Otros autores, Chim *et al.* (2004) y Braggio *et al.* (2010) también realizan estudios de sensibilidad de esta técnica en el análisis de diferentes genes utilizando diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} . Entre los genes que analizan se encuentran *CDH1*, *P15*, y *P16* para los que establecen sensibilidades de 10^{-3} a 10^{-5} .

El material utilizado para realizar el presente estudio ha sido DNA obtenido del cultivo celular de MO después de su fijación con Carnoy, destinado a la realización de los estudios citogenéticos. En la mayoría de estudios de metilación en MM se ha utilizado DNA extraído de MO total o bien de la fracción de células mononucleadas separada por Ficoll (Uchida *et al.*, 2001; Mateos *et al.*, 2002; Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Chim *et al.*, 2007; Braggio *et al.*, 2010; Yuregir *et al.*, 2010; Geraldés *et al.*, 2016). En un intento de aumentar la sensibilidad de la técnica algunos estudios se realizan en DNA extraído de células de MO CD138+ (Guillerm *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2008). Al comparar las frecuencias de metilación entre el DNA extraído de MO total (37 MM, 30 SMM y 5 GMSI) y el DNA de células CD138+ (46 MM, 16 SMM y 12 GMSI) Gonzalez-Paz *et al.* (2007) no observan diferencias significativas.

Existen estudios en los que se utiliza material de MO conservado. Uchida *et al.* (2001) y Ribas *et al.* (2005) extraen el DNA de frotis de MO de 36 y 16 pacientes respectivamente y Yuregir *et al.* (2010) utilizan DNA extraído de MO incluida en parafina de nueve pacientes. El DNA extraído de tejido fijado en formol e incluido en parafina es el más utilizado en el análisis de metilación de tumores sólidos, no observándose diferencias entre las frecuencias de metilación de estas muestras respecto a las analizadas en DNA de tejido fresco (Herman *et al.*, 1996; Dumenil *et al.*, 2014; Bak *et al.*, 2016; Espinal *et al.*, 2017).

Existe un estudio de metilación en el que se utiliza DNA extraído de células fijadas con Carnoy tras cultivo de SP de pacientes afectos de Prader-Willi o Angelman (Velinov *et al.*, 2001). Para

descartar posibles cambios sobre el estado de metilación tras el proceso de fijación celular, se analizan muestras control antes y después de la fijación y no encuentran que se induzca la metilación. La posible pérdida de metilación tras la fijación se descarta analizando dos muestras que presentaban metilación antes de ser fijadas con Carnoy. En estas muestras se sigue observando metilación cuatro años después de la fijación.

Hasta la fecha no hemos encontrado ningún estudio de metilación en MM en el que se utilice DNA extraído de material fijado en Carnoy.

4.2 Metilación de los genes *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en individuos control

Una de las limitaciones para la validación de la técnica es poder obtener muestras de tejido sano cuando el tejido a analizar es de difícil obtención. En el presente estudio, y debido a la dificultad de obtener material de MO de población control, se ha analizado la presencia de metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en 33 muestras de SP de población control (15 a partir de células de SP fijadas con Carnoy tras cultivo celular y 18 de DNA extraído de SP fresca). Se ha observado metilación en algunos casos, tanto en muestras de tejido fijado (n=9) como en muestras de SP no fijada (n=10). Los genes *CDH1*, *P15* y *BIK* presentaban metilación en los controles, no observándose en *P16* (Tabla 10). La frecuencia de metilación del conjunto de los genes en la serie control ha sido elevada (57,6%), de la que el 51,5% correspondía a metilación de *CDH1*. En cuatro individuos control se ha observado metilación en *BIK*, siempre junto con metilación en *CDH1*. En nuestra serie solamente dos individuos han presentado metilación de *P15*.

En varios estudios de metilación de *CDH1*, *P15* y *P16* en MM no analizan la metilación en individuos control, y ninguno lo verifica para el gen *BIK* (Martin *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2009; Yuregir *et al.*, 2010; Hatzimichael *et al.*, 2012). En aquellos estudios en los que se analiza población control, la mayoría lo realizan a partir de muestras de DNA de MO y en un número de individuos entre siete y diez (Chim *et al.*, 2003,2007; Seidl *et al.*, 2004; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007; Braggio *et al.*, 2010; Stanganelli *et al.*, 2010). De todos estos estudios, únicamente uno observa metilación en *P16* en MO de un individuo (Gonzalez-Paz *et al.*, 2007). Tanto en el estudio más amplio de metilación en MO de población control en 20 individuos sanos (Galm *et al.*, 2004) como en los dos estudios en que se analiza a DNA de 10 muestras de SP (Braggio *et al.*, 2010; Stanganelli *et al.*, 2010), no se observa metilación en *CDH1*, *P15* y *P16*. La presencia de metilación de *CDH1* y *P15* en nuestro estudio contrasta con los resultados observados por

otros autores, ello podría deberse al número reducido de casos o al tipo de tejido utilizado en los otros estudios (SP vs MO).

No obstante, la metilación de genes supresores de tumor en tejidos sin enfermedad ya ha sido descrita previamente (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995; Van Zee *et al.*, 1998), sin embargo se desconoce por qué ocurre. La metilación de *P15* se ha observado en sub-poblaciones de linfocitos en SP de individuos control (Aggerholm *et al.*, 1999). Además, Kristensen *et al.* (2012) realizan un análisis cuantitativo del perfil de metilación en promotores de genes supresores de tumor en SP de 48 individuos sanos. En éste separan la fracción de células mononucleadas de SP y analizan la metilación de una serie de genes supresores de tumor mediante PCR cuantitativa observando, entre otros, metilación de *CDH1*, y ausencia de metilación de otros genes supresores de tumor entre los que se encuentra *P16*. En este sentido Lombaerts *et al.* (2004) analizan la metilación de *CDH1* en SP de 12 donantes del banco de sangre y observan metilación en todas ellas, tanto en la fracción de células total como al analizar las fracciones por separado; células mononucleadas, granulocitos y linfocitos T. En este mismo estudio confirman la inactivación de este gen por la ausencia de expresión de RNA de *CDH1* en células mononucleadas y granulocitos, así como por ausencia de la proteína CDH1 en las membranas de linfocitos T mediante tinción inmunohistoquímica. Asimismo, en un estudio en linfoma (linfoma B de células grandes y linfoma del manto) observan un 25% de casos con metilación en *CDH1* en 16 muestras de tejido linfoide no maligno (linfadenitis, nódulos linfoides reactivos, hiperplasia folicular) (Alkebsi *et al.*, 2016).

Los resultados observados en todos estos estudios indican que existe una gran variabilidad en la metilación entre distintos tipos celulares y no se confina solamente al tejido tumoral. La presencia en leucocitos de metilación de determinados genes supresores de tumor es un dato a tener presente en estudios con un riesgo de contaminación de la muestra por infiltración leucocitaria (Lombaerts *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2012).

La realización de estudios de metilación en cohortes amplias de MO de individuos control sería de gran utilidad para determinar el estado de metilación basal de determinados genes en este tejido.

4.3 Metilación de *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en pacientes afectados de estadios pre-MM

En el presente estudio se ha observado un porcentaje de casos con metilación en *CDH1* elevado tanto en GMSI como en SMM (61% y 85,7% respectivamente). Por el contrario, ninguno de los tres estudios en pacientes de GMSI de la literatura observa metilación en *CDH1* (Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Chim *et al.*, 2007). Si bien nuestro resultado es diferente a lo descrito previamente, es de destacar el bajo número de series analizadas de GMSI. Por otra parte, la presencia de metilación en individuos control sugiere que la metilación en *CDH1* no tendría implicación en la GMSI. En lo que respecta a SMM, solamente en un estudio se analiza la metilación, observando un 20% de pacientes con metilación en *CDH1* (Seidl *et al.*, 2004). Los pocos estudios realizados en estadios premalignos de MM podrían influir en la diversidad de resultados por lo que se necesitaría aumentar el tamaño muestral mayor para una mejor caracterización de la frecuencia de metilación de *CDH1* en dichos estadios.

La frecuencia de pacientes con metilación en *P15* en la presente serie es del 22% en GMSI y del 28,6% en SMM. La frecuencia en GMSI se encuentra dentro del rango observado en la literatura, que oscila entre el 0% y el 50% (Guillerm *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2001; Chim *et al.*, 2003; Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2008; Stanganelli *et al.*, 2010; Geraldès *et al.*, 2016). Si este rango lo establecemos teniendo en cuenta las series más amplias oscila entre el 10% y el 36% y el porcentaje del presente estudio se ajustaría más. Solamente en dos estudios analizan la metilación de *P15* en SMM con ocho y cinco pacientes, y una frecuencia del 50% (Geraldès *et al.*, 2016) o bien no observando metilación (Seidl *et al.*, 2004).

La frecuencia de metilación para el gen *P16* en las series de GMSI y SMM de esta tesis es del 12,2% y del 28,6% respectivamente. Los estudios que analizan la metilación de *P16* en estadios pre-MM presentan un rango de metilación entre el 0% y el 38,5% para GMSI, y el de las series más amplias entre el 0% y el 28% (Guillerm *et al.*, 2001; Mateos *et al.*, 2002; Seidl *et al.*, 2004; Geraldès *et al.*, 2016). Una de las series más amplias es la de Mateos *et al.* (2002), en la que no observan metilación de *P16* en 40 muestras de GMSI. El rango de metilación de *P16* en pacientes afectados de SMM observado en la literatura se encuentra entre el 12% y el 40% (Seidl *et al.*, 2004; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007; Geraldès *et al.*, 2016), la serie más amplia analiza 30 pacientes y observan un 30% de metilación (Gonzalez-Paz *et al.*, 2007). Con todo ello se concluye que los resultados en la presente serie son similares a los descritos en la bibliografía.

Este es el primer estudio en el que se analiza la metilación en *BIK* en una serie de pacientes afectados de estadios pre-MM, en el se ha observado una frecuencia de metilación del 17,1% en GMSI y del 57,1% en SMM.

4.4 Metilación de *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en pacientes afectados de MM

En el presente estudio se ha observado un 72,7% casos con metilación en *CDH1* en la serie de MM superior al rango observado en la literatura. El rango descrito en la literatura oscila entre el 21% y el 56,3%. La diferencia podría ser debida a la variabilidad de la muestra de pacientes afectados de MM. Solo hay seis estudios en los que se analiza la metilación de este gen, con lo que sería interesante ampliar el número de pacientes (Chim *et al.*, 2004, 2007; Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Braggio *et al.*, 2010; Yuregir *et al.*, 2010). Como ya se ha indicado anteriormente, el porcentaje de casos con metilación en *CDH1* en individuos control se debería tener en cuenta para valorar la implicación de la metilación en *CDH1* en MM.

En la presente serie se ha observado metilación en *P15* en el 43,2% de los pacientes afectados de MM, frecuencia ligeramente superior a la descrita en la bibliografía pero se podría explicar por la variabilidad muestral. El rango descrito en la literatura es de entre el 1,8% y el 36% (Uchida *et al.*, 2001; Chim *et al.*, 2003,2004; Guillerm *et al.*, 2003; Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2008; Braggio *et al.*, 2010; Stanganelli *et al.*, 2010; Geraldès *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). *P15* es uno de los genes principales implicados en el control del ciclo celular al regular la progresión de fase G1 a S, participando así en las principales vías de supresión de tumores. La metilación de *P15* podría implicar una inactivación de éste y, como consecuencia, una alteración en las vías de supresión de tumores. *P15* también se ha encontrado metilado en estadios asintomáticos de la enfermedad. Esto podría sugerir que se tratase de un suceso temprano en la enfermedad relacionado con la supervivencia del clon tumoral en GMSI más que como posible desencadenante de la enfermedad sintomática (Guillerm *et al.*, 2001).

La frecuencia de casos con metilación observada en el presente estudio en *P16* es del 40% y se encuentra dentro del rango descrito en la literatura que oscila entre el 7% y el 54% (Uchida *et al.*, 2001; Victoria Mateos *et al.*, 2001; Krämer *et al.*, 2002; Chim *et al.*, 2003,2004,2007; Guillerm *et al.*, 2003; Seidl *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2004; Ribas *et al.*, 2005; Chiusolo *et al.*, 2006; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008; Hatzimichael *et al.*, 2009; Braggio *et al.*, 2010; Ozalp Yuregir *et al.*, 2010; Stanganelli *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Geraldès *et al.*, 2016). *P16* está también implicado en el control del ciclo celular y se sitúa en el

mismo locus que *P15*. En MM es uno de los genes más ampliamente estudiado, pero todavía existe controversia sobre el efecto que puede ejercer su inactivación en la progresión y agresividad de la enfermedad.

En la presente serie de MM se ha observado una frecuencia de casos con metilación en *BIK* del 29%. Solo existe un estudio en el que analiza la metilación de este gen en pacientes de MM y observa una frecuencia del 40% en una cohorte de 40 pacientes (Hatzimichael *et al.*, 2012). El gen *BIK* actúa como mediador en la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis y es candidato a gen supresor de tumor. Su inactivación mediante delección o mutación se ha relacionado con el desarrollo de diferentes tumores tales como carcinoma renal, glioma, cáncer colorectal o cáncer de cabeza y cuello (Chinnadurai *et al.*, 2008), mientras que su relación con MM se ha establecido previamente en estudios *in vitro* en una línea celular de paciente de MM (Pompeia *et al.*, 2004). Al analizar los cambios de expresión de varios genes, entre ellos *BIK*, tras el tratamiento con un agente desmetilante se observa que *BIK* se halla inactivado por metilación y tras el tratamiento con el agente desmetilante vuelve a activarse. Otro estudio en líneas celulares provenientes de pacientes MM muestra que la sobreexpresión de *BIK* sensibiliza a las células del MM ante el estrés oxidativo otorgándole un papel importante en el mecanismo de muerte celular (Bodet *et al.*, 2010).

4.5 Comparación de la metilación de *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* entre estadios pre-MM y MM

En la tabla 17 se muestran los porcentajes de pacientes con metilación del presente estudio para los cuatro genes analizados en las cohortes de GMSI y MM así como los rangos observados en la bibliografía.

Tabla 17. Frecuencias de metilación en el presente estudio y rangos de metilación en bibliografía para *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en GMSI y MM

	<i>CDH1</i>	<i>P15</i>	<i>P16</i>	<i>BIK</i>
Rango bibliografía GMSI*	0	0-50%	0-38,5%	--
Presente estudio GMSI	61%	22%	12,2%	17,1%
Rango bibliografía MM*	21,4% - 56,3%	1,8% - 35,3%	7% - 54%	40%
Presente estudio MM	72,7%	43,6%	40%	29,1%

*(Mateos *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2001; Guillerm *et al.*, 2001; Krämer *et al.*, 2002; Chim *et al.*, 2004,2007; Seidl *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2004; Ribas *et al.*, 2005; Chiusolo *et al.*, 2006; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008; Braggio *et al.*, 2010; Yuregir *et al.*, 2010; Stanganelli *et al.*, 2010; Hatzimichael *et al.*, 2010, 2012; Park *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016; Geraldes *et al.*, 2016)

En el presente estudio no se observan diferencias significativas entre las frecuencias de pacientes con metilación en *CDH1* en estadios pre-MM y MM. Este resultado contrasta con otros estudios que encuentran una frecuencia de casos con metilación significativamente menor en GMSI (Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Chim *et al.*, 2007). La presencia de un porcentaje elevado de individuos control con metilación en este gen se debería tener en cuenta para el diseño de futuros estudios. El estudio de una cohorte amplia de individuos control en MO así como de estadios premalignos de MM sería de gran interés para explicar el posible papel de la inactivación de este gen en el tejido hematopoyético.

Para el gen *P15* se ha observado una frecuencia de metilación significativamente superior en MM que en los estadios pre-MM. Este hecho podría indicar una posible relación entre la inactivación de *P15* y la progresión de GMSI a MM. No obstante, al observar un porcentaje elevado de casos de GMSI con metilación en *P15* sugiere que se trataría de un clon presente desde el inicio de la enfermedad que podrá presentar una mayor supervivencia que el resto de clones (Guillerm *et al.*, 2001). Esta hipótesis está reforzada por el hecho de que en ningún estudio encuentra diferencias significativas entre MM y GMSI o SMM (Guillerm *et al.*, 2001; Seidl *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2008; Stanganelli *et al.*, 2010; Geraldés *et al.*, 2016).

Para el gen *P16* se ha observado una frecuencia de casos con metilación significativamente superior en la serie de MM respecto a pre-MM. Los resultados de la presente serie son similares a los de Mateos *et al.* (2001) y a los de Chim *et al.* (2007). Geraldés *et al.* (2016), aunque sin encontrar diferencias significativas, también observa una mayor frecuencia de casos con metilación en MM respecto a pre-MM. Mateos *et al.* (2002) al analizar el porcentaje de células en fase S por cuantificación del DNA mediante citometría de flujo en una serie de pacientes de MM observan una asociación entre la metilación en *P16* y una elevada proliferación de las CP, indicando una posible relación entre metilación y proliferación del clon tumoral. De este modo, la inactivación de *P16* podría implicar una desregulación del ciclo celular que a su vez conllevaría a una proliferación del clon patológico de CP y la progresión de la enfermedad.

En relación al gen *BIK*, en nuestra serie no se han observado diferencias significativas entre pre-MM y MM, sugiriendo que la metilación en *BIK* se trataría de un evento temprano en la progresión de la enfermedad. Aún así, sería interesante realizar el estudio en otras cohortes de pacientes afectados de estadios premalignos de MM para contrastar esta hipótesis ya que no hay estudios en la literatura.

4.6 Comparación de la metilación en *CDH1*, *P15*, *P16* y *BIK* en MM estudiados al diagnóstico y en el seguimiento

Uno de los objetivos del estudio era analizar el estado de metilación de los cuatro genes al diagnóstico y al seguimiento en MM para detectar posibles marcadores de progresión.

En el presente estudio, de los cuatro genes analizados en la cohorte de MM se ha observado que existe una tendencia a una mayor frecuencia de casos con metilación en *BIK* en MM estudiados en el seguimiento respecto a los estudiados al diagnóstico ($p=0.174$).

Existen pocos estudios que analicen la metilación en muestras en recaída o con enfermedad refractaria (Guillerm *et al.*, 2001; Chim *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Hatzimichael *et al.*, 2012). Estos resultados concuerdan con los de Hatzimichael *et al.* (2012) en los que observan una relación entre la presencia de metilación en *BIK* y MM en recaída o MM refractario. Es posible que la inactivación de *BIK* en el MM suponga una ventaja adaptativa tras el tratamiento para un determinado clon neoplásico de CP, posiblemente debido a una pérdida de la regulación apoptótica de la vía mitocondrial. Sin embargo, analizando 13 muestras (ocho al diagnóstico y cinco en recaída) Chim *et al.* (2004) no observan diferencias en las frecuencias de casos con metilación para los genes *P15*, *P16* y *CDH1* entre ambos estadios de la enfermedad. Guillerm *et al.* (2001) obtienen resultados similares al comparar las frecuencias de metilación de *P15* y *P16* en una cohorte de 25 pacientes afectados de MM al diagnóstico y cinco en recaída o refractarios al tratamiento.

En el presente estudio es de destacar que al analizar cuatro pacientes de los que se disponía de muestras en dos estadios de la enfermedad se ha observado que en la muestra correspondiente a MM refractario al tratamiento aparece metilación en *BIK* no observada en el estudio previo. La aparición de metilación en determinados genes tras el tratamiento también lo observan Seidl *et al.* (2004), que analizan la metilación de 10 genes en muestras de seis pacientes en dos estadios diferentes de la enfermedad. En cuatro de ellos observan metilación en algunos genes no observada en la muestra previa. Entre estos genes se encuentran *P15*, *P16* y *DAPK*, genes involucrados en apoptosis. La metilación de determinados genes entre ellos *BIK* podría tener un papel importante en la supervivencia de determinados clones de CP tras tratamiento.

4.7 Metilación global en MM

La metilación global se ha analizado mediante la frecuencia del número de genes metilados por individuo en las tres cohortes analizadas. Al analizar la metilación global se han observado diferencias significativas entre el grupo control, pacientes en estadios pre-MM y pacientes MM. La presencia de cuatro genes metilados solamente se observa en el grupo de MM mientras que en el grupo control no se observan más de dos genes metilados en un individuo. Un patrón similar también se observa en otros estudios en los que analizan la metilación de más de un gen (Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010; Geraldles *et al.*, 2016), sugiriendo que la metilación de determinados genes involucrados en vías importantes de supresión de tumor podría tener un papel importante en la progresión de la enfermedad y que estos genes podrían ser los causantes del establecimiento de un clon más agresivo y resistente al tratamiento.

Los estudios de metilación realizados con *arrays* de alta densidad, que cubren gran parte de las islas CpG distribuidas en promotores y exones de un amplio número de genes, han permitido caracterizar el patrón de metilación que se expresa a lo largo de la evolución de la enfermedad. El primero de estos estudios analiza 1500 islas CpG distribuidas a lo largo del genoma en 13 GMSI, 26 SMM y 140 MM y describe un aumento en la hipometilación global entre estadios iniciales premalignos y MM, sin embargo no encuentran una relación entre hipermetilación y los diferentes estadios, así como una relación entre los niveles de metilación en alguno de los genes analizados en el panel (Salhia *et al.* 2010). El estudio de Agirre *et al.* (2015) utilizando un panel de 450.000 CpG igual que Salhia *et al.* (2010) no encuentran un aumento de metilación entre GMSI y MM, solamente observan un aumento en la hipometilación global. Con los resultados obtenidos, Agirre *et al.* (2015) postulan que el MM es una entidad muy heterogénea en lo que a su patrón de metilación respecta. En cambio en dos estudios donde se analizan 27000 CpG, se describe un aumento de metilación en determinados genes entre estadios premalignos y MM, haciéndose más evidente cuando se compara MM y leucemias de células plasmáticas (Walker *et al.*, 2011; Kaiser *et al.*, 2013), observando Kaiser *et al.* (2013) un fenotipo más agresivo en aquellos casos con más metilación.

Nuestros resultados contrastan con los de otros estudios en los que no se observa un aumento de metilación global significativo (Salhia *et al.*, 2010; Agirre *et al.*, 2015). Una posible explicación podría ser una menor número de casos de estadios premalignos analizados en estos estudios ya que analizan únicamente trece, cuatro, cinco y diez GMSI respectivamente

(Salhia *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011; Kaiser *et al.* 2013; Agirre *et al.* 2015). El estadio de progresión en el que se encuentran los casos incluidos en las series también podría influir en los resultados.

4.8 Relación entre metilación y parámetros clínico-biológicos

Uno de los objetivos del presente estudio era analizar la correlación entre la metilación de cuatro genes supresores de tumor y los parámetros clínico-biológicos con valor diagnóstico y/o pronóstico.

En la serie analizada no se ha observado una correlación significativa entre los parámetros analizados y la metilación de *CDH1* o *BIK*. En la literatura se ha correlacionado metilación de *CDH1* y algunos parámetros clínico-biológicos (Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; de Carvalho *et al.*, 2009; Braggio *et al.*, 2010). De ellos solamente Galm *et al.* (2004) encuentran una correlación entre metilación de *CDH1* y niveles bajos de hemoglobina y niveles elevados de LDH. Por otra parte, Hatzimichael *et al.* (2012) al analizar metilación en *BIK* no encuentran diferencias significativas entre los parámetros analizados. En el presente estudio al analizar toda la serie (pre-MM y MM) la presencia de metilación en *P15* solamente se ha correlacionado con niveles elevados de LDH, sin embargo, esta correlación no se observa al analizar solamente los pacientes afectados de MM. La presencia de metilación en *P15* se ha correlacionado con niveles elevados de LDH en una serie de MM (Geraldés *et al.*, 2016).

Cuando se analiza toda la cohorte de pacientes pre-MM y MM con metilación en *P16* se observan unos valores significativamente mayores de CP y B2M así como niveles más bajos de albúmina respecto a los que no presentan metilación, estas diferencias no se observan si se analizan las cohortes de pacientes pre-MM y MM por separado. La presencia de metilación en *P16* únicamente se ha correlacionado con niveles elevados de B2M en la serie de MM analizada por Mateos *et al.* (2002). Aunque *P16* no muestra valor como marcador de pronóstico en MM sí que podría tener importancia durante la progresión de la enfermedad ya que su frecuencia de metilación aumenta a lo largo de la evolución de la enfermedad.

4.9 Relación de metilación con SG

Para establecer un posible valor pronóstico de la metilación de los genes analizados en nuestro estudio se ha analizado su correlación con SG.

Los pacientes con metilación en tres o cuatro genes han presentado una supervivencia inferior que el resto de pacientes. Existen pocos estudios que analicen la SG y su relación con el número de genes metilados. Nuestro resultado es similar al observado por Galm et al. (2004) en el que observan un porcentaje de pacientes con metilación en dos o más genes significativamente superior en leucemias de células plasmáticas respecto al resto de pacientes analizados. La menor supervivencia mostrada por la presencia de metilación de tres o más genes podría estar asociado a un fenotipo más agresivo (Kaiser et al., 2013). Otros autores no encuentran asociación entre metilación de más de un gen y SG (Stanganelli et al, 2010; Geraldés et al., 2016).

Teniendo en cuenta los resultados en la serie de individuos control de nuestro estudio, es difícil valorar el papel de la metilación en *CDH1* con el pronóstico debido a la presencia en un porcentaje elevado de individuos control. En la literatura no se observa correlación entre metilación en *CDH1* y una supervivencia inferior (Galm et al., 2004; Seidl et al., 2004; de Carvalho et al., 2009; Braggio et al., 2010).

De forma similar a lo observado en nuestra serie, en relación a la metilación en *BIK*, Hatzimichael et al. (2012) tampoco observan diferencias significativas con la SG.

Al igual que los resultados de la bibliografía, en nuestra serie tampoco encontramos una correlación entre metilación de *P15* y SG (Guillerm et al., 2003; Galm et al., 2004; Seidl et al., 2004; Braggio et al., 2010; Stanganelli et al., 2010). Este resultado junto la presencia de metilación de *P15* en pacientes en estadios premalignos, apoyaría la hipótesis de que la metilación de *P15* sería un evento temprano en la progresión de la enfermedad y no conllevaría una entidad agresiva.

Estos resultados parecen indicar que la metilación en *CDH1*, *p15* y *BIK* no se correlacionarían con parámetros clínico-biológicos ni con SG y, por tanto, con una enfermedad más agresiva, existen pocos estudios al respecto por lo que sería interesante ampliar la serie.

El análisis de metilación en *P16* y su correlación con la SG en toda la serie (pre-MM y MM) ha mostrado una SG significativamente inferior en aquellos pacientes con metilación en *P16*.

La metilación en este gen es una de las más analizadas en MM, y existen resultados contradictorios sobre su posible papel adverso en el pronóstico de la enfermedad (Mateos et al., 2002; Guillerm et al., 2003; Galm et al., 2004; Seidl et al., 2004; Gonzalez-Paz et al., 2007). Mateos et al. (2002) y Guillerm et al. (2003) le confieren un valor pronóstico adverso observando una SG y enfermedad libre de progresión en aquellos pacientes que presentan

metilación en *P16*. Sin embargo estos resultados no se obtienen en todos los estudios (Seidl *et al.*, 2004; Ribas *et al.*, 2005; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007; Braggio *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en la presente serie de MM concuerdan con los observados en la serie más amplia de MM. Gonzalez-Paz *et al.* (2007), que analizan una serie de 439 pacientes no observan que la presencia de metilación en *P16* tenga un impacto sobre el pronóstico de la enfermedad. En este estudio concluyen que la metilación de *P16* podría ser un “daño colateral” asociado a la disregulación epigenética que tiene lugar durante la progresión de la enfermedad sin conferir por sí sola un valor pronóstico. Sin embargo, Park *et al.* (2011) utilizando dos pares de *primers* para ampliar la región a estudio, obtienen una SG menor en aquellos casos que presentan metilación en las dos zonas amplificadas. Este resultado sugiere que sería necesario un patrón de metilación determinado para la inactivación del gen, por lo que una metilación parcial del gen no afectaría a la función y por tanto al valor pronóstico que puede conferir la metilación en *P16*. Para poder confirmar esta hipótesis sería necesario utilizar técnicas de secuenciación para determinar una posible relación entre el número de CpG metiladas el impacto sobre la evolución de la enfermedad. Si bien es cierto que en nuestra serie no se observa una clara relación entre *P16* y su valor como marcador de pronóstico, se observa una tendencia a una supervivencia inferior en aquellos pacientes refractarios al tratamiento. Este resultado es similar al de Park *et al.* (2011) en el que observan que el impacto que ejerce la metilación en *P16* en el pronóstico no se ve afectado por el tratamiento.

Al analizar el impacto que ejerce la metilación conjunta de varios genes sobre el pronóstico se observa que la presencia de metilación en *P16* y *BIK* tiene un impacto significativamente adverso sobre la SG en el grupo de pacientes afectados de MM rozando la significación cuando se considera factor de valor pronóstico independiente. La inactivación conjunta de estos dos genes podría tener un papel sobre la SG de los pacientes de MM, sobre todo en pacientes refractarios o en recaída post tratamiento. La observación de una SG significativamente inferior en los pacientes al seguimiento que presentan metilación en *P16* y *BIK* apoya esta hipótesis. Aunque tanto *P16* como *BIK* no tienen impacto sobre la SG por sí solos, ambos están ligados a la progresión de la enfermedad, observándose los dos en mayor frecuencia en estadios avanzados o en enfermedad refractaria. Así, las alteraciones en la regulación del ciclo celular por parte de *P16* así como la de la vía de apoptosis mediada por *BIK* estarían relacionadas con una enfermedad más agresiva y refractaria teniendo un impacto pronóstico adverso.

5. CONCLUSIONES

1. El presente estudio es el primero, que para el análisis de la metilación en MM mediante MS-PCR, utiliza DNA obtenido de muestras fijadas en Carnoy.
2. Se ha observado metilación en los genes *CDH1*, *P15* y *BIK* en individuos control. La presencia de metilación en *CDH1* y *P15* ya se ha descrito en SP y en otros tejidos, confirmando que la metilación en estos genes no se confina a tejido tumoral.
3. Metilación en pacientes afectos de pre-MM;
 - 3.1. La presente serie es una de las más amplias que estudian este tipo de pacientes
 - 3.2. Se ha observado casos con metilación en *CDH1* en pacientes afectos de GMSI. Este resultado sugiere que podría ser un evento inicial en la enfermedad. Para confirmar este resultado se necesitaría ampliar la muestra.
 - 3.3. Las frecuencias de metilación de *P15* y *P16* observadas en nuestro estudio se encuentran dentro del rango descrito en la literatura. Esto podría indicar que se trata de un fenómeno temprano.
 - 3.4. Es el primer estudio en el que se analiza metilación en *BIK*, observándose en un 17,1% de los casos. Esto podría indicar que se trata de un fenómeno temprano.
4. Las frecuencias de pacientes con metilación observadas en la serie de MM se encuentran dentro del rango descrito en la literatura, excepto para el gen *CDH1* que es más elevada.
5. Comparación de las frecuencias de pacientes con metilación en estadios pre-MM y MM
 - 5.1. Se han observado diferencias significativas en el gen *P15* El elevado porcentaje de casos de GMSI con metilación en *P15* (20%) sugiere la presencia de metilación temprana en este gen .
 - 5.2. La frecuencia de pacientes con metilación en *P16* es significativamente superior en MM respecto a pre-MM lo que indica un posible papel de este gen en la progresión de la enfermedad.
6. La presencia de metilación en el gen *BIK*, únicamente en la muestra correspondiente a la enfermedad refractaria al tratamiento, en pacientes de los que se disponía muestra en dos

estadios distintos de la enfermedad, sugiere que la metilación de *BIK* podría tener un papel importante en la proliferación de clones de CP resistentes a tratamiento.

7. La metilación *P15* y *P16* muestra correlación con variables clínico-biológicas. La metilación en *P15* con niveles elevados de LDH y la de *P16* con niveles elevados de CP y B2M.

8. La metilación global tiene un impacto en la SG

8.1. La presencia de tres o cuatro genes metilados se correlaciona significativamente con una supervivencia inferior de los pacientes lo que sugiere que podría conferir a las células neoplásicas un fenotipo más agresivo.

8.3. La presencia de metilación concomitante en *P16* y *BIK* muestra un impacto todavía más adverso en la SG en pacientes afectados de MM, que roza la significación cuando se analiza como factor de pronóstico independiente.

6. BIBLOGRAFÍA

A

Aggerholm, A., Guldberg, P., Hokland, M. and Hokland, P. (1999). 'Extensive Intra- and Interindividual Heterogeneity of p15 INK4B Methylation in', *Leukemia research*, 18: 436–441.

Agirre, X., Castellano, G., Pascual, M., Heath, S., *et al.* (2015). 'Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers', *Genome Research*, 25(4):478–487.

Alkebsi, L., Handa, H., Yokohama, A., Saitoh, T., *et al.* (2016). 'Chromosome 16q genes CDH1, CDH13 and ADAMTS18 are correlated and frequently methylated in human lymphoma', *Oncology Letters*, 12(5):3523–3530.

Aoki, Y., Nojima, M., Suzuki, H., Yasui, H., *et al.* (2012). 'Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma.', *Genome medicine*. BioMed Central Ltd, 4(12):101.

Arena, V., Martini, M., Luongo, M., Capelli, A. *et al.* (2003). 'Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas.', *Genes, chromosomes & cancer*, 38(1):91–96.

B

Bak, S. T., Staunstrup, N. H., Starnawska, A., Daugaard, T. F., *et al.* (2016). 'Evaluating the Feasibility of DNA Methylation Analyses Using Long-Term Archived Brain Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples', *Molecular Neurobiology*.

Bhutani, M., Landgren, O. and Usmani, S. Z. (2015). 'Multiple myeloma: is it time for biomarker-driven therapy?', *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting*. American Society of Clinical Oncology, 493-503.

Biswas, S. and Mallikarjuna Rao, C. (2017). 'Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond', *Pharmacology & Therapeutics*. Elsevier Inc., 173:118–134.

Bladé, J., Dimopoulos, M., Rosiñol, L., Rajkumar, S. V. *et al.* (2010). 'Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: Current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations', *Journal of Clinical Oncology*, 28(4):690–697.

Bodet, L., Mé Noret, E., Descamps, G., Pellat-Deceunynck, C., *et al.* (2010). 'BH3-only protein Bik is involved in both apoptosis induction and sensitivity to oxidative stress in multiple myeloma', *British Journal of Cancer*, 103:1808–1814.

Bollati, V., Fabris, S., Pegoraro, V., Ronchetti, D., *et al.* (2009). 'Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups.', *Carcinogenesis*, 30(8):1330–5.

Braggio, E., Maiolino, A., Gouveia, M. E., Magalhães, R., *et al.* (2010). 'Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma', *International Journal of Hematology*, 91(1):87–96.

Bredel, M., Bredel, C., Juric, D., Harsh, G. R., *et al.* (2005). 'High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors.', *Cancer research*, 65(10):4088–4096.

Broyl, A., Hose, D., Lokhorst, H., de Knegt, Y., *et al.* (2010). 'Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients.', *Blood*, 116(14):2543–2553.

C

Cairns, P., Esteller, M., Herman, J. G., Schoenberg, M., *et al.* (2001). 'Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(9):2727–2730.

de Carvalho, F., Colleoni, G. W. B., Sampaio Almeida, M. S., Carvalho, A. L., *et al.* (2009). 'TGFbetaR2 aberrant methylation is a potential prognostic marker and therapeutic target in multiple myeloma.', *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 125(8): 1985–1991.

Chim, C.-S., Liang, R., Leung, M.-H. and Kwong, Y.-L. (2007). 'Aberrant gene methylation implicated in the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma.', *Journal of clinical pathology*, 60(1):104–106.

Chim, C. S., Kwong, Y. L., Fung, T. K., Liang, R., *et al.* (2004). 'Methylation profiling in multiple myeloma.', *Leukemia research*. Elsevier, 28(4):379–385.

Chim, C. S., Fung, T. K. and Liang, R. (2003). 'Disruption of INK4/CDK/Rb cell cycle pathway by gene hypermethylation in multiple myeloma and MGUS', *Leukemia*, 17(12):2533–2535.

Chinnadurai, G., Vijayalingam, S. and Rashmi, R. (2008). 'BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes.', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 27 Suppl 1(S1):S20-29.

Chiusolo, P., Farina, G., Putzulu, R., Reddiconto, G., *et al.* (2006). 'Analysis of MTHFR polymorphisms and P16 methylation and their correlation with clinical–biological features of multiple myeloma', *Annals of Hematology*, 85(7):474–477.

Corn, P. G., Smith, B. D., Ruckdeschel, E. S., Douglas, D., *et al.* (2000). 'E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(11):4243–8.

D

Dai, Z., Liu, S., Marcucci, G. and Sadee, W. (2006). '5-Aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide synergistically induce expression of BIK (BCL2-interacting killer)', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(2):455–461.

Daniel, P. T., Pun, K. T., Ritschel, S., Sturm, I., *et al.* (1999). 'Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice.', *Blood*, 94(3):1100–1107.

Davies, F. E., Dring, A. M., Li, C., Rawstron, A. C., *et al.* (2003). 'Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis.', *Blood*, 102(13):4504–4511.

Dimopoulos, K., Gimsing, P. and Grønbaek, K. (2014). 'The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma.', *Blood cancer journal*, 4:207.

Dispenzieri, A., Kyle, R. A., Katzmann, J. A., Larson, D., *et al.* (2008). 'Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering multiple myeloma', *Blood*, 111(2):785–789.

Dumenil, T. D., Wockner, L. F., Bettington, M., McKeone, D. M., *et al.* (2014). 'Genome-wide DNA methylation analysis of formalin-fixed paraffin embedded colorectal cancer tissue', *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(7):537–548.

E

Espinal, A. C., Wang, D., Yan, L., Liu, S., *et al.* (2017). 'A methodological study of genome-wide DNA methylation analyses using matched archival formalin-fixed paraffin embedded and fresh frozen breast tumors.', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 8(9):14821–14829.

Esteller, M. (2008). 'Epigenetics in cancer.', *The New England journal of medicine*, 358(11):1148–1159.

Esteller, M., Silva, J. M., Dominguez, G., Bonilla, F., *et al.* (2000). 'Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors.', *Journal of the National Cancer Institute*, 92(7):564–569.

F

Field, J. K. (1992). 'Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck.', *European journal of cancer. Part B, Oral oncology*, 28B(1):67–76.

Fonseca, R., Bailey, R. J., Ahmann, G. J., Rajkumar, S. V., *et al.* (2002). 'Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance.', *Blood*, 100(4):1417–24.

G

Galm, O., Wilop, S., Reichelt, J., Jost, E., *et al.* (2004). 'DNA methylation changes in multiple myeloma.', *Leukemia*, 18(10):1687–1692.

Geraldes, C., Gonçalves, A. C., Cortesão, E., Pereira, M. I., *et al.* (2016). 'Aberrant p15, p16, p53, and DAPK Gene Methylation in Myelomagenesis: Clinical and Prognostic Implications', *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. Elsevier Inc., 16(12):713–720.

Gil, J. and Peters, G. (2006). 'Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 7(9):667–677.

Gonzalez-Paz, N., Chng, W. J., McClure, R. F., Blood, E., *et al.* (2007). 'Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications', *Blood*, 109(3):1228–1232.

Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C. M., Yang, A. S., Nguyen, T., *et al.* (1995). 'Methylation of the 5' CpG Island of the p16/CDKN2 Tumor Suppressor Gene in Normal and Transformed Human

Tissues Correlates with Gene Silencing”, *CANCER RESEARCH*, 55(4535).

Grady, W. M., Willis, J., Guilford, P. J., Dunbier, A. K., *et al.* (2000). ‘Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer.’, *Nature genetics*, 26(1):16–17.

Greipp, P. R., Miguel, J. S., Dune, B. G. M., Crowley, J. J., *et al.* (2005). ‘International staging system for multiple myeloma’, *Journal of Clinical Oncology*, 23(15):3412–3420.

Guillerm, G., Depil, S., Wolowiec, D. and Quesnel, B. (2003). ‘Different prognostic values of p15(INK4b) and p16(INK4a) gene methylations in multiple myeloma’, *Haematologica*, 88(4):15–17.

Guillerm, G., Gyan, E., Wolowiec, D., Facon, T., *et al.* (2001). ‘p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance.’, *Blood*, 98(1):244–246.

Gumbiner, B. M. (1995). ‘Signal transduction of beta-catenin.’, *Current opinion in cell biology*, 7(5):634–640.

H

Hanamura, I., Stewart, J. P., Huang, Y., Zhan, F., *et al.* (2006). ‘Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantatio’, *Blood*, 108(5):1724–1732.

Hatzimichael, E., Dasoula, A., Benetatos, L., Syed, N., *et al.* (2010). ‘Study of specific genetic and epigenetic variables in multiple myeloma’, *Leukemia & Lymphoma*, 51(12):2270–2274.

Hatzimichael, E., Dasoula, A., Kounnis, V., Benetatos, L., *et al.* (2012). ‘Bcl2-interacting killer CpG methylation in multiple myeloma: a potential predictor of relapsed/refractory disease with therapeutic implications.’, *Leukemia & lymphoma*, 53(9):1709–1713.

Hay, E. D. (1995). ‘An overview of epithelio-mesenchymal transformation.’, *Acta anatomica*, 154(1):8–20.

Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., *et al.* (2005). ‘MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.’, *The New England journal of medicine*, 352(10):997–1003.

Herman, J. G. and Baylin, S. B. (2003). 'Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.', *The New England journal of medicine*, 349(21):2042–2054.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D. *et al.* (1996). 'Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18):9821–9826.

Howlander, N., Noone, A., Krapcho, M., Miller, D., *et al.* (eds) (2016). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013*, National Cancer Institute, Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.

J

Jones, C. I., Zabolotskaya, M. V, King, A. J., Stewart, H. J. S., *et al.* (2012). 'Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma.', *British journal of cancer*, 107(12):1987–1996.

K

Kaiser, M. F., Johnson, D. C., Wu, P., Walker, B. A., *et al.* (2013). 'Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in mu', 122(2):219–226.

Kalushkova, A., Fryknäs, M., Lemaire, M., Fristedt, C., *et al.* (2010). 'Polycomb target genes are silenced in multiple myeloma.', *PloS one*, 5(7):11483.

Kim, H., Jekarl, D. W., Kim, M., Kim, Y., *et al.* (2013). 'Prevalence of p16 Methylation and Prognostic Factors in Plasma Cell Myeloma at a Single Institution in Korea', *Annals of Laboratory Medicine*, 33(1):28.

Krämer, A., Schultheis, B., Bergmann, J., Willer, A., *et al.* (2002). 'Alterations of the cyclin D1/pRb/p16INK4A pathway in multiple myeloma', *Leukemia*, 16(9):1844–1851.

Kristensen, L. S., Raynor, M. P., Candiloro, I. and Dobrovic, A. (2012). 'Methylation profiling of normal individuals reveals mosaic promoter methylation of cancer-associated genes.', *Oncotarget*, 3(4):450–61.

Kuehl, W. M. and Bergsagel, P. L. (2012). 'Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its

pre-malignant precursor.', *The Journal of clinical investigation*, 122(10):3456–3463.

Kulis, M. and Esteller, M. (2010). '2: DNA Methylation and Cancer', *Advances in Genetics*, 70(10):27–56.

Kumar, S. K., Mikhael, J., Buadi, F. K., Dingli, D., *et al.* (2009). 'Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma', *System*, 84:1095–1110.

Kumar, S., Zhang, L., Dispenzieri, A., Van Wier, S., *et al.* (2010). 'Relationship between elevated immunoglobulin free light chain and the presence of IgH translocations in multiple myeloma.', *Leukemia*, 24(8):1498–14505.

Kyle, R. A. and Rajkumar, S. V. (2014). 'Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Multiple Myeloma', *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 21(6):1093–1113.

Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Larson, D. R., *et al.* (2004). 'Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later.', *Mayo Clinic proceedings*, 79(7):859–866.

Kyle, R.A., Durie, B. G. M., Rajkumar, S. V., Landgren, O., *et al.* (2010). 'Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management.', *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 24(6):1121–1127.

Kyle, R.A., Remstein, E. D., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., *et al.* (2007). 'Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma.', *The New England journal of medicine*, 356(25):2582–2590.

L

Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J.A., *et al.* (2009). 'Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: A prospective study', *Blood*, 113(22):5412–5417.

Larsen, J. T., Kumar, S. K., Dispenzieri, A., Kyle, R. A., *et al.* (2013). 'Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 27:941–946.

Ling, C., Raasch, J. L. and Welham, N. V (2011). 'E-cadherin and transglutaminase-1 epithelial barrier restoration precedes type IV collagen basement membrane reconstruction following vocal fold mucosal injury.', *Cells, tissues, organs*, 193(3):158–169.

Liu, L., Tan, L. and He, Z. (2016). 'Methylation and mRNA expression levels of P15, death-associated protein kinase, and suppressor of cytokine signaling-1 genes in multiple myeloma.', *Iranian journal of basic medical sciences*, 19(7):755–762.

Lombaerts, M., Middeldorp, J. W., Van Der Weide, E., Philippo, K., *et al.* (2004). 'Infiltrating leukocytes confound the detection of E-cadherin promoter methylation in tumors', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(2):697–704.

López-Corral, L., Corchete, L. A., Sarasquete, M. E., Mateos, M. V., *et al.* (2014). 'Transcriptome analysis reveals molecular profiles associated with evolving steps of monoclonal gammopathies.', *Haematologica*, 99(8):1365–1372.

M

Mailankody, S., Mena, E., Yuan, C. M., Balakumaran, A., *et al.* (2010). 'Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma', *Leukemia & Lymphoma*, 51(12):2159–2170.

Martin, P., Garcia-Cosio, M., Santon, A. and Bellas, C. (2008). 'Aberrant gene promoter methylation in plasma cell dyscrasias', *Experimental and Molecular Pathology*, 84(3):256–261.

Mateos, M. V., García-Sanz, R., López-Pérez, R., Moro, M. J., *et al.* (2002). 'Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival', *British journal of haematology*. Blackwell Science Ltd, 118(4):1034–1040.

Mateos, M. V. and San Miguel, J. F. (2013). 'New approaches to smoldering myeloma', *Current Hematologic Malignancy Reports*, 8(4):270–276.

Mateos, M. V., Garcia-Sanz, R., López-Pérez, R., Balanzategui, A., *et al.* (2001). 'p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies.', *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association*, 2(3):146–9.

Minter, A. R., Simpson, H., Weiss, B. M. and Landgren, O. (2011). 'Bone disease from

monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma: Pathogenesis, interventions, and future opportunities', *Seminars in Hematology*. Elsevier Inc., 48(1):55–65.

Molina-Ortiz, I., Bartolomé, R. A., Hernández-Varas, P., Colo, G. P. *et al.* (2009). 'Overexpression of E-cadherin on melanoma cells inhibits chemokine-promoted invasion involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent inactivation of RhoA.', *The Journal of biological chemistry*, 284(22):15147–15157.

N

Neben, K., Jauch, A., Hielscher, T., Hillengass, J., *et al.* (2013). 'Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(34):4325–4332.

Ng, M. H., Wong, I. H. and Lo, K. W. (1999). 'DNA methylation changes and multiple myeloma.', *Leukemia & lymphoma*, 34(5–6):463–472.

P

Palumbo, A. and Anderson, K. (2011). 'Multiple Myeloma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 364(11):1046–1060.

Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., *et al.* (2015). 'Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(26):2863–2869.

Park, G., Kang, S. H., Lee, J. H., Suh, C., *et al.* (2011). 'Concurrent p16 methylation pattern as an adverse prognostic factor in multiple myeloma: a methylation-specific polymerase chain reaction study using two different primer sets', *Annals of Hematology*, 90(1):73–79.

Pérez-Persona, E., Mateo, G., García-Sanz, R., Mateos, M. V., *et al.* (2010). 'Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: Comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells', *British Journal of Haematology*, 148(1):110–114.

Pompeia, C., Hodge, D. R., Plass, C., Wu, Y.-Z. Z., *et al.* (2004). 'Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line', *Cancer*

Research, 64(10):3465–3473.

Portela, A. and Esteller, M. (2010). 'Epigenetic modifications and human disease.', *Nature biotechnology*, 28(10):1057–1568.

R

Rajan, A. M. and Rajkumar, S. V (2015). 'Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice.', *Blood cancer journal*. Nature Publishing Group, 5(10):365.

Rajkumar, S. V. (2014). 'Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk- stratification, and management', *American Journal of Hematology*, 89(10):999–1009.

Rajkumar, S. V. and Kumar, S. (2016). 'Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment', *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 91(1):101–119.

Rajkumar, S. V., Kyle, R. A. and Buadi, F. K. (2010). 'Advances in the diagnosis, classification, risk stratification, and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance: implications for recategorizing disease entities in the presence of evolving scientific evidence.', *Mayo Clinic proceedings*. Mayo Foundation for Medical Education and Research, 85(10):945–948.

Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M., Lii, L. J. M., *et al.* (2005). 'Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance', *Blood*, 106(3):812–817.

Rajkumar, S. V. and Landgren, O. (2015). 'Smoldering multiple myeloma', 125(20):3069–3076.

Rajkumar, S. V., Gupta, V., Fonseca, R., Dispenzieri, A., *et al.* (2013). 'Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma.', *Leukemia*, 27(8):1738–1744.

Ribas, C., Colleoni, G. W. B., Felix, R. S., Regis Silva, M. R., *et al.* (2005). 'p16 gene methylation lacks correlation with angiogenesis and prognosis in multiple myeloma', *Cancer Letters*, 222(2):247–254.

Rodriguez, C., Borgel, J., Court, F., Cathala, G., *et al.* (2010). 'CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus.', *Biochemical and biophysical research communications*, 392(2):129–134.

Rosiñol, L., Cibeira, M. T., Montoto, S., Rozman, M., *et al.* (2007). 'Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size.', *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 82(4):428–434.

S

Salhia, B., Baker, A., Ahmann, G., Auclair, D., *et al.* (2010). 'DNA Methylation Analysis Determines the High Frequency of Genic Hypomethylation and Low Frequency of Hypermethylation Events in Plasma Cell Tumors', *Cancer Research*, 70(17):6934–6944.

Schinasi, L. H., Brown, E. E., Camp, N. J., Wang, S. S., *et al.* (2016). 'Multiple myeloma and family history of lymphohaematopoietic cancers: Results from the International Multiple Myeloma Consortium', *British Journal of Haematology*, 175:87–101.

Seckinger, A., Meißner, T., Moreaux, J., Benes, V., *et al.* (2015). 'miRNAs in multiple myeloma--a survival relevant complex regulator of gene expression.', *Oncotarget*, 6(36):39165–39183.

Seidl, S., Ackermann, J., Kaufmann, H., Keck, A., *et al.* (2004). 'DNA-methylation analysis identifies the E-cadherin gene as a potential marker of disease progression in patients with monoclonal gammopathies', *Cancer*, 100(12):2598–2606.

Sharma, A., Heuck, C. J., Fazzari, M. J., Mehta, J., *et al.* (2010). 'DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(6):654–669.

Shaughnessy, J. D., Zhan, F., Burington, B. E., Huang, Y., *et al.* (2007). 'A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1.', *Blood*, 109(6):2276–84.

Shirahama, S., Furukawa, F., Wakita, H., Takigawa, M., *et al.* (1996). 'E- and P-cadherin expression in tumor tissues and soluble E-cadherin levels in sera of patients with skin cancer.', *Journal of dermatological science. Elsevier*, 13(1):30–36.

Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2012). 'Cancer statistics, 2012', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1):10–29.

Sive, J. I., Feber, A., Smith, D., Quinn, J., *et al.* (2016). 'Global hypomethylation in myeloma is associated with poor prognosis', *British Journal of Haematology*, 172:473–475.

Solomon, P. R., Munirajan, A. K., Tsuchida, N., Muthukumarasamy, K., *et al.* (2008). 'Promoter hypermethylation analysis in myelodysplastic syndromes: diagnostic & prognostic implication.', *The Indian journal of medical research*, 127(1):52–57.

Stanganelli, C., Arbelbide, J., Fantl, D. B., Corrado, C. *et al.* (2010). 'DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance', *Annals of Hematology*, 89(2):191–199.

T

Taddei, M. L., Chiarugi, P., Cirri, P., Buricchi, F., *et al.* (2002). 'Beta-catenin interacts with low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase.', *Cancer research*, 62(22):6489–99.

Terpos, E., Katodritou, E., Roussou, M., Pouli, A., *et al.* (2010). 'High Serum Lactate Dehydrogenase Adds Prognostic Value to the International Myeloma Staging System even in the Era of Novel Agents', *European Journal of Haematology*, 85:114–119.

Therneau, T. M., Kyle, R. A., Melton, L. J., Larson, D. R., *et al.* (2012). 'Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition.', *Mayo Clinic proceedings*. Elsevier Inc., 87(11):1071–1079.

U

Uchida, T., Kinoshita, T., Ohno, T., Ohashi, H., *et al.* (2001). 'Hypermethylation of p16INK4A gene promoter during the progression of plasma cell dyscrasia.', *Leukemia*, 15(1):157–165.

V

Van Zee, K. J., Calvano, J. E. and Bisogna, M. (1998). 'Hypomethylation and increased gene expression of p16INK4a in primary and metastatic breast carcinoma as compared to normal breast tissue.', *Oncogene*, 16(21):2723–2727.

Velinov, M., Gu, H., Shah, K., Genovese, M., *et al.* (2001). 'PCR-Based Methylation Testing for Prader-Willi or Angelman Syndromes Using Archived Fixed-Cell Suspensions', *Genetic Testing*. Mary Ann Liebert, Inc. , 5(2):153–155.

W

Walker, B. A., Wardell, C. P., Chiecchio, L., Smith, E. M., *et al.* (2011). 'Aberrant global

methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma.', *Blood*. American Society of Hematology, 117(2):553–562.

Waxman, A. J., Mink, P. J., Devesa, S. S., Anderson, W. F., *et al.* (2015). 'Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma : a population-based study', *Blood*, 116(25):5501–5507.

Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S. *et al.* (2009). 'A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients', 113(22):5418–5422.

Wong, K. Y. and Chim, C. S. (2015). 'DNA methylation of tumor suppressor protein-coding and non-coding genes in multiple myeloma.', *Epigenomics*, 7:985–1001.

Y

Yuregir, O., Yurtcu, E., Kizilkilic, E., Kocer, N. E., *et al.* (2010). 'Detecting methylation patterns of p16, MGMT, DAPK and E-cadherin genes in multiple myeloma patients', *International Journal of Laboratory Hematology*, 32(2):142–149.

Z

Zhai, B., Yan, H.-X., Liu, S.-Q., Chen, L., *et al.* (2008). 'Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas.', *World journal of gastroenterology*, 14(37):5665–5673.

Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J. P., *et al.* (2006). 'The molecular classification of multiple myeloma.', *Blood*, 108(6):2020–2028.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. and Anderson, T. A. (2007). 'microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.', *Developmental biology*, 302(1):1–12.

Zhang, W. and Xu, J. (2017). 'DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis', *Biomarker Research*. Biomarker Research, 5(1):1.