






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>

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA DE BAJO RIESGO CITOGENÉTICO

Memoria presentada por

Laura Palomo Sanchis

Para optar al Grado de

Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección de la **Dra. Lurdes Zamora Plana**, el **Dr. Francesc Solé i Ristol**

y la tutoría de la **Dra. Inmaculada Ponte Marull**

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultad de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA
CRÓNICA DE BAJO RIESGO CITOGENÉTICO**

Memoria presentada por

Laura Palomo Sanchis

Para optar al Grado de

Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección de la **Dra. Lurdes Zamora Plana**, el **Dr. Francesc Solé i Ristol** y la tutoría de la **Dra. Inmaculada Ponte Marull**

Laura Palomo Sanchis
La doctoranda

Lurdes Zamora Plana
La directora de tesis

Francesc Solé i Ristol
El director de tesis

Bellaterra, 2017

La Dra. Lurdes Zamora Plana, Responsable de la Unidad de Biología Molecular del Laboratorio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol e Investigadora Principal del Grupo de Genética y Epigenética en Neoplasias Mieloides del Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras; y el Dr. Francesc Solé i Ristol, director de la Plataforma de Citogenética e Investigador Principal del Grupo de Síndromes Mielodisplásicos del Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras.

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada “Caracterización genética de la leucemia mielomonocítica crónica de bajo riesgo citogenético”, presentada por Laura Palomo Sanchis, para acceder al título de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida delante del tribunal correspondiente.

El trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol y en los grupos de Genética y Epigenética en Neoplasias Mieloides y de Síndromes Mielodisplásicos del Institut de recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras.

Barcelona, 2017

Dra. Lurdes Zamora Plana

Dr. Francesc Solé i Ristol

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Després de les presses i els nervis de les últimes setmanes, ha arribat el moment de seure tranquil·lament, mirar enrere i fer un repàs de tots aquells moments tan especials d'aquests darrers anys i de totes les persones que han fet possible que em trobi aquí en aquest moment. Espero no deixar-me a ningú. Ha estat una aventura inoblidable!!

Primer de tot, vull donar les gràcies als meus directors de tesi. **Lurdes**, gràcies per acollir-me tan bé quan vaig arribar a Can Ruti. Durant tots aquells primers mesos al teu lab vaig aprendre moltíssim, gràcies per ensenyar-me el món de la biologia molecular i de l'hematologia des de zero. Gràcies per pensar un projecte per mi i per animar-me a demanar totes aquelles beques (quants "no" vam haver de sentir?). Moltes gràcies per preocupar-te sempre per mi, i pel teu esforç continu per tirar endavant aquest projecte, no ha estat fàcil però ho hem aconseguit!! Estic molt orgullosa de la nostra feina! Gràcies per escoltar sempre les meves idees, per confiar en mi, per donar-me llibertat i per estar sempre allà per qualsevol cosa. Gràcies per la teva paciència i dedicació, i per totes les correccions, especialment aquests últims mesos, et mereixes un descans! He après molt de tu no només a nivell científic i tècnic, sinó també com a persona. **Kiko**, moltes gràcies per donar-me una oportunitat quan semblava que ja no quedava cap beca més per demanar, i gràcies per fer-me sentir de seguida una més del teu grup de SMD! Ha sigut un plaer aprendre d'algú que gaudeix tant del que fa! Moltes gràcies per tota la confiança que sempre has dipositat en mi, pels ànims en els moments difícils, per tenir sempre la porta oberta, per portar-nos a tot arreu, em queden molts bon records. I sobretot, gràcies per la oportunitat de poder seguir formant part d'aquesta família. Ho celebrem amb unes margarites?

Quan vaig arribar a Can Ruti tot just acabava els estudis, sembla que va ser ahir però ja fa 6 anys d'això!! **Carlos**, muchas gracias por ayudarme cuando terminé la carrera y también por preocuparte siempre de que todo me fuera bien. Al **Dr Feliu**, moltes gràcies per donar-me l'oportunitat de treballar amb vosaltres i gràcies per dedicar tant d'esforç a impulsar aquest gran projecte que és l'IJC. Ha sigut molt maco veure néixer l'institut, i ja tenim edifici!!

A totes les noies de molecular, gràcies per tot el que m'heu ensenyat, encara tinc tots els apunts de la època en que us seguia per tot el laboratori!! **Marta**, moltes gràcies pels teus ànims, com hem patit amb els panells, l'IGV, la metilació... per tots els nostres dubtes, sempre és més divertit si no estàs sol, i al final hem après molt (i encara ho fem!!). **Silvia**, gràcies per preocupar-te sempre per mi i per ajudar-me quan ho he necessitat, dintre i fora del lab, vals un imperi! **Diana**, gracias por tu alegría y tu naturalidad, de vez en cuando aún me acuerdo del "fuuuuuuuuuuuuuu!!!" y me río sola!! **Jordi**, ens vam conèixer a molecular i, qui ho diria? 6 anys després dipositem la tesi junts!! Gràcies per fer tan i tan divertits tots els moments que hem compartit. Primer al màster, on em va quedar clar, quan ens vam matricular, que eres un pàjaro i que podia esperar qualsevol cosa de tú (matrícula gratis, aprovecha esta oferta única!). Aiii les classes en les que no enteníem res (sleepy teacher i les xaperones!), les caravanes a la C-58, la teva presentació sobre "el nicho" (vaig aprendre molt!)... Després el trasllat a l'IJC (amb carritos de la compra!), hem compartit taula, hores a cultius (com es fa una dilució??),

esmorzars, cafès, ping-pong, sopars (quantes copes de vi portes tu??), el panther... Fins arribar a la tesi, si és que hem compartit estrès i tot!! Ets un sol, sempre estàs disposat a escoltar i a ajudar als altres, i sempre saps com fer-me riure. Pues claroooo!

A tot el laboratori d'hemato! Al lab de citogenètica, **Isabel, Javier, Neus, Adela, Marisol, Carmen i Nani**, moltes gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat, sou un equip genial! A **Fuensanta** i al **Tomàs**, porque gracias a vosotros sé lo que es un blasto, i per tot el que he après amb les vostres sessions de citologia. Al **Jordi** i la **Inès**, perquè feu que la citometria no sembli tan difícil!

A l'equip fantàstic de persones de l'àtic d'hematologia de Can Ruti. Al **Dr Ribera**, per la teva naturalitat, les ganes de fer coses i la capacitat de motivar als altres. **Blanca**, et vull donar les gràcies per tot el que ens has ajudat amb aquest projecte, no hagués estat possible sense tú!! Gràcies també per la força que transmetes, la teva empenta i les ganes que tens sempre de fer coses noves. Per preocupar-te per les mostres i per compartir el teu carinyo pels SMD i, especialment, per la LMMC!! A **Mariajo**, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, y por enseñarme a usar el SAP! **Olga**, moltíssimes gràcies per la teva gran ajuda, per tots els anàlisis estadístics, per la teva paciència, per les sintaxi, per explicar-me mil cops la diferència entre mitjana estadística i mitjana de supervivència... fas que sembli fàcil. Però sobretot, gràcies per fer-ho tot sempre amb tant de carinyo!!

A tot el grup de SMD, sou increïbles! Especialment a la Mar i la Vera, gràcies per tot el vostre carinyo i els ànims durant el primer any juntes i per fer-me sentir com una pipa més ☺ la vostra tassa sempre em fa somriure (todo saldrá bien porque tú eres la leche). **Mar**, gràcies per la teva ajuda, quan vaig començar a treballar amb vosaltres i sempre, per escoltar tots els meus dubtes, perquè sempre saps com solucionar un problema, per ensenyar-me a fer arrays, pel ChAS i per ensenyar-me taaaantes altres coses. Però sobretot, gràcies per la teva amistat, perquè sé que puc comptar amb tu, perquè saps escoltar, pel nostre toc (els altres no ens entenen...), pels cotilleos, perquè ens mengem el dònut si volem i no passa res, per les compres (sí, tu vas ajudar a crear el monstre!) i per fer més divertits tots els viatges i congressos (agafem l'agenda i anem a organitzar els dies??). **Vera**, et dic el mateix que em vas dir tu: sense tu no hauria estat el mateix!! Quan vaig començar amb vosaltres de seguida em vas transmetre la teva passió per la recerca i pels SMD. Per tot el que m'has ensenyat al lab i per tot el que hem après juntes: el temps a cultius (posa la radio i ballem una mica!), les hores davant de la base de dades (horror!), les PCRs i els gels (aquest gel no entra a la cubeta....plaff! jajaja), la teva ajuda amb els CD3+ fins i tot des dels EEUU, els panells (hi ha dues corbes al bioanalyzer??)... en fi, ja saps del què parlo, treballar amb tu ha estat molt divertit i ho trobo a faltar!! Pel nostre mini-roadtrip per California, els cafès, les llàgrimes i els riures, els skypes... i per seguir sent la meva amiga des de la distància!! **Paula**, des de que vas arribar sempre has estat disposada a ajudar amb tot el que calgués, gràcies per la teva voluntat i per la cura que tens amb tot el que fas. Ah, i per ser el meu pinche quan em vaig quedar sense dit!! Gràcies per ser la millor de les malvades, però també la més bona, per escoltar, i pel nostres petits capritxos (Harry Potter, compres online...

control!!). **Nuri**, gràcies per la teva ajuda amb les mostres i la base de dades, per fer-te càrrec de tot, ets una súper ajuda al lab, de veritat!! Gràcies per les teves ganes d'aprendre coses noves, per organitzar totes les quedades, per la teva alegria, per preocupar-te, per la vena verdulera (a ver chicas, que os cuentoooo) i pels xupitos de tequila!!! **Francisco**, gràcies per no espantar-te (gaire) cada cop que vinc a demanar-te alguna cosa: em pots fer un Circos? Un Karyoview? Em pots anotar aquests gens? Pots córrer aquest panell? Pots afegir això al Bigbro? El reviewer pesat ha tornat a contestar! M'has ajudat moltíssim!! Gràcies per estar sempre disposat a ajudar, per portar-nos fruita, pel teu humor i per la teva paciència! **Neus**, gràcies per la teva voluntat, inquietud i motivació, sempre amb un somriure a la cara, ja saps que soc fan de les teves teories!!! **Pame**, llevas con nosotros poco más de un año y no sabes lo agradecida que te estoy, no podría haber dedicado tanto tiempo a esta tesis si tú no hubieras estado en el lab para ayudarme (sin ti me daba un jamacuco!!). Gracias por preocuparte, por estar siempre dispuesta a echar una mano y a escuchar... Sigue adelante, y no te preocupes, juntas sacaremos adelante el proyecto de single cell!!

A la resta companys de laboratori de l'IJC!! **Joao**, cuando te conocí en la biblio de hemato en seguida me ofreciste tu ayuda con las becas. Gracias por todos tus consejos en el lab, con los papers, con la estadística... Gracias por escuchar y por todas nuestras charlas, ya sean sobre ciencia, vela, música o sobre el futuro!! **Josep**, gràcies per la teva alegria, és contagiosa! Per totes les coses tan interessants que expliques i per preocupar-te sempre. Ah, i per ser el cierra-antros number one (juntament amb mi... jaja)!! **Rocío**, gracias por cuidar del circuito de muestras, por ser tan meticulosa, por tus horas y horas de cultivos, por ser tan buena y por facilitarnos a todos el trabajo!! A l'equip de citòmica, **Jordi**, gràcies pels teus consells i per les ganes de fer recerca. **Laura**, gràcies per la teva ajuda amb els CD3+, CD34+, i pels balls quan sortim de festa, aguantant fins al final!

A tota la gent que ha contribuït a tirar endavant aquest projecte. A la **Pilar** i l'**Anna**, gràcies per tota la feina que heu fet, per ensenyar-me sobre llibreries i sobre el MiSeq, pel lio de calendaris i per intentar fer-nos sempre un forat!! Al **Lauro**, al seu equip i al **Gabriel**, moltes gràcies per tota la feina amb el arrays de metilació. A **Marcus** y **Roberto**, muchas gracias por vuestra ayuda con el proyecto de metilación. Marcus, gracias por tus ideas y consejos. Roberto, gracias por todas las horas que le has dedicado (anàlisis, gràfics, correcciones...), y sobretodo por tu paciència, especialmente cuando te ponía mi cara de "no entiendo nada....". A la **Bàrbara**, gràcies pels teus consells, per ensenyar-me a fer servir el bioanalyzer, per la teva disposició i per tenir sempre recursos per tot!! A la resta de grups de recerca i a tot el personal de l'**IJC** i de l'**IMPPC**, gràcies per la vostra gran ajuda, no només quan vam arribar a l'edifici sino durant tots aquests anys!

A totes les persones que ens han enviat mostres i que han fet possible aquesta tesi. Sobretot a la gent de l'ICO, la **Montse Arnan**, la **Helena Pomares** i la **Rosa Coll**, per contestar sempre els meus mails i omplir les bases de dades!! A todos los grupos del GESMD que colaboran con nosotros, y especialmente a los que nos enviasteis muestras para hacer SNP-arrays, **María**

José Calasanz, María José Larrayoz, Jose Cervera y Esperanza Such, muchas gracias!! Gracias a los grupos del **Dr. Maciejewski**, en Cleveland, y del **Dr. Shih**, en Taiwan, por aportar casos para este proyecto.

A la gent de la UAB que m'ha ajudat en aquest camí. A la **Inma**, la meva tutora, especialment per la seva ajuda amb tots els tràmits (papers, signatures, pràctiques de laboratori...), fins i tot quan vaig a l'últim moment! A **Alicia**, por venir cada año a Can Ruti para mi comisión de seguimiento, por todos los trámites y por animarme siempre.

A tota la **Fundació Carreras**, per la feina que feu cada dia, per la il·lusió que hi poseu i per tot el que heu aconseguit!! Especialment a l'**Alex** i la **Marta**, gràcies per preocupar-vos, per posar cara a la recerca que fem a l'IJC, per l'alegria que transmeteu quan feu la vostra feina. Fins que la curem, no pararem!

Vull agrair de tot cor als pacients que col·laboren amb nosaltres de forma desinteressada, la recerca que fem no seria possible sense tota la seva ajuda.

También quiero dar las gracias a todas mis amigas!! Especialmente a las 7up y a las Químicas! **Ana, Carmen, Diana, Lea, María y Marina**, son muchos años juntas (con algunas más de 20) y siempre habéis confiado en mí!! Gracias por las risas, viajes, birras y cafés, más risas, cenas, charlas, fiestas... y más risas! Por esos momentos de desconexión, que no todo es trabajo!! Estamos repartidas por el mundo, pero sabéis que os adoro! **Marta, Laura y Marta**, gracias por hacer que la carrera con vosotras fuera una auténtica aventura!! Porque compartís mi lado friki (hasta hemos hablado con reacciones orgánicas!), por las fiestas universitarias, por las horas de estudio en la biblioteca (y las horas de no estudio en la biblioteca, y en el bar!), por el modo off (melón!), por los viajes (que hay mejor que un viaje de fin de carrera en NYC?), porque siempre me animasteis a investigar y porque sé que cuento y podré seguir contando con todas vosotras!! A tots els **Bioquímics**, pels moments compartits, la vida de bar i per dir-me que podria amb tot! **Mireia**, perquè ens hem retrobat a la feina i és genial, quan organitzem una altra mini-estada?

A **Ezequiel**, gracias por ser mi mayor fan (envíame tu poster que me lo imprimo!). Por preguntarme aunque no entiendas lo que te explico. Porque sabes que "soy científica" (vas en automático!) pero te encanta (soy un robot!). Por recordarme que puedo con todo! Por lo bien que me conoces, por cuidarme, escucharme, entenderme y hacerme reír. Gracias por compartir esta aventura conmigo, a lo loco se vive mejor!

A las familias **Palomo** y **Sanchis**, por estar siempre ahí. Especialmente a **Marta**, porque es genial tener una prima que entienda lo maravillosa y estresante que puede llegar a ser la vida del predoc. Quién nos iba a decir que compartiríamos cenas navideñas...de trabajo!! A **Coe**, por preocuparte y animarme siempre. A **Eva**, por hacerme de hermana (para esas "cosas de chicas"). Porque no callamos, porque "tú y yo ya nos entendemos". Gracias por estar ahí, por compartir tu amor por la música y tu lado friki (hablemos del plasma...). A **Pablo**, gracias por cuidar siempre de mí, por preocuparte y hacerme saber lo orgulloso que estás de tu hermanita,

por tus bromas, por hacer de hermano responsable pero no demasiado (quien es el hermano mayor? te invito a otra pomada más!!), y porque sé que puedo y podré contar siempre contigo. **Mamá**, porque si estoy aquí es gracias a ti. Gracias por ser mi apoyo incondicional, mi ejemplo a seguir, la persona que está ahí para todo (y más!), por todo lo que me ayudas, te lo pida o no. Gracias por tus consejos, tu sinceridad, generosidad, tu cariño y tu sentido del humor. Por nuestras charlas en la terraza, cines (con palomitas!) y tardes de compras!! Por ser mi compañera de piso bien avenida! Gracias por animarme y repetirme una y otra vez que puedo con todo. Mamá, Pablo, esto es para los cuatro!

INDICE

INDICE	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
1. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	15
1.1. HEMATOPOYESIS	15
1.2. NEOPLASIAS MIELOIDES	17
2. LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA	19
2.1. CONTEXTO HISTÓRICO	21
2.2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA	22
2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	22
2.4. DIAGNÓSTICO	24
2.4.1. Diagnóstico y clasificación	24
2.4.1.1. Morfología e histología	24
2.4.1.1. Clasificación FAB	25
2.4.1.2. Clasificación de la OMS	26
2.4.2. Diagnóstico diferencial	27
2.5. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS	29
2.6. CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS	30
2.6.1. Perfil citogenético	30
2.6.2. Valor pronóstico de la citogenética	32
2.7. MUTACIONES SOMÁTICAS	33
2.7.1. Reguladores epigenéticos	36
2.7.2. Maquinaria de splicing	39
2.7.3. Transducción y señalización celular	40
2.7.4. Otros mecanismos	42
2.8. ÍNDICES PRONÓSTICOS	44
2.8.1. <i>CMML-specific prognostic scoring system</i>	46
2.8.2. <i>GFM CMML prognostic Model</i>	46
2.8.3. <i>Mayo prognostic model for CMML</i>	46
2.8.4. <i>CMML Mayo Molecular Model</i>	47
2.8.5. <i>Molecular CMML-specific prognostic scoring system</i>	47
2.9. TRATAMIENTO	49

2.9.1. Manejo de las citopenias	49
2.9.2. Enfoque terapéutico de la enfermedad proliferativa	50
2.9.3. Agentes hipometilantes	50
2.9.4. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos	51
3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO Y EPIGENÉTICO DE LA LMMC	52
3.1. CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL Y FISH	52
3.2. MICROARRAYS GENÓMICOS DE ADN	54
3.2.1. Fundamento de la técnica	54
3.2.2. Estudios de microarrays genómicos en la LMMC	57
3.3. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN DEL ADN	57
3.3.1. Método de Sanger	58
3.3.2. Técnicas de secuenciación masiva	59
3.4. METILACIÓN DEL ADN	63
3.4.1. Conversión por bisulfito	65
3.4.2. <i>Microarrays</i> de metilación del ADN	66
3.4.3. Estudios de metilación del ADN en la LMMC	67
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	69
<u>RESULTADOS</u>	73
TRABAJO I: IMPACTO DEL CARIOTIPADO MEDIANTE SNP-A EN EL DIAGNÓSTICO Y EL PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA DE BAJO RIESGO CITOGÉNÉTICO	79
TRABAJO II: LA SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA MEJORA LA ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA EN LA LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA DE BAJO RIESGO CITOGÉNÉTICO	85
<u>DISCUSIÓN</u>	89
1. EMPLEO DE TÉCNICAS MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE LA LMMC	91
1.1. <i>MICROARRAYS</i> DE SNP	92
1.2. SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA	93
2. CARACTERÍSTICAS DE LA LMMC DE BAJO RIESGO CITOGÉNÉTICO	94

2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS	95
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS	97
2.2.1. Alteraciones en el número de copias y pérdida de heterocigosidad	98
2.2.2. Mutaciones somáticas	100
2.2.3. Adquisición de mutaciones en la progresión de la enfermedad	103
3. FACTORES PRONÓSTICOS GENÉTICOS EN LA LMMC DE BAJO RIESGO	
CITOGENÉTICO	104
3.1. FACTORES PRONÓSTICO CLÍNICO-BIOLÓGICOS	104
3.2. FACTORES PRONÓSTICO GENÉTICOS	105
3.2.1. Alteraciones detectadas mediante SNP-A	105
3.2.2. Mutaciones somáticas	106
4. CARACTERÍSTICAS EPIGENÉTICAS DE LA LMMC	108
4.1. ALTERACIONES EN LA METILACIÓN DEL ADN Y PRESENCIA DE REGIONES SIGNIFICATIVAMENTE ALTERADAS EN LA LMMC	109
4.2. CORRELACIÓN DEL PERFIL DE METILACIÓN DE LA LMMC CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS Y GENÉTICAS DE LOS PACIENTES	111
4.3. DIFERENCIAS EN LA METILACIÓN DEL ADN ENTRE LA LMMC DE BAJO RIESGO CITOGENÉTICO Y EL RESTO DE GRUPOS CITOGENÉTICOS	112
<u>CONCLUSIONES</u>	115
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	121
<u>ANEXOS</u>	147
ANEXO 1. TRABAJO III: EL PERFIL DE METILACIÓN EN LA LMMC SE ASOCIA A CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, BIOLÓGICAS Y GENÉTICAS	149
ANEXO 2. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS DE LOS TRABAJOS DE ESTA TESIS	153
ANEXO 3. OTRAS PUBLICACIONES ELABORADAS DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL	155

ABREVIATURAS

5mC: 5 metil-citosina

ADN: ácido desoxiribonucleido

AEE: agentes estimuladores de la eritropoyesis

Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AMO: aspirado de médula ósea

AR: anemia refractaria

ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

AREB-T: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

AZA: 5-azacitidina

BMO: biopsia de médula ósea

CC: citogenética convencional

CFU: unidad formadora de colonias (*colony formation unit*)

CFU-M: unidad formadora de colonias mieloide

CFU-L: unidad formadora de colonias linfoide

CGHa: *arrays* de hibridación genómica comparada (*comparative genomic hybridization arrays*)

CH: concentrados de hematíes

CNA: alteración en el número de copias (*copy number alteration*)

CNV: variación en el número de copias (*copy number variation*)

CPSS: Sistema pronóstico específico de la LMMC (*CMML-specific prognostic scoring system*)

CPSS-Mol: Sistema pronóstico molecular específico de la LMMC (*Molecular CMML-specific prognostic scoring system*)

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

DEC: decitabina

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

ddNTP: didesoxinucleótidos trifosfato

DT: dependencia transfusional

EPO: eritropoyetina

FAB: Franco-Americano-Británico

FISH: hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*)

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos (*granulocyte colony stimulating factor*)

GESMD: Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos

GFM: Grupo Francés de Síndromes Mielodisplásicos (*Groupe Francophone des Myelodysplasies*)

Hb: hemoglobina

HMA: agentes hipometilantes (*hypomethylating agents*)

H3-K27: lisina 27 de la histona H3

IMC: células inmaduras mieloides (*immature myeloid cells*)

Indels: variantes de inserción o delección

IPSS: índice pronóstico internacional (*International prognostic scoring system*)

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

LMA: leucemia mieloide aguda

LMC: leucemia mieloide crónica

LMCa: leucemia mieloide crónica atípica

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

LMMC-0: leucemia mielomonocítica crónica tipo 0

LMMC-1: leucemia mielomonocítica crónica tipo 1

LMMC-2: leucemia mielomonocítica crónica tipo 2

LMMC-MD: leucemia mielomonocítica crónica variante mielodisplásica

LMMC-MP: leucemia mielomonocítica crónica variante mieloproliferativa

LMMJ: leucemia mielomonocítica juvenil

LOH: pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*)

MDAPS: Índice del M.D. Anderson Cancer Center (*M.D. Anderson Prognostic Score*)

MFP: mielofibrosis primaria

MMM: Modelo molecular de la Clínica Mayo para la LMMC (*CMML Mayo Molecular Model*)

MO: médula ósea

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NGS: secuenciación masiva o de nueva generación (*next generation sequencing*)

NMP: neoplasias mieloproliferativas

NMP Ph.: neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas

OMS: Organización Mundial de la Salud

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

PRC2: complejo represivo *polycomb* (*polycomb repressive complex*)

Pre-ARNm: pre-ARN mensajero

PV: policitemia vera

SAM: S-adenosil-metionina

SG: supervivencia global

SMD: síndromes mielodisplásicos

SMD/NMP: neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas

SMD/NMP-I: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa inclasificable

SNP: polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*)

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

SNVs: variantes de un cambio de nucleótido (*single nucleotide variants*)

SLP: supervivencia libre de progresión

SP: sangre periférica

TE: trombocitemia esencial

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

tLMMC: leucemia mielomonocítica crónica secundaria a tratamiento

TSG: gen supresor de tumores (*tumor suppressor gene*)

INTRODUCCIÓN

1. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Las **neoplasias hematológicas** son enfermedades malignas del sistema hematopoyético que pueden afectar a la médula ósea, sangre periférica y tejidos linfáticos. En las neoplasias hematológicas, alguno de los elementos de la hematopoyesis se ve afectado por un proceso maligno.

Constituyen un grupo de enfermedades muy heterogéneo que se divide en dos grandes grupos en función del linaje celular afectado: las neoplasias linfoides y las neoplasias mieloides. La introducción de esta tesis se focalizará en las neoplasias mieloides y, más concretamente, en la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), motivo de estudio de la presente tesis.

1.1. Hematopoyesis

La **hematopoyesis** es el mecanismo fisiológico responsable de la formación y desarrollo de las células del sistema hematopoyético, constituido por la sangre periférica (SP), la médula ósea (MO), los ganglios linfáticos, el bazo y el timo.

Durante la etapa embrionaria y fetal, la hematopoyesis constituye primero un fenómeno extraembrionario para acabar luego asentándose en el embrión, en el hígado y el bazo inicialmente y en la MO definitivamente. Durante los primeros años de vida la MO activa (médula roja) se localiza en todos los huesos y gradualmente es reemplazada por tejido medular inactivo (médula amarilla o grasa). La expansión del tejido hematopoyético finaliza en la infancia. En el adulto, la hematopoyesis se desarrolla en la MO de los huesos planos, como el esternón, las vértebras, la pelvis y las costillas (Woessner and Florensa, 2006). La MO permite el anidamiento, crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas. Está regulada por mecanismos muy complejos, que incluyen interacciones de las células entre sí, con el microambiente, con factores de crecimiento y con la matriz extracelular.

El proceso de renovación de las células sanguíneas y del sistema inmune se mantiene gracias a una pequeña población de células madre hematopoyéticas, pluripotentes, localizadas en la MO. Estas células tienen la capacidad de auto renovarse para mantener el suministro de las progenies a largo plazo y, a la vez, tienen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a los distintos linajes hematopoyéticos (Ogawa, 1993). La mayoría de células madre se encuentran en una fase quiescente del ciclo celular y solo unas pocas células están activas, dando lugar a la renovación de las diferentes células del sistema hematopoyético (Lajtha, 1963). La célula madre hematopoyética se conoce también como “unidad formadora de colonias linfoides mieloide” (*lymphoid myeloid colony forming unit*, CFU-LM), por su capacidad de producir *in vitro* colonias de células de los linajes mieloide y linfoides. La CFU-LM da lugar a las células progenitoras mieloide (CFU-M) y linfoides (CFU-L). A su vez, estas células progenitoras pluripotentes dan lugar a otras poblaciones comprometidas irreversiblemente hacia la

diferenciación de los distintos linajes (Figura 1). Cada tipo celular se desarrolla en un ambiente concreto de la médula, llamado nicho, formado por distintos elementos del microambiente medular que intervienen en el proceso de diferenciación celular y que, además, ofrecen a la célula un soporte físico (Woessner and Florensa, 2006).

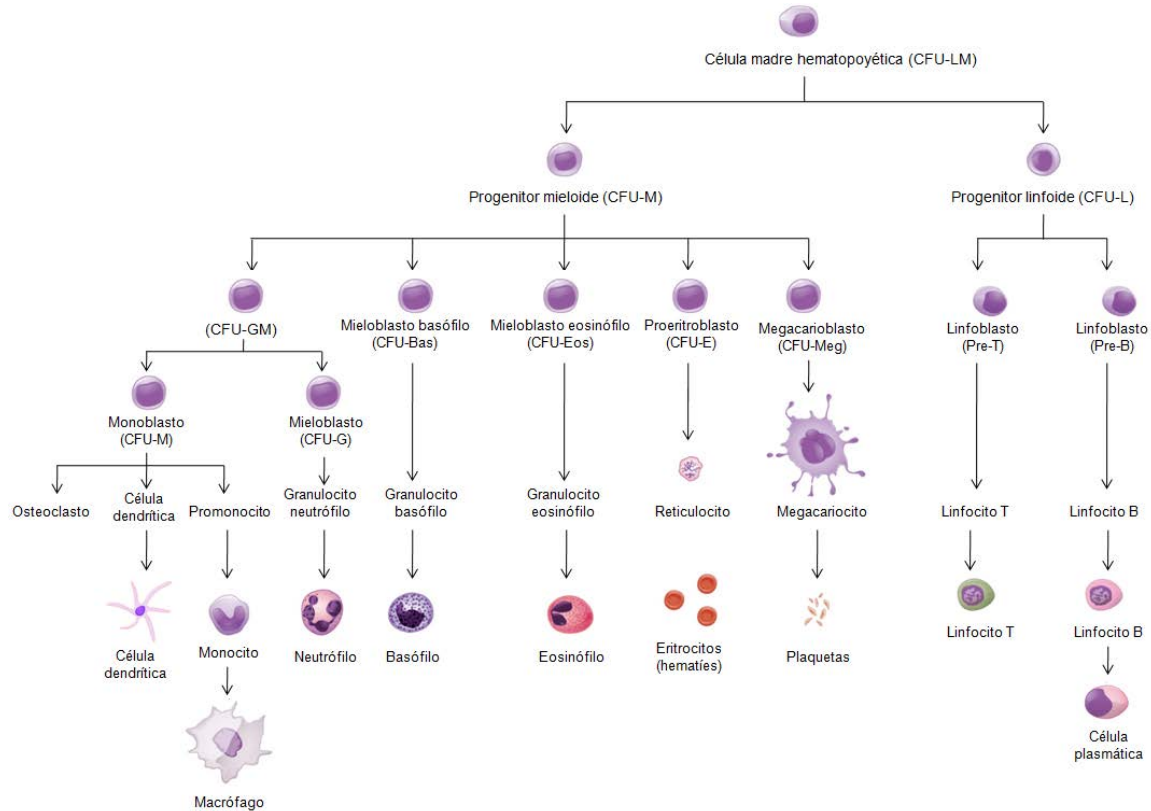


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis. Adaptación de Woessner y Florensa (Woessner and Florensa, 2006).

La **mielopoyesis** es el mecanismo de generación y desarrollo de los elementos del linaje mieloides, constituido por las series eritroblástica, megacariocítica, granulopoyética y monocítica, así como por las células de la matriz ósea. La célula progenitora mieloides, estimulada por el microambiente, da lugar a diferentes tipos de células progenitoras mono o bipotentes, comprometidas hacia cada uno de los linajes mieloides: CFU-E (eritrocitos), CFU-Meg (megacariocitos), CFU-GM (granulocitos y monocitos), CFU-G (granulocitos), CFU-M (macrófagos), CFU-Ba (basófilos) y CFU-Eos (eosinófilos) (Figura 1). El compartimento de las células progenitoras es el responsable de reconstruir el sistema hematopoyético cuando éste sufre un daño o agresión. Bajo la influencia de diferentes estímulos, las células progenitoras dan lugar a células cada vez más diferenciadas, denominadas precursores hematopoyéticos. A su vez, éstas acaban dando lugar a las distintas células sanguíneas (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas) (Woessner and Florensa, 2006).

1.2. Neoplasias mieloides

Las **neoplasias mieloides** incluyen todos aquellos desórdenes clonales que afectan a las células involucradas en el proceso de la mielopoyesis. Las neoplasias mieloides se clasifican según los criterios de la Clasificación de Tumores Hematopoyéticos y Tejidos Linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicada por primera vez en el año 2001 (OMS 2001) y actualizada posteriormente en 2008 (OMS 2008) y 2016 (OMS 2016) (Jaffe *et al.*, 2001; Swerdlow *et al.*, 2008; Arber *et al.*, 2016). Esta clasificación de las neoplasias hematológicas se basa en la morfología de la MO y la SP y, en algunos casos, en alguna característica genética específica.

De acuerdo con la clasificación de la OMS 2008, utilizada en esta tesis, las neoplasias mieloides se dividen en cinco categorías principales.

A) Las **neoplasias mieloproliferativas (NMP)** son enfermedades clonales de las células madre hematopoyéticas caracterizadas por la proliferación, en MO o SP, de una o más líneas mieloides (granulocítica, eritroide, megacariocítica y mastocítica). Las NMP se caracterizan por presentar hiper celularidad en la MO con maduración hematopoyética efectiva y un número aumentado de granulocitos, eritrocitos y/o plaquetas en SP. La esplenomegalia y la hepatomegalia (agrandamiento del bazo y del hígado) son comunes, causadas por la proliferación anormal de células hematopoyéticas. Pueden cursar con un grado variable de mielofibrosis y en su evolución tienen el potencial de sufrir una progresión de la enfermedad y un fallo medular debido a la mielofibrosis, la hematopoyesis inefectiva o la transformación a una fase blástica aguda, caracterizada por la presencia de $\geq 20\%$ de blastos en MO o SP. Las NMP se subdividen en siete categorías:

- Leucemia mieloide crónica *BCR-ABL1* positiva (LMC)
- Leucemia neutrofílica crónica
- Policitemia vera (PV)
- Mielofibrosis primaria (MFP)
- Trombocitemia esencial (TE)
- Leucemia eosinofílica crónica
- Mastocitosis
- Neoplasia mieloproliferativa, inclasificable

B) Las **neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y alteraciones de los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1*** constituyen tres grupos de enfermedades raras muy específicas que resultan de la formación de un reordenamiento cromosómico que involucra uno de estos tres genes: *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1*. Este reordenamiento genera un gen de fusión que codifica para una tirosina quinasa aberrante. Se caracterizan por presentar eosinofilia, que puede derivarse de un clon mieloide neoplásico, o ser reactiva como consecuencia de la

liberación de citoquinas por parte de linfocitos T reactivos o clonales. Estos tres desórdenes suelen presentarse como NMP aunque también, con una frecuencia variable, pueden manifestarse como una neoplasia linfoide.

C) Las **neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP)** son desórdenes clonales que comparten rasgos clínicos, morfológicos y de laboratorio, característicos tanto de los síndromes mielodisplásicos (SMD) como de las NMP. Se caracterizan, generalmente, por presentar una MO hiper celular debido a la proliferación de uno o más linajes mieloides. Esta proliferación puede ser efectiva en algunos linajes, dando lugar a un número aumentado de células circulantes que pueden ser morfológica y/o funcionalmente displásicas. Simultáneamente, uno o más linajes distintos pueden presentar una hematopoyesis ineficiente, dando lugar, además, a la aparición de citopenias (reducción del número de células en sangre por debajo de la normalidad). Las SMD/NMP incluyen cuatro subcategorías:

- Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)
- Leucemia mieloide crónica atípica (LMCa)
- Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ)
- Neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa inclasificable (SMD/NMP-I)

D) Los **síndromes mielodisplásicos (SMD)** son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales que afectan a las células madre hematopoyéticas y se caracterizan por la presencia de una o más citopenias en SP, displasia en una o más líneas mieloides, hematopoyesis ineficaz y un riesgo aumentado de evolución a leucemia mieloide aguda (LMA). Se caracterizan, en la mayoría de los casos, por una simultánea proliferación y una apoptosis aumentada de las células hematopoyéticas, que dan lugar a una MO normo o hiper celular y que contribuye al desarrollo de las citopenias. La displasia puede ir acompañada por un aumento de mieloblastos en SP y/o MO, siempre por debajo del 20%. Es un grupo de entidades muy heterogéneo a tanto a nivel clínico, como morfológico y genético. El curso biológico de algunos subtipos de SMD puede ser prolongado, indolente y con una incidencia muy baja de progresión a LMA. Aun así, la mayoría de SMD se caracterizan por un fallo progresivo de la MO y un elevado riesgo de evolución a LMA (presencia de $\geq 20\%$ de blastos en MO o SP). Los SMD se dividen en siete subgrupos:

- Citopenia refractaria con displasia unilínea
- Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)
- Citopenia refractaria con displasia multilínea
- Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)
- Síndrome mielodisplásico con del(5q) aislada
- Síndrome mielodisplásico inclasificable
- Síndrome mielodisplásico infantil

E) La **leucemia mieloide aguda (LMA)** es una hemopatía que resulta de la expansión clonal de los blastos mieloides en SP, MO u otros tejidos, y en la que uno o más linajes mieloides pueden estar afectados. Es una enfermedad heterogénea a nivel clínico, morfológico y genético. El requisito para el diagnóstico de la LMA es la presencia de $\geq 20\%$ de blastos y/o monoblastos/promonocitos y/o megacarioblastos en SP o MO. La LMA se puede diagnosticar también con $< 20\%$ blastos siempre y cuando haya una de las siguientes anomalías cromosómicas asociadas: $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)$ o $t(15;17)(q22;q12)$. En la categoría de la OMS 2008 de la LMA y neoplasias de precursores relacionadas, se distinguen las siguientes entidades:

- LMA con anomalías genéticas recurrentes
- LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia
- Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia
- Leucemia mieloide aguda no categorizable

2. LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA

La **leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)** es una enfermedad clonal de las células madre hematopoyéticas que comparte rasgos propios de los SMD y las NMP. Por definición, la LMMC se caracteriza por presentar monocitosis persistente en SP y menos de un 20% de blastos en SP y MO (Arber *et al.*, 2016). Como otras neoplasias mieloides, presenta una hematopoyesis clonal con una diferenciación mieloide anormal. En la LMMC, la diferenciación mieloide puede ser displásica, dando lugar a citopenias (neutropenia, anemia y/o plaquetopenia), proliferativa, dando lugar a leucocitosis, o una mezcla de ambas. La monocitosis siempre está presente y, en algunos casos, puede observarse un aumento de los precursores monocíticos (monoblastos y promonocitos) (Figura 2).

La LMMC es un desorden clonal que progresa a través de las etapas clásicas de la tumorigénesis: 1) iniciación de un proceso clonal promovido por una alteración genética inicial que confiere a una célula una ventaja proliferativa; 2) expansión del clon, que en algunos casos puede ir acompañada de un aumento en la apoptosis (hematopoyesis ineficaz, característica de la variante displásica) y en otros da lugar a un mayor número de células circulantes (hematopoyesis eficaz, característica de la variante mieloproliferativa); 3) transformación maligna caracterizada por un aumento de células blásticas con una final evolución a LMA ($\geq 20\%$ de blastos en MO y/o SP) (Aul *et al.*, 1998) (Figura 2).

Hay evidencias que indican que la enfermedad podría emerger en las células hematopoyéticas adultas a través de una acumulación de lesiones en el ADN que son edad-dependiente y que, de forma estocástica, dan lugar a esa alteración fundadora que conferirá una ventaja proliferativa a la célula (Itzykson and Solary, 2013; Mason *et al.*, 2016).

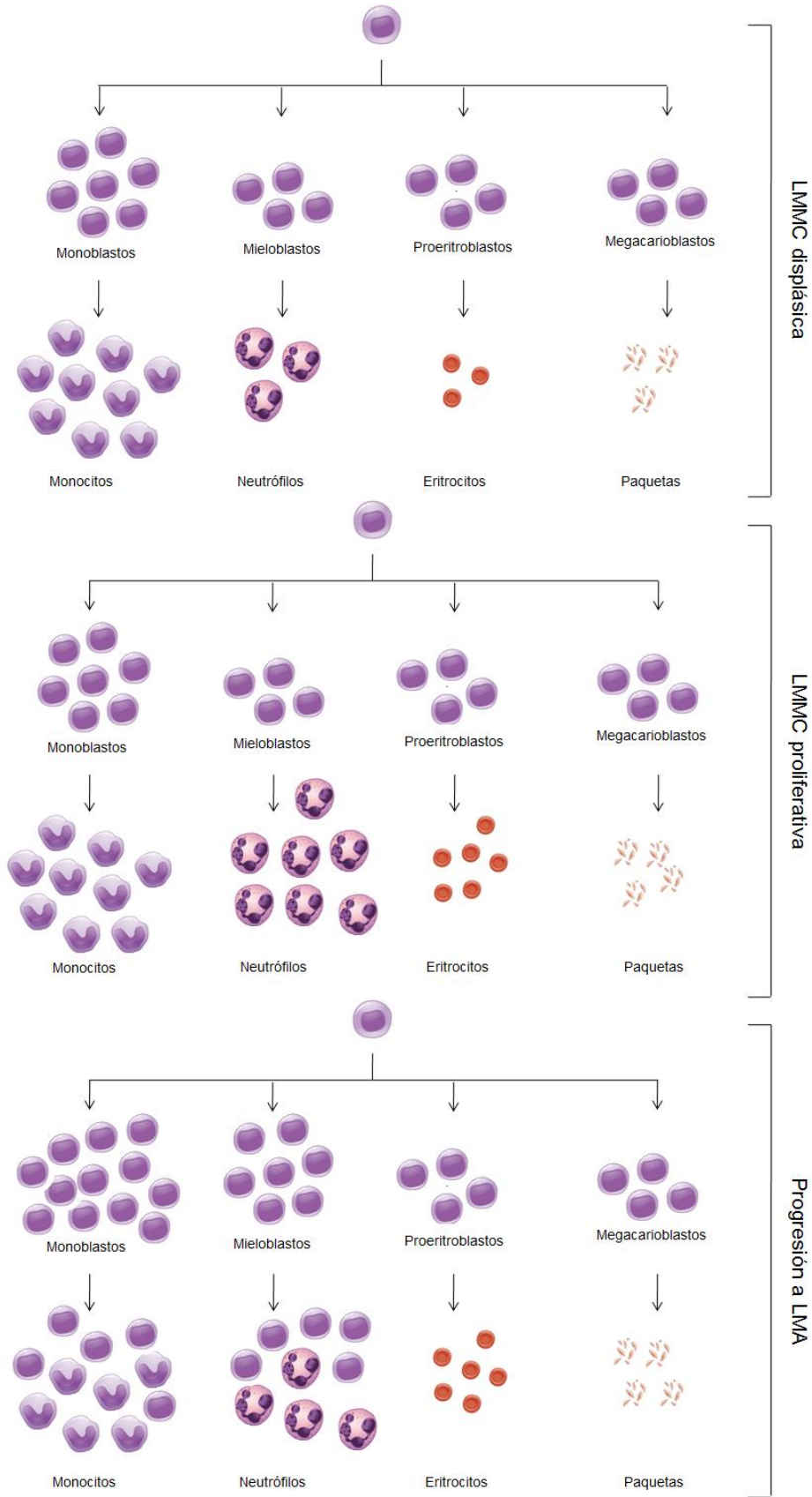


Figura 2. Diferencias en la diferenciación mieloide en la LMMC displásica, la LMMC proliferativa y la transformación a LMA.

2.1. Contexto histórico

El origen histórico de la LMMC va ligado al de los SMD, ya que inicialmente ésta se clasificó como un subtipo de SMD. Durante la primera mitad del siglo XX se utilizaron términos como "anemia refractaria", "anemia preleucémica", "preleucemia" o "leucemia aguda quiescente" para describir aquellas entidades caracterizadas por anemia en presencia de diseritropoyesis medular que, en algunos casos, acababan desarrollando una leucemia aguda (Rhoads, 1938; Hamilton-Paterson, 1949; Block *et al.*, 1953; Rheingold *et al.*, 1963). En el año 1974, se utilizaron los términos "leucemia mielomonocítica subaguda" y "leucemia mielomonocítica crónica" para describir algunos casos que presentaban monocitosis acompañada de citopenias en las líneas eritroide y/o megacariocítica y displasia en una o más líneas mieloides (Miescher and Farguet, 1974; Sexauer *et al.*, 1974).

En el año 1976, el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) propuso el término "Síndromes mielodisplásicos", en una reunión cuyo objetivo era proporcionar una terminología uniforme para aquellas neoplasias mieloides que presentaban características solapantes, como los SMD y las LMA. En aquella reunión se definieron los SMD como aquel grupo de enfermedades con características comunes a las LMA pero con un curso subagudo o crónico. Estos desórdenes se asociaban a alguna alteración en la maduración de alguna de las tres líneas mieloides dando lugar a citopenias. Además, tenían un riesgo aumentado de infección y hemorragia, pero no necesariamente progresaban a LMA. De acuerdo con esta definición, se definieron dos subtipos de SMD: la AREB y la LMMC (Bennett *et al.*, 1976). En 1982, gracias a la revisión de un gran número de casos, el grupo FAB pudo expandir y refinar la definición de los SMD y proponer cinco categorías que se han seguido utilizado en la práctica clínica: anemia refractaria (AR), ARSA, LMMC, AREB y AREB en transformación (AREB-T) (Bennett *et al.*, 1982; Bennett, 2013).

Posteriormente, los SMD fueron definidos por la OMS, gracias a un proyecto en colaboración entre la Asociación Europea de Hematopatología y la Sociedad Americana de Hematopatología. El objetivo de este proyecto fue establecer un consenso en la clasificación de las neoplasias hematológicas, tanto mieloides como linfoides. En esta clasificación, por primera vez, se integraron datos genéticos en los criterios diagnósticos, además de las características clínicas, morfológicas e inmunofenotípicas.

Esta clasificación se publicó oficialmente en el año 2001 (Jaffe *et al.*, 2001) y fue revisada y actualizada en 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008) y en 2016 (Arber *et al.*, 2016). Fue ya en la primera clasificación propuesta por la OMS cuando la LMMC se separó de los SMD y se incluyó en un nuevo grupo de entidades mixtas, denominado SMD/NMP (Jaffe *et al.*, 2001). Ya que la LMMC puede presentar un curso clínico tanto mielodisplásico como mieloproliferativo, ésta y otras entidades tenían mejor cabida en este grupo de enfermedades con características solapantes entre los SMD y las NMP.

2.2. Epidemiología y etiología

La LMMC es una enfermedad poco frecuente y relacionada con edades avanzadas. Se desconoce la incidencia exacta de la LMMC, pero, de acuerdo con diversos estudios publicados en poblaciones europeas y americanas, se estima en menos de 1 caso por 100.000 habitantes/año. Esta incidencia se incrementa hasta 2,5 casos por 100.000 habitantes/año en personas mayores de 70 años. La LMMC afecta mayoritariamente a varones, con una ratio de 1,5-3:1, y la media de edad al diagnóstico se sitúa en torno a los 71-74 años (Phekoo *et al.*, 2006; Rollison *et al.*, 2008; Ossa-Gelis *et al.*, 2012; Dinmohamed *et al.*, 2015; Guru Murthy *et al.*, 2016; Patnaik and Tefferi, 2016).

La etiología de la LMMC y los mecanismos responsables de su iniciación se desconocen, pero según su origen podemos distinguir entre:

- **LMMC primaria o *de novo***: sin historia conocida de exposición previa a quimioterapia o radioterapia.
- **LMMC secundaria a tratamiento (tLMMC)**: ha recibido, previamente, tratamiento con quimioterapia citotóxica o radiación ionizante. El grupo de tLMMC constituye aproximadamente un 10% de todas las LMMC. Estos casos presentan, generalmente, una historia previa de cáncer, mayoritariamente neoplasias linfoides, cáncer de próstata y cáncer de mama (Takahashi *et al.*, 2013). Se han identificado varios factores implicados en el desarrollo de la tLMMC y de otras neoplasias mieloides secundarias, como los agentes alquilantes, los inhibidores de la Topoisomerasa II, algunos antimetabolitos e inmunomoduladores y la radioterapia. Solo una pequeña proporción de los pacientes que han estado expuestos a estos agentes desarrollan una neoplasia mieloides secundaria, lo que sugiere que el huésped podría presentar una predisposición al potencial leucemogénico de estos factores (Czader and Orazi, 2009). En los pocos estudios focalizados en la tLMMC se ha visto que las características demográficas y hematológicas no difieren significativamente de la LMMC primaria. En cambio, los pacientes con tLMMC suelen presentar alteraciones citogenéticas de peor riesgo y un pronóstico adverso, con una supervivencia inferior a la de los casos con LMMC primaria y un mayor riesgo de progresión a LMA. (Takahashi *et al.*, 2013; Subari *et al.*, 2015).

2.3. Características clínicas

La presentación clínica de la LMMC es muy variable y abarca desde pacientes asintomáticos hasta pacientes con presencia de síntomas y necesidad de tratamiento. Comparte características clínicas tanto con los SMD como con las NMP (Figura 3). La clínica suele ser consecuencia de las citopenias en la variante mielodisplásica y de la leucocitosis, el estado hipercatabólico y la afección extramedular en la variante mieloproliferativa. Los principales

síntomas incluyen la astenia, pérdida de peso, fiebre y sudación nocturna. Además, la esplenomegalia y hepatomegalia son comunes en los pacientes con leucocitosis (Bastie *et al.*, 2012; Xicoy *et al.*, 2012).

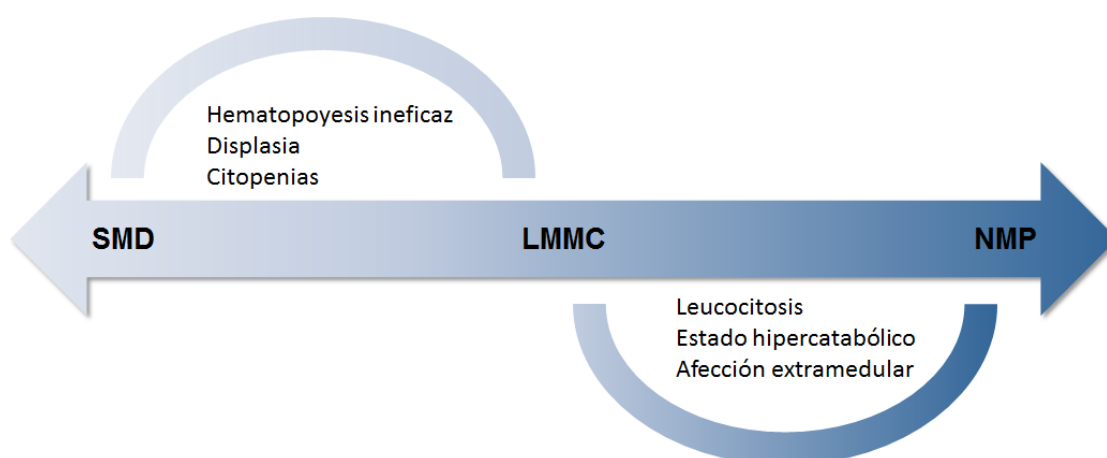


Figura 3. Principales características clínicas de la LMMC.

El curso clínico de la LMMC puede permanecer estable durante muchos años, mientras que hay pacientes con una enfermedad rápidamente progresiva desde el diagnóstico o durante la evolución. Esta progresión suele manifestarse por una intensificación de las citopenias en la variante mielodisplásica, dando lugar a infecciones y complicaciones hemorrágicas, y por un aumento de la leucocitosis y del tamaño del bazo en la variante mieloproliferativa (Xicoy *et al.*, 2012). La anemia, trombocitopenia, leucocitosis y la presencia de blastos o precursores mieloides en MO y/o SP son factores biológicos asociados con un pronóstico desfavorable en los pacientes con LMMC (Bastie *et al.*, 2012). La mediana de supervivencia global (SG) varía entre los 12 y los 24 meses y disminuye al aumentar la edad (Xicoy *et al.*, 2012; Guru Murthy *et al.*, 2016). De acuerdo con un estudio epidemiológico realizado en Estados Unidos, la SG en pacientes con LMMC ha mejorado en el periodo 2007-2013 comparado con el periodo 2003-2006 (Guru Murthy *et al.*, 2016).

La transformación blástica o progresión a LMA (presencia de $\geq 20\%$ de blastos y/o promonocitos) es la principal causa de muerte de la LMMC. La incidencia de transformación a LMA de la LMMC varía según las series y se encuentra entre el 15-30%, independientemente de la edad (Patnaik *et al.*, 2015a, 2015b).

La LMMC se ha asociado con enfermedades autoinmunes e inflamatorias sistémicas. Según las pocas series descritas en pacientes con LMMC, la incidencia de estas enfermedades es del 10-20% (Peker *et al.*, 2015; Grignano *et al.*, 2016; Mekinian *et al.*, 2016; Zahid *et al.*, 2016). Las enfermedades más frecuentes incluyen la vasculitis sistémica, la artritis inflamatoria, las enfermedades del tejido conectivo, la trombocitopenia inmune primaria o el síndrome de Sweet, entre otras. Algunos estudios han demostrado que los pacientes con LMMC asociados a este tipo de enfermedades presentan características biológicas de riesgo adverso, como un mayor

número de blastos, leucocitosis y alteraciones citogenéticas de alto riesgo (Grignano *et al.*, 2016; Mekinian *et al.*, 2016). Aun así, ningún estudio ha demostrado que la presencia de estas enfermedades se asocie a una menor SG o a un mayor riesgo de progresión a LMA (Peker *et al.*, 2015; Grignano *et al.*, 2016; Mekinian *et al.*, 2016; Zahid *et al.*, 2016).

2.4. Diagnóstico

2.4.1. Diagnóstico y clasificación

El proceso diagnóstico de la LMMC incluye una revisión citomorfológica de la SP y del aspirado de MO, complementada con un estudio citogenético en MO. El resultado de estos estudios se integra con los datos clínicos (anamnesis y exploración física) y adicionalmente puede suplementarse con estudios inmunofenotípicos y/o moleculares.

2.4.1.1. Morfología e histología

La **sangre periférica** de la LMMC se caracteriza por presentar monocitosis persistente de más de $1 \times 10^9/L$ (puede llegar a exceder de $80 \times 10^9/L$), generalmente con más de un 10% de monocitos en el porcentaje leucocitario. La morfología de los monocitos puede ser heterogénea, con monocitos más o menos maduros y/o displásicos. Algunos casos presentan también neutrofilia y eosinofilia. La anemia está presente en la mitad de los pacientes, pero es generalmente moderada, con normocitosis o macrocitosis. La trombocitopenia está presente en un 40% de los casos, aproximadamente, y puede ser moderada o grave. La disgranulopoyesis está presente en la LMMC, aunque es menos evidente en la variante mieloproliferativa. Además, la SP puede revelar, en algunos casos, hiperuricemia, niveles aumentados de vitamina B12 en plasma, niveles aumentados de lisozima en suero y hipergammaglobulinemia policlonal (Woessner and Florensa, 2006; Swerdlow *et al.*, 2008; Itzykson *et al.*, 2013a).

El **aspirado de médula ósea** (AMO) es hiper celular en más del 75% de los casos, con marcada hiperplasia granulocítica. Los monocitos suelen estar aumentados, pero de forma moderada. Además del aumento de la serie granulopoyética y monocítica, puede registrarse también un aumento de precursores eritroides con formas en anillo. El porcentaje de blastos y/o promonocitos es inferior al 20%. Pueden observarse cambios displásicos en una o más líneas mieloides. Un 80% de los pacientes presentan dismegacariopoyesis, con micromegacariocitos o formas anormalmente lobuladas y con una hipercondensación anómala de la cromatina, denominada cromatina en *clumping*. Además, se puede detectar un grado variable de mielofibrosis hasta en un 30% de los pacientes (Woessner and Florensa, 2006; Swerdlow *et al.*, 2008; Itzykson *et al.*, 2013a).

La **biopsia de médula ósea** (BMO) es generalmente hiper celular, con hiperplasia y displasia granulocítica y, en la mayoría de los casos, dismegacariopoyesis. Puede haber un aumento de

los monocitos pero es generalmente difícil de apreciar, por lo que, a diferencia del AMO, se requieren estudios inmunohistoquímicos que ayuden en la identificación de los monocitos y sus precursores (Swerdlow *et al.*, 2008). La BMO no es estrictamente necesaria para el diagnóstico de la LMMC, pero puede resultar útil en AMOs hipocelulares o asociados a fibrosis medular. En un 30% de los casos se observa un aumento leve o moderado en la cantidad de fibras de reticulina (Maschek *et al.*, 1992). Un 20% de los pacientes presentan agrupaciones de células mononucleadas compuestas de células maduras plasmocitoides dendríticas (Orazi *et al.*, 2006). También pueden observarse cuerpos apoptóticos, generalmente dentro de histiocitos que presentan un patrón que se conoce como cielo estrellado (Swerdlow *et al.*, 2008).

2.4.1.1. Clasificación FAB

La clasificación FAB es el resultado del primer consenso de expertos para la clasificación de los SMD. A pesar de sus limitaciones, principalmente debidas al hecho de que solamente tiene en cuenta datos morfológicos para diagnosticar estas enfermedades, esta clasificación sigue utilizándose. En la propuesta del grupo FAB de 1982 se distinguían cinco tipos de SMD, siendo la LMMC uno de ellos. Ésta se definía por la presencia de monocitosis en sangre periférica ($>1 \times 10^9/L$), frecuentemente asociada con un incremento de granulocitos inmaduros, y por un porcentaje de blastos inferior al 20% en MO y al 5% en SP (Tabla 1) (Bennett *et al.*, 1982).

Tabla 1. Clasificación de los SMD del grupo FAB (Bennett *et al.*, 1982)

Subtipo de SMD	Blastos en SP (%)	Blastos en MO (%)	Monocitos en SP	Sideroblastos en anillo en MO (%)
AR	<1	<5	$<1 \times 10^9/L$	<15
ARSA	<1	<5 sin bastones de Auer	$<1 \times 10^9/L$	≥ 15
AREB	<5	5-19 sin bastones de Auer	$<1 \times 10^9/L$	Indiferente
AREB-T	>5	20-29 sin bastones de Auer	$<1 \times 10^9/L$	Indiferente
LMMC	<5	≤ 20	$>1 \times 10^9/L$	Indiferente

Abreviaturas: AR: anemia refractaria; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; AREB-T: AREB en transformación; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; FAB: Franco-Americano-Británico; LMMC: leucemia mielomonocítica crónica.

En 1994, una nueva propuesta publicada por el grupo distinguió por primera vez dos subtipos de LMMC. Esta distinción se basaba en el recuento absoluto de leucocitos y el punto de corte se estableció en $13 \times 10^9/L$. De esta forma se pretendía distinguir entre aquellos pacientes que presentaban un curso clínico más parecido al de los SMD (variante mielodisplásica, **LMMC-MD**; leucocitos en SP $<13 \times 10^9/L$) y aquellos más parecidos a una NMP (variante mieloproliferativa,

LMMC-MP; leucocitos en SP $\geq 13 \times 10^9/L$) (Bennett *et al.*, 1994) (Tabla 2). Aunque diferentes estudios demostraron que la leucocitosis era un factor de riesgo adverso, por aquel entonces no había suficiente evidencia de que el punto de corte propuesto por el grupo FAB fuese suficientemente relevante a nivel pronóstico o biológico (Germing *et al.*, 1998, 2002; Nösslinger *et al.*, 2001; Voglová *et al.*, 2001; González-Medina *et al.*, 2002; Onida *et al.*, 2002). Posteriormente, estudios en diversas series de LMMC han demostrado que la LMMC-MP es un factor pronóstico independiente de riesgo adverso y que se asocia con una SG inferior y un mayor riesgo de evolución a LMA (Breccia *et al.*, 2004; Adès *et al.*, 2013; Such *et al.*, 2013; Cervera *et al.*, 2014).

2.4.1.2. Clasificación de la OMS

En la primera clasificación propuesta por la OMS en 2001 la LMMC se reclasificó en una categoría independiente, los SMD/NMP, junto con otras tres entidades (Jaffe *et al.*, 2001). Por primera vez, una clasificación integraba en el diagnóstico datos genéticos. A partir de este momento fue necesario complementar el estudio citomorfológico de SP y MO con un estudio citogenético en MO. Por citogenética se detecta un cariotipo normal en el 70-75% de las LMMC, así como alteraciones no específicas en el resto de los casos (Such *et al.*, 2011; Itzykson *et al.*, 2013b; Tang *et al.*, 2014). Las características citogenéticas de la LMMC se detallan en el apartado 2.6.

Los **criterios diagnósticos de la LMMC** propuestos en la OMS 2001 no han sufrido cambios en las revisiones de la OMS de 2008 y 2016 (Jaffe *et al.*, 2001; Swerdlow *et al.*, 2008; Arber *et al.*, 2016). Éstos incluyen:

- Monocitosis persistente en sangre periférica ($>1 \times 10^9/L$)
- Ausencia del cromosoma Filadelfia (resultante de la translocación entre los cromosomas 9 y 22) o del gen de fusión *BCR-ABL1*
- Ausencia de reordenamientos de *PDGFRA* y *PDGFRB*
- Menos de 20% de blastos (mieloblastos, monoblastos y promonocitos) en MO y SP
- Displasia en una o más líneas mieloides. Si la mielodisplasia no es convincente, puede establecerse el diagnóstico de LMMC si se cumplen uno de los siguientes criterios: a) presencia de una alteración citogenética o molecular adquirida en las células hematopoyéticas; b) persistencia de la monocitosis durante al menos 3 meses sin evidencia de ninguna otra causa de monocitosis.

En la OMS 2001 la LMMC se dividió en dos subtipos en función del porcentaje de blastos en MO y/o SP (Jaffe *et al.*, 2001). La **LMMC-1** se caracterizaba por presentar $<10\%$ de blastos en MO o $<5\%$ en SP, mientras que la **LMMC-2** se definía por la presencia de 10-19% de blastos en MO o 5-19% en SP (Tabla 2). Los pacientes con mayor número de blastos presentarían, en principio, un peor pronóstico y un mayor riesgo de progresión a LMA. El valor pronóstico de esta subdivisión ha sido validado en numerosas series de pacientes con LMMC (Onida *et al.*, 2002; Germing *et al.*, 2004, 2007; Adès *et al.*, 2013; Such *et al.*, 2013). La clasificación LMMC-1/2 fue

mantenida en la revisión de la OMS de 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008). Años después, Germing y cols. propusieron una nueva categorización de la LMMC, en la cual la LMMC-1 se dividía a su vez en dos subgrupos (LMMC-0 y LMMC-1) (Schuler *et al.*, 2014). A raíz de la evidencia del valor pronóstico de la nueva reclasificación, ésta fue incorporada en la revisión de la OMS de 2016, que incluye tres categorías: **LMMC-0** (<5% de blastos en MO o <2% en SP), **LMMC-1** (5-9% de blastos en MO o 2-4% en SP) y **LMMC-2** (10-19% de blastos en MO o 5-19% en SP) (Arber *et al.*, 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la LMMC de acuerdo con las propuestas del grupo FAB y de la OMS (Bennett *et al.*, 1994; Jaffe *et al.*, 2001; Swerdlow *et al.*, 2008; Arber *et al.*, 2016)

Clasificación	Grupo	Subtipo	Leucocitos en SP	Blastos en MO	Blastos en SP
FAB	SMD	LMMC-MD	<13x10 ⁹ /L		
		LMMC-MP	≥13x10 ⁹ /L		
OMS 2001/2008	SMD/NMP	LMMC-1		<10%	<5%
		LMMC-2		10-19%	5-19%
OMS 2016	SMD/NMP	LMMC-0		<5%	<2%
		LMMC-1		5-9%	2-4%
		LMMC-2		10-19%	5-19%

Abreviaturas: FAB: grupo Franco-Americano-Británico; MO: médula ósea; NMP: neoplasias mieloproliferativas; OMS: Organización Mundial de la Salud; LMMC: leucemia mielomonocítica crónica; SMD: síndromes mielodisplásicos; SP: sangre periférica.

2.4.2. Diagnóstico diferencial

El **diagnóstico diferencial** de la LMMC es complejo. Durante este proceso deben descartarse tanto aquellas neoplasias mieloproliferativas que presenten características citomorfológicas similares a la LMMC, como cualquier otra causa maligna o no maligna de monocitosis.

En primer lugar, tanto la LMMC como el resto de neoplasias clasificadas en el grupo de SMD/NMP deben distinguirse claramente de una NMP que a lo largo de su evolución desarrolle mielodisplasia y mielopoyesis ineficaz. La esplenomegalia, leucocitosis y mielofibrosis que presentan algunos pacientes con la variante mieloproliferativa de la LMMC, pueden dificultar el diagnóstico en estos casos.

La distinción entre LMMC y LMC se basa en la citogenética y la biología molecular, por la ausencia en la LMMC del cromosoma Filadelfia y del reordenamiento *BCR-ABL1*. Los reordenamientos de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* deberían descartarse también, especialmente en pacientes con eosinofilia. Los reordenamientos de estos genes pueden

asociarse a la presencia de monocitosis y displasia en MO, pero debido a la alta tasa de respuesta de estos pacientes al tratamiento con el inhibidor de tirosina quinasa imatinib, se clasifican en un grupo diferenciado de la OMS dentro de las neoplasias mieloides.

Dentro de los SMD/NMP, el diagnóstico diferencial con la LMCa es el más difícil, ya que ésta es una entidad poco definida y que se diferencia morfológicamente de la variedad mieloproliferativa de la LMMC por la presencia de un mayor porcentaje de precursores mieloides inmaduros, menor número de monocitos en SP y rasgos displásicos más acusados (Figura 4) (Woessner and Florensa, 2006; Swerdlow *et al.*, 2008; Xicoy *et al.*, 2012; Patnaik *et al.*, 2014a; Padron *et al.*, 2015; Patnaik and Tefferi, 2016).

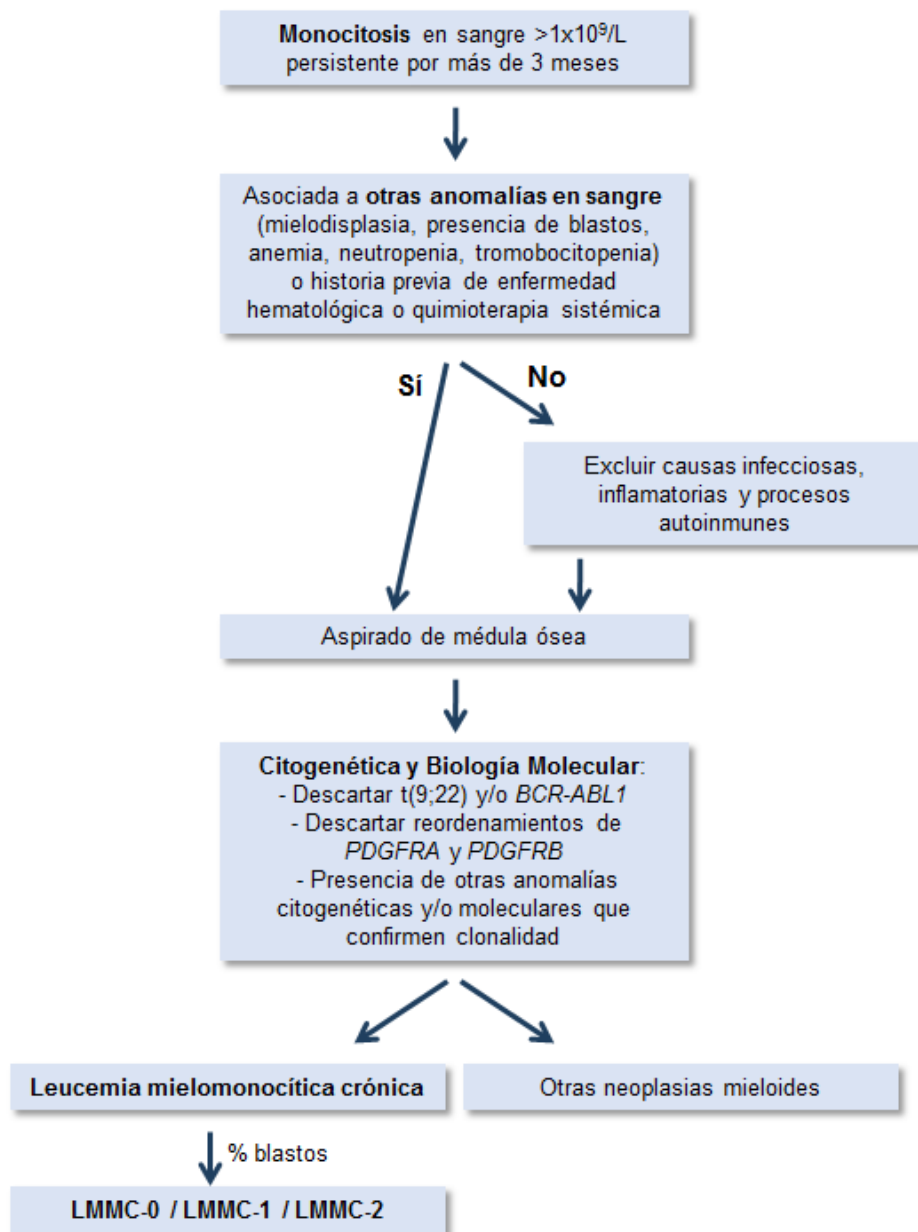


Figura 4. Algoritmo diagnóstico de la LMMC. Adaptación de Patnaik y cols. (Patnaik and Tefferi, 2016).

La displasia tan sutil que presentan algunos pacientes con LMMC y la elevada proporción de casos con cariotipo normal, suponen una dificultad añadida en el proceso diagnóstico de la LMMC. Por ello, en todos los casos de sospecha de LMMC, pero especialmente en estos últimos, es imprescindible descartar cualquier otra causa posible de monocitosis, incluyendo infecciones, inflamación u otras enfermedades malignas (Figura 4). Entre las causas no malignas más comunes de monocitosis se encuentran las infecciones crónicas (tuberculosis, listeriosis, brucelosis, endocarditis), las enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico), las parasitosis con fenómenos de macrofagia (paludismo, leishmaniasis), la fase de recuperación de una infección aguda (generalmente viral) y la regeneración medular tras una quimioterapia (Woessner and Florensa, 2006; Swerdlow *et al.*, 2008; Xicoy *et al.*, 2012; Patnaik *et al.*, 2014a; Padron *et al.*, 2015; Patnaik and Tefferi, 2016).

2.5. Características inmunofenotípicas

El diagnóstico de la LMMC no incluye criterios inmunofenotípicos, pero este tipo de estudios pueden realizarse como complemento durante el proceso diagnóstico y pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial.

Las células de la SP y la MO de la LMMC generalmente expresan marcadores mielomonocíticos esperados, como CD33 y CD13, con expresión variable de CD14, CD68 y CD64 (Swerdlow *et al.*, 2008). Los monocitos de la LMMC suelen presentar fenotipos aberrantes, como una disminución en la expresión de CD14, que refleja una inmadurez monocítica, una sobreexpresión de CD56, una expresión aberrante de CD2 o una expresión disminuida de HLA-DR, CD13, CD15, CD64 o CD36 (Xu *et al.*, 2005; Swerdlow *et al.*, 2008). Un porcentaje aumentado de células CD34⁺ o la presencia de una población blástica emergente con un inmunofenotipo aberrante se han asociado a la transformación a LMA (Woodlock *et al.*, 1994).

Mediante citometría de flujo multiparamétrica, la LMMC y la LMA monocítica presentan patrones de expresión antigénica solapantes, especialmente cuando las células monocitopoyéticas presentan una forma inmadura pero sin una clara apariencia blástica, o cuando la suma de los blastos y los promonocitos es cercana al 20% (Swerdlow *et al.*, 2008). Un ejemplo es la co-expresión aberrante de CD56. Sin embargo, algunos estudios han reportado diferencias significativas entre estas dos entidades en la expresión de algunos antígenos, como una mayor expresión de CD2 o una mayor proporción de células granulopoyéticas CD45⁺ en la LMMC (Gorczyca, 2004; Subirá *et al.*, 2008).

Los estudios inmunofenotípicos también pueden ayudar a distinguir entre la LMMC y la monocitosis reactiva. Xu y cols. demostraron que la expresión aberrante de dos o más antígenos mieloides era significativamente más frecuente en la LMMC que en la monocitosis reactiva, y que la combinación de una expresión aberrante de CD56 con una expresión disminuida de un antígeno mieloides (HLA-DR, CD13, CD15 o CD36) era específica de las

células monopoyéticas de la LMMC (Xu *et al.*, 2005). Selimoglu-Buet y cols. diseñaron un ensayo de citometría de flujo multiparamétrica que se basaba en la distinción de tres clases de monocitos (clásicos, CD14⁺/CD16⁻, intermedios, CD14⁺/CD16⁺ y no clásicos, CD14^{bajo}/CD16⁺) y que permitía distinguir entre la LMMC y la monocitosis reactiva u otros tipos de neoplasias hematológicas (Selimoglu-Buet *et al.*, 2015). En este estudio, los pacientes con LMMC mostraban un aumento significativo en la fracción de monocitos clásicos (punto de corte de 94%), que permitía distinguirlos con el resto de condiciones con una especificidad y una sensibilidad superiores al 95 y al 90%, respectivamente.

2.6. Características citogenéticas

2.6.1. Perfil citogenético

La **citogenética convencional** estudia la apariencia microscópica de los cromosomas y permite la detección de anomalías numéricas y estructurales. El perfil citogenético de la LMMC se conoce gracias a diversos estudios publicados desde finales de la década de los 90 (Germing *et al.*, 1998, 2004; Nösslinger *et al.*, 2001; Voglová *et al.*, 2001; Onida *et al.*, 2002; Solé *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2007; Such *et al.*, 2011; Wassie *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014) (Figura 5). La LMMC presenta un cariotipo normal en el 70-75% de los casos. Las anomalías cromosómicas detectadas en estos pacientes no son específicas de la LMMC y pueden encontrarse en otras neoplasias, especialmente en los SMD. Las alteraciones más frecuentes son la trisomía 8, las anomalías del cromosoma 7 (monosomía 7 y delección de 7q), la pérdida del cromosoma Y y el cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones independientes) (Figura 5).

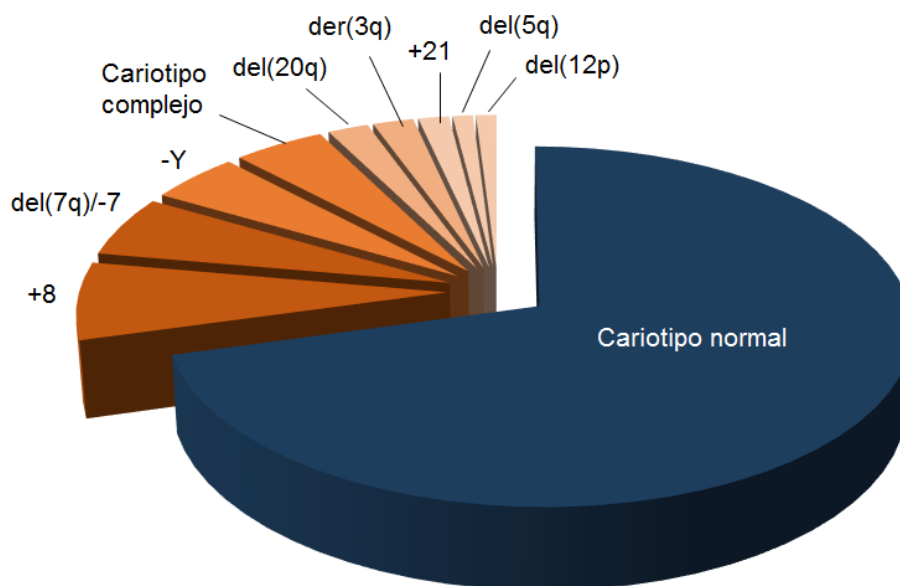


Figura 5. Distribución de las alteraciones citogenéticas en pacientes con LMMC

En la Tabla 3 se resumen las características citogenéticas de las series más largas publicadas en pacientes con LMMC (Onida *et al.*, 2002; Haase *et al.*, 2007; Such *et al.*, 2011; Wassie *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014).

Tabla 3. Características citogenéticas de las cuatro series más largas publicadas en LMMC

	Onida <i>et al.</i> , 2002 (n=205); %	Haase <i>et al.</i> , 2007 (n=272); %	Such <i>et al.</i> , 2011 (n=414); %	Tang <i>et al.</i> , 2014 (n=417); %	Wassie <i>et al.</i> , 2014 (n=409); %
Cariotipo normal	67,0	63,0	73,0	70,0	72,0
der(3q)	-	-	-	-	2,2
del(5q)	1,4	1,5	0,7	-	1,0
del(7q)/-7	7,8	8,5	1,4	5,5	3,9
+8	6,3	6,6	7,2	6,2	6,6
del(12p)	1,0	-	-	-	1,0
del(20q)	1,0	<1	0,7	2,6	2,2
+21	1,0	-	-	-	2,2
-Y	-	-	4,3	3,8	5,6
Cariotipo complejo	6,3	4,4	2,9	6,0	3,2

La mayoría de pacientes con LMMC presenta un cariotipo normal, aunque clínicamente este subgrupo citogenético presenta características muy heterogéneas. La trisomía 8 suele presentarse de forma aislada y se detecta entre un 6-8% de pacientes con LMMC. Esta alteración se detecta también en un porcentaje variable de pacientes con otras hemopatías: SMD/NMP (5-20%), SMD (5-8%), NMP (1-10%) y LMA (10%) (Bench *et al.*, 2001; Solé *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2007; Swerdlow *et al.*, 2008; Grimwade *et al.*, 2010; Cazzola *et al.*, 2011; DiNardo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Las anomalías del cromosoma 7 (monosomía 7 y deleción intersticial de 7q) se han descrito entre un 2-9% de pacientes con LMMC y se detectan tanto de forma aislada como dentro de cariotipo complejos. Estas alteraciones son recurrentes también en pacientes con SMD (5-10% en SMD *de novo* y hasta 50% en SMD secundarios), NMP (1-4%) y LMA (5-8%) y se asocian a un curso clínico desfavorable (Bench *et al.*, 2001; Solé *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2007; Grimwade *et al.*, 2010; Schanz *et al.*, 2012). La pérdida del cromosoma Y afecta a un 4-6% de pacientes con LMMC. El significado de esta alteración es controvertido, ya que se detecta en un gran número de neoplasias, pero también se ha

descrito en personas sanas de edad avanzada, como fenómeno asociado al envejecimiento (Pierre and Hoagland, 1972; Guttenbach *et al.*, 1995). Aun así, la frecuencia de esta alteración es significativamente superior en pacientes con neoplasias hematológicas (Zhang *et al.*, 2007). Por último, el cariotipo complejo, definido por la presencia de 3 o más alteraciones citogenéticas independientes, se detecta en un 3-8% de pacientes con LMMC (Onida *et al.*, 2002; Haase *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2014).

2.6.2. Valor pronóstico de la citogenética

Desde finales de los años 90 diversos estudios han investigado el papel pronóstico de la citogenética en la LMMC. Los primeros estudios incluían series de pacientes con SMD y LMMC. Sin embargo, los resultados de éstos eran poco aplicables a la LMMC debido al reducido número de pacientes con esta entidad y a la heterogeneidad de las series (Greenberg *et al.*, 1997; Solé *et al.*, 2000, 2005; Haase *et al.*, 2007). El grupo del M.D. Anderson Cancer Center fue el primero en evaluar el impacto pronóstico de las alteraciones citogenéticas de forma específica en la LMMC, pero fue incapaz de encontrar una correlación independiente entre la citogenética y la supervivencia (Onida *et al.*, 2002).

El primer estudio en demostrar el valor pronóstico de la citogenética en la LMMC fue publicado en 2011 por el Grupo Español de SMD (GESMD) en una serie de 414 pacientes. Such y cols. demostraron que las alteraciones citogenéticas tenían valor pronóstico en la enfermedad y, por ello, propusieron la primera estratificación pronóstica citogenética específica para pacientes con LMMC (Tabla 4) (Such *et al.*, 2011). En esta clasificación, denominada **CMML-specific cytogenetic risk classification**, se distinguían tres grupos de pacientes que presentaban diferencias en la SG y el riesgo de progresión a LMA:

- **Bajo riesgo:** cariotipo normal, pérdida aislada del cromosoma Y
- **Riesgo intermedio:** resto de alteraciones
- **Alto riesgo:** trisomía 8, anomalías del cromosoma 7, cariotipo complejo

Más adelante, en un estudio realizado por el M.D. Anderson Cancer Center en 417 pacientes con LMMC, Tang y cols. confirmaron el valor pronóstico de la clasificación del grupo español, pero propusieron trasladar la trisomía 8 al grupo de riesgo intermedio. En esta serie, el grupo de alto riesgo presentaba marcadas diferencias internas en la SG, principalmente debido a que los pacientes con trisomía 8 presentaban una supervivencia muy similar a la del grupo de riesgo intermedio. Trasladando estos casos al grupo intermedio, los tres grupos pronósticos quedaban mejor definidos (Tabla 4) (Tang *et al.*, 2014).

Poco después, el grupo de la Clínica Mayo demostró que el cariotipo monosómico, definido como la presencia 2 monosomías o 1 monosomía más ≥ 1 alteraciones estructurales, tenía un impacto pronóstico negativo en la LMMC (Alsahlawi *et al.*, 2015). A raíz de esta evidencia, un grupo cooperativo entre la Clínica Mayo y el Grupo Francés de SMD reevaluó el papel de la citogenética en la LMMC, publicando una nueva clasificación con tres nuevos grupos de riesgo

(Tabla 4). El grupo de bajo riesgo era muy similar al del grupo español e incluía los pacientes con cariotipo normal, pérdida aislada del cromosoma Y o con un cromosoma derivativo 3 como alteración única. El grupo de alto riesgo lo conformaban los pacientes con cariotipos complejos o cariotipos monosómicos. El resto de alteraciones se incluían en el grupo de riesgo intermedio (Wassie *et al.*, 2014).

Tabla 4. Clasificaciones citogenéticas con valor pronóstico propuestas en la LMMC

	Such <i>et al.</i> , 2011 (n=414)	Tang <i>et al.</i> , 2014 (n=417)	Wassie <i>et al.</i> , 2014 (n=409)
Bajo riesgo	Cariotipo normal -Y aislado	Cariotipo normal -Y aislado	Cariotipo normal -Y aislado der(3q) aislado
Riesgo intermedio	Resto de anomalías	Resto de anomalías	Resto de anomalías
Alto riesgo	Cariotipo complejo ^a -7/del(7q) + 8	Cariotipo complejo -7/del(7q)	Cariotipo complejo Cariotipo monosómico ^b

^aEl cariotipo complejo se define como la presencia de 3 o más alteraciones.

^bEl cariotipo monosómico se define como la presencia de 2 monosomías o 1 monosomías más 1 o más alteraciones estructurales.

Más adelante, en otro estudio publicado por Tang y cols., en el que analizaron muestras secuenciales de pacientes con LMMC, se demostró que no solo la presencia de determinadas anomalías al diagnóstico confería un pronóstico determinado. En este estudio vieron que la adquisición de anomalías citogenéticas durante el curso de la enfermedad, que tiene lugar en un 20-30% de los pacientes con LMMC, también tenía impacto pronóstico y se asociaba a una menor supervivencia libre de leucemia. (Tang *et al.*, 2015).

2.7. Mutaciones somáticas

El conocimiento de la biología molecular de la LMMC y de otras neoplasias hematológicas ha avanzado considerablemente gracias al desarrollo, en la primera década del siglo XXI, de técnicas moleculares como los *microarrays* genómicos y la secuenciación del ADN.

Las primeras mutaciones somáticas descritas en la LMMC afectaban a genes de la familia *RAS* (Hirsch-Ginsberg *et al.*, 1990). Las mutaciones de *RAS* se descubrieron en la década de los 80 y se detectan en numerosos tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Bos, 1989). A pesar de este descubrimiento, pasaron muchos años hasta que no se describieron nuevas mutaciones en la LMMC, y fue gracias a la combinación de *microarrays* genómicos, para la identificación de regiones candidatas, con técnicas de secuenciación clásica. De esta forma se identificaron

mutaciones somáticas en la LMMC en genes como *RUNX1*, *CBL*, *TET2*, *ASXL1* y *EZH2* (Dunbar *et al.*, 2008; Gelsi-Boyer *et al.*, 2008, 2009; Delhommeau *et al.*, 2009; Ernst *et al.*, 2010). Poco después, la secuenciación de genomas y exomas mediante técnicas de secuenciación masiva permitió identificar nuevas mutaciones en genes como *DNMT3A*, *SRSF2*, *U2AF1* y *SETBP1* (Jankowska *et al.*, 2009; Ley *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2011a; Piazza *et al.*, 2013). La rápida expansión de la secuenciación masiva permitió secuenciar, de forma dirigida, paneles de genes relacionados con neoplasias mieloides en grandes series de pacientes con LMMC, dando así a conocer el perfil molecular de esta entidad.

Gracias a este tipo de estudios se sabe que $\geq 90\%$ de pacientes con LMMC presenta mutaciones somáticas (Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2016a). Aunque ninguna de ellas es específica de la enfermedad, las mutaciones en *TET2*, *ASXL1* o *SRSF2* afectan aproximadamente a la mitad de pacientes y se detectan en un porcentaje mayor al de otras neoplasias hematológicas (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Grossmann *et al.*, 2011; Meggendorfer *et al.*, 2012). Las mutaciones de estos tres genes suelen corresponder a eventos ancestrales dominantes o co-dominantes (Patel *et al.*, 2017). Las mutaciones en la LMMC afectan principalmente a genes involucrados en los siguientes mecanismos: reguladores epigenéticos (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *UTX*, *SUZ12*), maquinaria de *splicing* (*SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SF3B1*), vías de señalización (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *JAK2*, *PTPN11*, *FLT3*) y otros mecanismos (*RUNX1*, *SETBP1*, *STAG2*, *CSF3R*, *TP53*, *NPM1*) (Tabla 5, Figura 6) (Bastie *et al.*, 2012; McCullough and Patnaik, 2015; Patnaik and Tefferi, 2016).

Varios estudios han identificado mutaciones somáticas en personas sanas de edad avanzada en genes como *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *JAK2*, *SF3B1* y *TP53*, algunos de los cuales son muy frecuentes en la LMMC (Genovese *et al.*, 2014; Jaiswal *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014). Mason y cols. propusieron un modelo en el que la LMMC aparecería cuando un número suficiente de mutaciones relacionadas con la edad se hubiera adquirido de forma estocástica, sugiriendo que la LMMC representaría la conversión leucémica de un sistema hematopoyético sesgado, con la edad, hacia un linaje mielomonocítico (Mason *et al.*, 2016).

Existen principalmente dos tipos de mutaciones del ADN, las mutaciones puntuales o cambios de un nucleótido (single nucleotide variants, SNVs) o las pequeñas inserciones y deleciones (indels). En función del efecto que estas mutaciones tienen en la secuencia de la proteína correspondiente, se clasifican en: silenciosas (no tienen ningún efecto en la proteína), *missense* (SNVs que generan un cambio de aminoácido), *nonsense* (SNVs que generan un codón de STOP o de terminación de la proteína), *frameshift* (indels que generan un cambio en la pauta de lectura) e *inframe* (indels que no generan un cambio en la pauta de lectura).

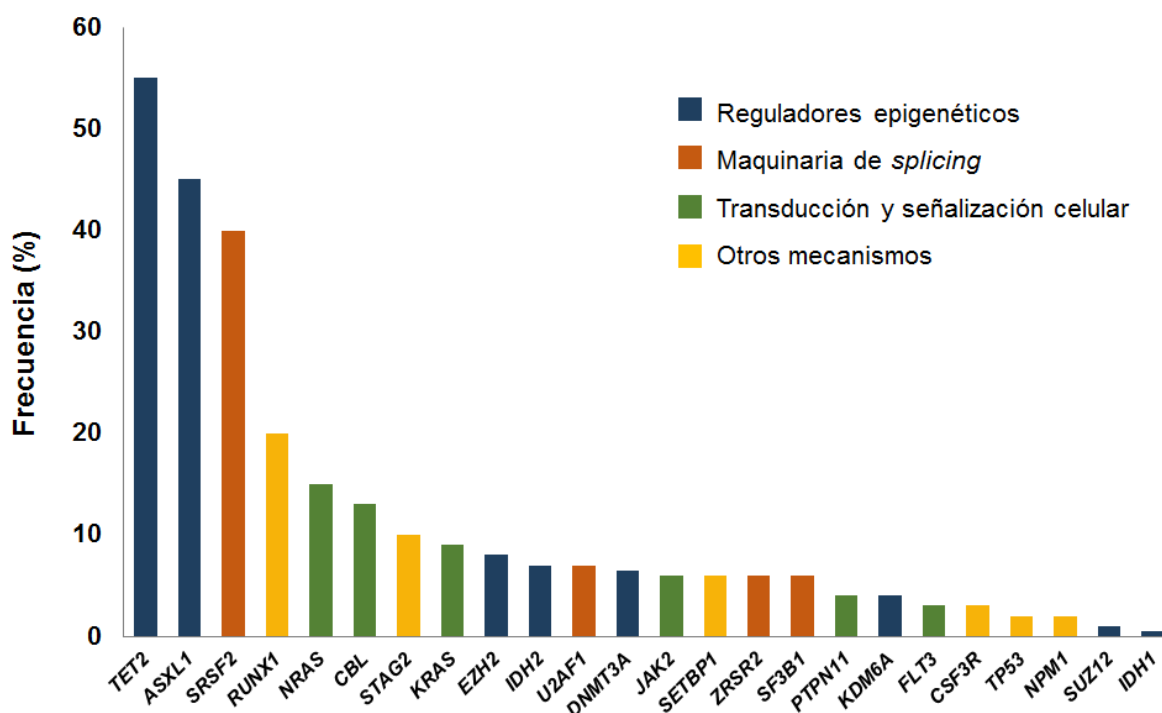


Figura 6. Incidencia de las mutaciones somáticas descritas en pacientes con LMMC

Tabla 5. Frecuencia de las mutaciones somáticas descritas en la LMMC

Gen	Localización	Frecuencia	Gen	Localización	Frecuencia
<i>TET2</i>	4q24	50-60%	<i>STAG2</i>	Xq25	10%
<i>ASXL1</i>	20q11.21	40-50%	<i>SETBP1</i>	18q12.3	4-9%
<i>SRSF2</i>	17q25.1	30-50%	<i>ZRSR2</i>	Xp22.2	4-8%
<i>RUNX1</i>	21q22.12	10-30%	<i>SF3B1</i>	2q33.1	6%
<i>NRAS</i>	1p13.2	10-20%	<i>PTPN11</i>	12q24.13	4%
<i>CBL</i>	11q23.3	8-18%	<i>KDM6A</i>	Xp11.3	4%
<i>KRAS</i>	12p12.1	5-13%	<i>FLT3</i>	13q12.2	3-4%
<i>EZH2</i>	7q36.1	5-12%	<i>CSF3R</i>	1p34.3	3-4%
<i>IDH2</i>	15q26.1	4-10%	<i>TP53</i>	17p13.1	1-3%
<i>U2AF1</i>	21q22.3	4-10%	<i>NPM1</i>	5q35.1	1-3%
<i>DNMT3A</i>	2p23.3	2-10%	<i>SUZ12</i>	17q11.2	1%
<i>JAK2</i>	9p24.1	1-10%	<i>IDH1</i>	2q33	<1%

2.7.1. Reguladores epigenéticos

El término epigenética se usa generalmente para hacer referencia a los cambios en la expresión génica que tienen lugar sin la alteración de la secuencia codificante del ADN. Los cambios epigenéticos que se han descrito en la leucemogénesis caen principalmente en una de las siguientes categorías: cambios en la metilación del ADN o alteraciones en el patrón de modificación de las histonas (Chen *et al.*, 2010). El mecanismo de la metilación de las islas CpG, localizadas principalmente en las regiones promotoras de los genes, es esencial en el control de la transcripción génica. La metilación de estos *clusters* de dinucleótidos CpG se asocia con una disminución en la expresión del gen correspondiente. En la LMMC, se han descrito mutaciones en varios genes reguladores de la metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) (Bastie *et al.*, 2012; Patnaik and Tefferi, 2016). Las histonas son proteínas que contribuyen al empaquetamiento del ADN en la cromatina y que almacenan información epigenética a través de modificaciones post-transcripcionales como la acetilación, metilación y fosforilación de determinados residuos (Esteller, 2008). Estas modificaciones están catalizadas por un grupo de enzimas, algunos de los cuales se encuentran mutados en la LMMC (*ASXL1*, *EZH2*, *UTX*, *SUZ12*) (Bastie *et al.*, 2012; Patnaik and Tefferi, 2016).

TET2: el gen *TET2*, localizado en 4q24, codifica para un miembro de la familia de proteínas TET (*TET1*, *TET2* y *TET3*), cuya actividad enzimática cataliza la conversión de la 5-metilcitosina a 5-hidroximetil-citosina (Ito *et al.*, 2010). Delhommeau y cols. identificaron por primera vez mutaciones de *TET2* en pacientes con diferentes neoplasias mieloides (SMD, NMP, SMD/NMP y LMA), asociadas a la pérdida de heterocigosidad de la región 4q24. Estas mutaciones pueden ser de tipo *missense*, *nonsense* y *frameshift* y afectan a todos los exones del gen (Delhommeau *et al.*, 2009). Poco después se demostró que esta proteína jugaba un papel importante en la mielopoyesis y que las mutaciones en el gen daban lugar a la disrupción de su actividad enzimática, favoreciendo la tumorigénesis mieloide (Ko *et al.*, 2010). Las mutaciones de *TET2* afectan al 50-60% de pacientes con LMMC, siendo la neoplasia hematológica donde estas mutaciones ocurren con mayor frecuencia (Kosmider *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2016b). De hecho, en modelos murinos, las mutaciones de *TET2* dan lugar al desarrollo de una neoplasia con un fenotipo similar al de la LMMC (Li *et al.*, 2011; Moran-Crusio *et al.*, 2011). El significado pronóstico de las mutaciones de *TET2* en pacientes con LMMC ha sido evaluado en numerosos estudios. Aunque algunos primeros estudios reportaron resultados poco concluyentes (Kosmider *et al.*, 2009; Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010), la mayoría de trabajos apuntan a un posible impacto beneficioso de estas mutaciones, asociándose a características clínico-biológicas de bajo riesgo y a una SG superior (Tabla 6) (Kohlmann *et al.*, 2010; Itzykson *et al.*, 2013b; Cui *et al.*, 2015; Patnaik *et al.*, 2016a, 2016b). Las mutaciones de *TET2* se han asociado también a una mayor tasa de respuesta al tratamiento con agentes hipometilantes en pacientes con SMD y LMMC (Bejar *et al.*, 2014).

ASXL1: el gen *ASXL1* se localiza en 20q11.21 y codifica para una proteína nuclear reguladora de la transcripción y la cromatina, que actúa mediante la interacción con el complejo represivo *polycomb* (PRC2) y con activadores y represores de la transcripción (Gelsi-Boyer *et al.*, 2012). Las mutaciones de *ASXL1* se describieron por primera vez en un estudio realizado por Gelsi-Boyer y cols. en pacientes con LMMC y SMD (Gelsi-Boyer *et al.*, 2009). La mayoría de estas mutaciones son de tipo *nonsense* o *frameshift* y afectan principalmente al exón 12 del gen, dando lugar a una proteína truncada en el extremo C-terminal (Gelsi-Boyer *et al.*, 2009; Boulwood *et al.*, 2010; Abdel-Wahab *et al.*, 2011a). Algunos estudios sugieren que estas mutaciones conllevan la pérdida de marcas epigenéticas, promoviendo así la oncogénesis mediante la desregulación de la transcripción (Abdel-Wahab *et al.*, 2012; Balasubramani *et al.*, 2015). Aunque las mutaciones de *ASXL1* no son específicas para la LMMC, ésta es la neoplasia hematológica que presenta un mayor porcentaje de pacientes con este tipo de mutaciones, detectándose entre un 40-50% de los pacientes (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2011; Jankowska *et al.*, 2011; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2013a). De hecho, la presencia de mutaciones de *ASXL1* en pacientes con SMD de bajo riesgo se ha asociado a la progresión a LMMC (Valencia-Martinez *et al.*, 2017). Los pacientes con LMMC y mutaciones en *ASXL1* presentan características clínicas de riesgo adverso (leucocitosis, mayor número de blastos y enfermedad extramedular), así como una SG inferior y un mayor riesgo de transformación a LMA (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2014b, 2016a; Cui *et al.*, 2015, 2016; Elena *et al.*, 2016). Las mutaciones en *ASXL1* han sido las únicas que, en varios estudios, han demostrado tener un valor pronóstico independiente en el análisis multivariado (Tabla 6). Por este motivo las mutaciones de *ASXL1* han sido las primeras en ser incorporadas en los índices pronósticos de la LMMC que incluyen datos moleculares (Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2014b; Elena *et al.*, 2016).

EZH2: el gen *EZH2*, localizado en 7q36.1, codifica para la subunidad catalítica del complejo PRC2 (formado también por las proteínas SUZ12 y EED). Este complejo tiene actividad histona metiltransferasa y su diana es la lisina 27 de la histona H3 (H3-K27). La metilación de la H3-K27 es una marca de la cromatina comúnmente asociada al silenciamiento de genes de diferenciación (Simon and Lange, 2008). Ernst y cols. describieron por primera vez las mutaciones de *EZH2*, asociadas a pacientes con neoplasias mieloides y disomía uniparental (pérdida de heterocigosidad) en el cromosoma 7q (Ernst *et al.*, 2010). En este estudio se vio que los pacientes con mayor frecuencia de mutaciones en *EZH2* correspondían a SMD/NMP y MFP, seguidos de pacientes con SMD. Estas mutaciones pueden ser de tipo *missense*, *nonsense* y *frameshift* y provocan una pérdida en la función de la proteína, que actúa como un gen supresor de tumores (*tumor suppressor gene*, TSG) en las neoplasias mieloides (Ernst *et al.*, 2010). Las mutaciones de *EZH2* afectan al 5-12% de pacientes con LMMC (Ernst *et al.*, 2010; Abdel-Wahab *et al.*, 2011a; Grossmann *et al.*, 2011; Jankowska *et al.*, 2011; Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016). En cuanto al valor

pronóstico de estas mutaciones en la LMMC, Grossmann y cols. reportaron una asociación con una SG inferior, similar a lo que está descrito en pacientes con SMD (Tabla 6) (Bejar *et al.*, 2011; Grossmann *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayoría de trabajos no han encontrado ninguna correlación, principalmente debido al limitado número de casos mutados incluidos en las series (Jankowska *et al.*, 2011; Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016).

DNMT3A: el gen *DNMT3A* se encuentra en 2p23.3 y codifica para un enzima con actividad metiltransferasa. Las metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B catalizan la adición de un grupo metil en el residuo de citosina de los dinucleótidos CpG, jugando un papel en la regulación de la expresión génica. Se ha descrito que DNMT3A es un componente importante en el mantenimiento de la metilación de los dominios activos de los cromosomas (Raddatz *et al.*, 2012). Las mutaciones de *DNMT3A* se identificaron por primera vez al secuenciar el exoma de pacientes con LMA (Ley *et al.*, 2010). Poco después se describieron, en menor frecuencia, en pacientes con SMD, LMMC y MFP (Abdel-Wahab *et al.*, 2011b; Jankowska *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2011). Estas mutaciones son de tipo *missense* y *nonsense*, se concentran en el dominio metiltransferasa y afectan frecuentemente al *hotspot* R882 (Arginina 882), dando lugar a un enzima con actividad reducida y un efecto dominante-negativo (Ley *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). Las mutaciones de *DNMT3A* afectan a un 2-10% de los pacientes con LMMC (Jankowska *et al.*, 2011; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016; Patnaik *et al.*, 2017). De forma similar a lo que se ha descrito en pacientes con LMA y SMD, las mutaciones de *DNMT3A* tienen un impacto desfavorable en la LMMC, asociándose a una SG inferior y a un mayor riesgo de progresión a LMA (Tabla 6) (Ley *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2011; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2017).

IDH1/2: los genes *IDH1* e *IDH2*, en 2q33 y 15q26.1, codifican para dos isoformas (la soluble y la mitocondrial) del enzima isocitrato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de isocitrato a alfa-cetoglutarato de forma NADP-dependiente. Este metabolito regula la actividad de TET2. Las mutaciones de *IDH1* e *IDH2* se describieron por primera vez en tumores sólidos (gliomas) y poco después se identificaron en neoplasias hematológicas, tras la secuenciación del genoma de pacientes con LMA (Mardis *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2010). Estas mutaciones alteran la función de la proteína, provocando una desregulación en el mecanismo epigenético de la metilación del ADN. Las mutaciones de *IDH2* se detectan en un 4-10% de pacientes con LMMC, son de tipo *missense* y afectan a los residuos de Arginina R140 y R172; mientras que las mutaciones de *IDH1*, que afectan al residuo R132, son muy poco frecuentes y se han descrito en <1% de casos con LMMC (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Kosmider *et al.*, 2010; Abdel-Wahab *et al.*, 2011a; Jankowska *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2011b; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016). Las mutaciones de *IDH2* se han asociado a la variante LMMC-2, pero no se ha descrito que tengan un impacto pronóstico en la enfermedad (Itzykson *et al.*, 2013b).

2.7.2. Maquinaria de splicing

El spliceosoma es un gran complejo proteico involucrado en el proceso de *splicing*, cuya función es eliminar los intrones del pre-ARN mensajero (pre-ARNm) para generar el ARN mensajero maduro (ARNm) durante el proceso de la transcripción genética. Las mutaciones de genes del spliceosoma, como *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2* y *SF3B1*, entre otros, se identificaron por primera vez en 2011 en un estudio de Yoshida y cols. en el que se secuenció el exoma de pacientes con mielodisplasia (Yoshida *et al.*, 2011a). Este trabajo incluía pacientes con LMMC. Ya que afectan al mismo proceso biológico, todas las mutaciones de *splicing* son, generalmente, excluyentes entre ellas. Se cree que estas mutaciones podrían afectar a las fronteras intrón-exón de determinados genes transcritos, mediante la incorporación inadecuada de intrones o exones en el ARNm específico. Esto podría alterar la habilidad de la célula de diferenciarse en células de la sangre completamente maduras, dando lugar a un fenotipo displásico (Yoshida *et al.*, 2011a). Estas mutaciones suelen ser de tipo *missense* y suelen afectar a *hotspots*, lo que sugiere una ganancia o cambio de función (Ganguly and Kadam, 2016). Son frecuentes en pacientes con SMD y SMD/NMP, mientras que son muy poco comunes en pacientes con NMP o LMA (Yoshida *et al.*, 2011a; Ganguly and Kadam, 2016).

SRSF2: el gen *SRSF2* se localiza en 17q25.1 y codifica para una proteína SR (*serine rich*) de la maquinaria de *splicing*. El *splicing* del ARN es un mecanismo altamente regulado en el que están involucrados diversos complejos nucleares ribonucleoproteicos pequeños, como U1 y U2, entre otros. Mediante la interacción con proteínas SR como *SRSF2*, el heterodímero U2AF (factor auxiliar del complejo U2), actúa en el reconocimiento del sitio de *splicing* 3' del pre-ARNm. Las mutaciones de *SRSF2* impiden este reconocimiento, dando lugar a la producción de ARNms aberrantes (Yoshida *et al.*, 2011a). Entre un 30-50% de pacientes con LMMC presentan mutaciones en *SRSF2*, que generalmente son de tipo *missense* y afectan al *hotspot* Prolina 95 (P95) (Makishima *et al.*, 2012; Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2013b). Junto con *TET2* y *ASXL1*, *SRSF2* es uno de los genes más frecuentemente afectados en la LMMC, pero a diferencia de los primeros, no se ha visto mutado en la población sana de edad avanzada (Xie *et al.*, 2014). Por ello, y a pesar de no ser específico de esta entidad, puede tener utilidad diagnóstica, especialmente como marcador clonal en el diagnóstico diferencial con otras causas de monocitosis (Meggendorfer *et al.*, 2012; Palomo *et al.*, 2013). Las mutaciones de *SRSF2* se asocian a las mutaciones de *TET2* en la LMMC (Tabla 6) (Meggendorfer *et al.*, 2012; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2013b, 2016b). El valor pronóstico de estas mutaciones en la LMMC no está claro. En un estudio de Itzykson y cols. las mutaciones de *SRSF2* se asociaron con una SG y una supervivencia libre de progresión (SLP) inferiores, pero la mayoría de trabajos no han encontrado ninguna correlación con el pronóstico de los pacientes (Makishima *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2013a, b, 2016a; Elena *et al.*, 2016).

U2AF1: el gen *U2AF1*, también conocido como *U2AF35*, se localiza en 21q22.3 y codifica para una de las proteínas del heterodímero U2AF, formado por U2AF65-U2AF35. Este heterodímero interacciona con el extremo 5' del pre-ARNm, mediante la subunidad U2AF65, y con el extremo 3' y con proteínas SR a través de la subunidad pequeña, U2AF35 (Yoshida *et al.*, 2011a). Las mutaciones en *U2AF1*, así como en cualquier componente involucrado en este proceso, afectan al ensamblaje de la maquinaria de *splicing* y al correcto funcionamiento de ésta. Las mutaciones de *U2AF1* son de tipo *missense* y afectan a un 4-12% de pacientes con LMMC (Itzykson *et al.*, 2013b; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2013b; Cervera *et al.*, 2014; Elena *et al.*, 2016). Puntualmente, se han asociado a las mutaciones de *ASXL1* y a la variante LMMC-2, pero no se ha observado que tengan un impacto pronóstico en la enfermedad (Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2013a).

ZRSR2: el gen *ZRSR2*, localizado en Xp22.2, codifica para un factor de *splicing* con una estructura similar a U2AF35, que interacciona con el complejo U2AF, vía U2AF65, y con proteínas SR como SRSF1 y SRSF2. Este factor juega un papel esencial en el ensamblaje de la maquinaria de *splicing* del pre-ARNm (Yoshida *et al.*, 2011a). Las mutaciones en *ZRSR2* suelen ser de tipo *nonsense* y *frameshift*, se detectan en un 4-8% de pacientes con LMMC y no parecen tener un impacto pronóstico en la enfermedad (Itzykson *et al.*, 2013b; Cervera *et al.*, 2014; Elena *et al.*, 2016).

SF3B1: el gen *SF3B1*, localizado en 21q33.1, codifica para una proteína que, junto con SF3A1, interactúa con el complejo U2 después del reconocimiento del sitio 3' (Yoshida *et al.*, 2011a). Las mutaciones de *SF3B1* son de tipo *missense*, suelen afectar al residuo de Lisina 700 (K700) y tienen un efecto dominante-negativo o de ganancia de función (Ganguly and Kadam, 2016). Estas mutaciones se detectan en un 6% de pacientes con LMMC (Itzykson *et al.*, 2013b; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016). Las mutaciones de *SF3B1* son un buen ejemplo de la asociación genotipo-fenotipo, ya que muestran una fuerte correlación con la presencia de sideroblastos en anillo, tanto en la LMMC como en los SMD (Papaemmanuil *et al.*, 2011; Patnaik *et al.*, 2013b). En estos últimos, las mutaciones de *SF3B1* se detectan hasta en el 80% de pacientes con ARSA y se asocian a una SG prolongada y un riesgo casi nulo de progresión a LMA (Bejar *et al.*, 2011; Malcovati *et al.*, 2011; Papaemmanuil *et al.*, 2011). En pacientes con LMMC, las mutaciones de *SF3B1* se han asociado a características de buen pronóstico, como valores superiores de hemoglobina y cifras normales de leucocitos y de linfocitos (Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2013b).

2.7.3. Transducción y señalización celular

Las vías de señalización celular son las encargadas de regular la proliferación y la apoptosis celular y están altamente reguladas por cascadas de señales, cuyos principales componentes

son enzimas de tipo tirosina quinasa. Las mutaciones en los transductores de estas señales dan lugar, generalmente, a una activación constitutiva de la vía y a una proliferación descontrolada. En la LMMC se han descrito mutaciones recurrentes en componentes de la vía RAS/RAF/MEK (*KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *FLT3*), de la vía JAK/STAT (*JAK2*), en proteínas involucradas en la regulación de la señalización celular por enzimas tirosina quinasa (*CBL*) y en receptores transmembrana de vías de señalización (*KIT*). Las mutaciones que afectan a vías de señalización suelen ser mutuamente excluyentes entre ellas. Este tipo de mutaciones son más frecuentes en las NMP que en los SMD, ya que la activación de vías de señalización se asocia con fenotipos proliferativos. Por ello, la presencia de estas mutaciones generalmente se asocia a la variante mieloproliferativa de la LMMC y, en algunos casos, a la transformación a LMA (Tabla 6) (Bastie *et al.*, 2012; Ganguly and Kadam, 2016; Patnaik and Tefferi, 2016).

***N/KRAS*:** los genes *NRAS* y *KRAS*, localizados en 1p13.2 y 12p12.1, codifican para proteínas de la familia RAS, que incluye, además, el gen *HRAS*. Las proteínas RAS son proteínas G monoméricas con actividad enzimática GTPasa que funcionan como interruptores moleculares en determinadas vías de señalización, regulando numerosos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, apoptosis y adhesión y migración celular (Bos, 1989). Las mutaciones en los genes de la familia RAS se describieron en la década de los 80, mediante un ensayo de transfección, y afectan a un gran número de tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Bos, 1989). Las mutaciones en *N/KRAS* afectan a los exones 1 y 2 de los genes, son de tipo *missense* y dan lugar a proteínas que han perdido la capacidad de inactivarse y que estimulan de forma constitutiva el crecimiento o la diferenciación celular (Bos, 1989). Las mutaciones de *N/KRAS* se describieron por primera vez en la LMMC en 1990, en un estudio que identificó un 57% de mutaciones *missense* en una serie de 30 pacientes con LMMC (Hirsch-Ginsberg *et al.*, 1990). Años después, estudios en series más largas de pacientes han constatado que las mutaciones de *NRAS* y *KRAS* afectan al 10-20% y al 5-13% de los pacientes con LMMC, respectivamente (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Kohlmann *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2011; Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016; Patnaik *et al.*, 2016a). Las mutaciones en *N/KRAS* se asocian con la LMMC-MP y con características propias de esta variante, como la leucocitosis, la afectación extramedular, un mayor número de blastos y las mutaciones en *ASXL1* (Gelsi-Boyer *et al.*, 2008; Ricci *et al.*, 2010; Jankowska *et al.*, 2011; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016). A nivel pronóstico, las mutaciones de *NRAS* se asocian a una SG y una SLP inferiores en pacientes con LMMC (Tabla 6) (Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016).

***CBL*:** el gen *CBL* se localiza en 11q23.3 y codifica para un enzima E3 ubiquitina ligasa involucrada en la ubiquitinación (adición de marcas de ubiquitina) y degradación de receptores activos de tirosina quinasa (Joazeiro *et al.*, 1999). Las mutaciones de *CBL* se describieron por primera vez en pacientes con LMA y, poco después, en SMD y SMD/NMP, asociadas a pérdidas de heterocigosidad de la región 11q (Caligiuri *et al.*, 2007; Dunbar *et al.*, 2008). Las mutaciones

de *CBL* afectan a los exones 8 y 9 del gen y son de tipo *missense*. Su efecto es inactivador y afectan al dominio *RING finger* o a dominios adyacentes, provocando una modificación en la estructura de la proteína (Dunbar *et al.*, 2008). Las mutaciones de *CBL* se detectan en el 10-18% de los pacientes con LMMC (Dunbar *et al.*, 2008; Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Kohlmann *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2011; Jankowska *et al.*, 2011; Meggendorfer *et al.*, 2012; Schnittger *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2016a). Son excluyentes con otras mutaciones en transductores de señales, como *K/RAS*, se asocian con las mutaciones de *TET2* y con la presencia de esplenomegalia (Kohlmann *et al.*, 2010; Jankowska *et al.*, 2011; Itzykson *et al.*, 2013b). Aunque muchos estudios no han encontrado una relación definitiva entre estas mutaciones y el pronóstico en pacientes con LMMC, sí se han asociado a una menor SG en algunos trabajos (Tabla 6) (Jankowska *et al.*, 2011; Itzykson *et al.*, 2013b).

JAK2: el gen *JAK2*, en 9p24.1, codifica para una tirosina quinasa de la familia JAK, que incluye, también, los genes *JAK1*, *JAK3* y *TYK2*. Las proteínas de la familia JAK juegan un papel en la vía de señalización JAK/STAT mediante la interacción con los dominios citosólicos de los receptores de citoquinas de la vía. *JAK2* juega un papel en la señalización vía citoquinas hematopoyéticas involucradas en la mielopoyesis (Silvennoinen and Hubbard, 2015). La mutación V617F del exón 14 de *JAK2* fue descrita por primera vez en las NMP Filadelfia negativas (NMP Ph-), detectándose hasta en un 90% de los pacientes con PV y un 50-60% de los pacientes con TE y MFP (Baxter *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005). Esta mutación afecta al dominio pseudoquinasa de *JAK2* y activa constitucionalmente su actividad tirosina quinasa (Silvennoinen and Hubbard, 2015). La mutación *JAK2* V617F afecta a un 1-10% de los pacientes con LMMC, se asocia a la variante mieloproliferativa de la enfermedad y no tiene impacto en el pronóstico de los pacientes (Tabla 6) (Pich *et al.*, 2009; Kohlmann *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2011; Jankowska *et al.*, 2011; Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Kar *et al.*, 2013; Elena *et al.*, 2016; Patnaik *et al.*, 2016a).

2.7.4. Otros mecanismos

RUNX1: el gen *RUNX1*, localizado en 21q22.12, codifica para la subunidad alfa, con dominio de unión al ADN, de CBF (*core binding factor*), un factor de transcripción heterodimérico involucrado en la regulación de numerosos genes esenciales para la hematopoyesis. El gen *RUNX1* (o *AML1*) se identificó por primera vez en la LMA como punto de corte de la translocación t(8;21)(q26;q22) (Miyoshi *et al.*, 1991). *RUNX1* se encuentra reordenado en ésta y en otras translocaciones, presentes en pacientes con LMA y con leucemia aguda linfoblástica (Imai *et al.*, 2000). Las mutaciones somáticas de *RUNX1* se identificaron por primera vez en pacientes con LMA y, varios años después, se describieron en la LMMC (Osato *et al.*, 1999; Gelsi-Boyer *et al.*, 2008). *RUNX1* es un gen supresor de tumores, cuyas mutaciones afectan a los extremos N- y C-terminal y pueden ser de tipo *missense*, *nonsense*, *frameshift* o de *splicing*.

Estas mutaciones dan lugar a una proteína truncada o aberrante, con un efecto dominante-negativo o de haploinsuficiencia, que juega un papel en la leucemogénesis (Imai *et al.*, 2000; Gelsi-Boyer *et al.*, 2008). En la LMMC, las mutaciones de *RUNX1* afectan al 10-30% de los pacientes (Gelsi-Boyer *et al.*, 2008, 2010; Kuo *et al.*, 2009; Kohlmann *et al.*, 2010; Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Kar *et al.*, 2013; Elena *et al.*, 2016). Estas mutaciones se asocian con un pronóstico desfavorable, incluyendo una menor SG y un mayor riesgo de transformación a LMA (Tabla 6) (Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016).

SETBP1: el gen *SETBP1* se localiza en 18q12.3 y codifica para un regulador de la proteína nuclear SET, un oncogen involucrado en la división celular (Ganguly and Kadam, 2016). Piazza y cols. identificaron por primera vez las mutaciones de *SETBP1* tras la secuenciación del exoma de pacientes con LMCa, y realizaron un *screening* de mutaciones de *SETBP1* en numerosas neoplasias hematológicas, identificándose solamente en pacientes con SMD/NMP y en SMD con menor frecuencia (LMCa, LMMC y SMD/NMP-I) (Piazza *et al.*, 2013). Las mutaciones de *SETBP1* son de tipo *missense* y afectan a los residuos 858-874 del dominio homólogo-SKI. Estas mutaciones evitan la degradación de la proteína, lo que conlleva la estabilización de SET, con una consecuente inhibición de proteínas fosfatasa y un aumento en la proliferación celular (Ganguly and Kadam, 2016). Las mutaciones de *SETBP1* se detectan en el 4-9% de los pacientes con LMMC y se asocian a las mutaciones de *ASXL1* (Damm *et al.*, 2013; Laborde *et al.*, 2013; Piazza *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2014b; Elena *et al.*, 2016). A nivel clínico, se han asociado a un mayor número de blastos y a una SG inferior (Tabla 6) (Damm *et al.*, 2013; Laborde *et al.*, 2013; Elena *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2017).

STAG2: el gen *STAG2* se localiza en Xq25 y codifica para un componente de la cohesina, un complejo proteico multimérico involucrado en la cohesión de las cromátidas hermanas, la reparación post-replicativa del ADN y la regulación transcripcional (Kon *et al.*, 2013). En un trabajo publicado por Kon y cols. reportaron por primera vez mutaciones recurrentes en pacientes con neoplasias mieloides en los componentes del complejo cohesina, incluidos los genes *STAG2*, *RAD21*, *SMC1A* y *SMC3*. Los resultados de este estudio sugerían que estas mutaciones conllevaban la pérdida de sitios de interacción con la cromatina (Kon *et al.*, 2013). Los pacientes con LMMC solamente presentaban mutaciones en el gen *STAG2*, y éstas se detectaron en un 10% de los casos (Kon *et al.*, 2013). El papel que juegan estas mutaciones o su valor pronóstico no ha sido explorado en la LMMC más allá de este estudio, por lo que se desconoce su impacto en la enfermedad.

Tabla 6. Utilidad diagnóstica y pronóstica de las mutaciones somáticas en la LMMC. Adaptación de Solary y Itzykson (Solary and Itzykson, 2017).

Gen	Frecuencia	Valor diagnóstico	Pronóstico negativo (nivel de evidencia)
<i>TET2</i>	50-60%	Combinación característica de la LMMC	No (buen pronóstico)
<i>SRSF2</i>	30-50%		Bajo
<i>ASXL1</i>	40-50%		Alto
<i>RUNX1</i>	10-30%	Asociado a trombocitopenia	Intermedio
<i>NRAS</i>	10-20%	Asociado a LMMC-MP	Intermedio
<i>CBL</i>	8-18%		Bajo
<i>KRAS</i>	5-13%		
<i>JAK2</i>	1-10%		
<i>EZH2</i>	5-12%		Bajo
<i>DNMT3A</i>	2-10%		Intermedio
<i>SETBP1</i>	4-9%		Intermedio

2.8. Índices pronósticos

Los **índices pronósticos** son sistemas de puntuación que incluyen variables clínicas, biológicas, citogenéticas y/o moleculares, y que se utilizan para estratificar a los pacientes en función de su pronóstico. Este tipo de índices son esenciales en enfermedades heterogéneas como los SMD y la LMMC, ya que permiten predecir el pronóstico de cada paciente y ofrecer un tratamiento lo más individualizado posible.

En las décadas de los 80 y los 90, la LMMC todavía se consideraba un subtipo de SMD, por lo que su pronóstico se evaluaba con los índices desarrollados para pacientes con SMD. El primer índice pronóstico desarrollado exclusivamente para la LMMC fue el **Sistema de Bournemouth modificado** (Worsley *et al.*, 1988; Molica *et al.*, 1990). Este índice era una adaptación del Sistema de Bournemouth desarrollado previamente para pacientes con SMD y que era poco aplicable a la LMMC (Mufti *et al.*, 1985). Este sistema se desarrolló a partir de una serie de 53 pacientes con LMMC y distinguía dos grupos de riesgo, bajo y alto (medianas de SG de 27 y 15 meses, respectivamente), basándose en cuatro variables biológicas: nivel de hemoglobina, cifra de neutrófilos, recuento de plaquetas y porcentaje de blastos en MO. Poco después, Aul y cols. desarrollaron el **Índice de Düsseldorf** para pacientes con SMD, que incluía tres grupos

de riesgo (Aul *et al.*, 1992). Este sistema se validó años más tarde en una serie de pacientes con LMMC y resultó ser particularmente bueno en estos pacientes, pues identificaba un grupo pequeño (6%) de pacientes con muy buen pronóstico (mediana de SG de 93 meses) y, en el extremo opuesto, otro grupo de pacientes (34%) de alto riesgo con una SG inferior a 1 año (Germing *et al.*, 2004).

Años más tarde, a raíz de una iniciativa internacional, se publicó el **International Prognostic Scoring System** (IPSS) para pacientes con SMD (Greenberg *et al.*, 1997). Este índice tuvo una gran acogida y se utilizó durante muchos años, hasta que en 2012 se publicó una revisión del mismo, el IPSS-R (Greenberg *et al.*, 2012). La utilidad del IPSS en la LMMC era limitada ya que, a pesar de incluir pacientes con esta entidad, el IPSS excluía aquellos casos con una cifra de leucocitos superior a $12 \times 10^9/L$, y por tanto no era aplicable a la LMMC-MP (Greenberg *et al.*, 1997).

Poco después, se desarrollaron dos índices específicos para la LMMC. El **Índice Español** se desarrolló con 70 pacientes con LMMC e identificaba dos grupos de riesgo, bajo y alto (medianas de SG de 44 y 7 meses, respectivamente), basándose en los niveles de hemoglobina, LDH, recuento leucocitario y porcentaje de blastos en MO (González-Medina *et al.*, 2002). Ese mismo año se publicó también el **Índice del M.D. Anderson Cancer Center** (MDAPS), a partir de una serie más larga de 213 pacientes con LMMC (Onida *et al.*, 2002). Este índice incluía 4 variables (porcentaje de blastos y de precursores mieloides en MO, hemoglobina y recuento de linfocitos) y distinguía 4 grupos de riesgo: bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto, con unas medianas de SG de 24, 15, 8 y 5 meses, respectivamente.

A pesar de que la utilidad de estos índices fue validada en algunas series independientes de pacientes con LMMC, éstos también presentaban algunas limitaciones (Breccia *et al.*, 2004; Germing *et al.*, 2004, 2007). En primer lugar, varios de estos índices fueron desarrollados para pacientes con SMD y, los específicos de LMMC, se basaban en series pequeñas de pacientes. En segundo lugar, aunque en todos los índices hubiera diferencias significativas entre los grupos de riesgo, para un paciente determinado, su supervivencia variaba considerablemente según el sistema pronóstico utilizado. Finalmente, ninguno de estos índices incluía datos citogenéticos o moleculares.

Con los años, paralelamente al incremento en el conocimiento de las bases genéticas de la LMMC, se hizo evidente la necesidad de nuevos índices que incorporaran estos datos y que fueran más eficaces. Una década después de la publicación del MDAPS, aparecieron varios índices pronósticos nuevos específicos para la LMMC, que habían sido desarrollados en series más largas de pacientes y que incluían datos citogenéticos y/o moleculares (Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2013a, 2014b; Such *et al.*, 2013; Elena *et al.*, 2016). En la Tabla 7 se resumen las variables incluidas en estos índices pronósticos, así como las puntuaciones asociadas a cada una de estas variables.

2.8.1. CMML-specific prognostic scoring system

El *CMML-specific prognostic scoring system* (CPSS) es un índice específico para LMMC propuesto por el GESMD (Such *et al.*, 2013). Such y col. desarrollaron este índice a partir de una serie de 558 pacientes con LMMC del Registro Español de SMD y lo validaron en una serie independiente de 274 pacientes del Registro de Düsseldorf y del Hospital San Matteo de Pavia. El CPSS fue el primer índice para la LMMC en incorporar datos citogenéticos. Las variables incluidas en el CPSS son: las variantes LMMC-MD y LMMC-MP de la clasificación FAB (equivalentes al recuento leucocitario), los subtipos LMMC-1 y LMMC-2 de acuerdo con la OMS 2008 (equivalentes al porcentaje de blastos en MO y/o SP), la dependencia transfusional (DT), que es una medida del grado de anemia que presenta el paciente, y los tres grupos de riesgo citogenéticos definidos previamente por el GESMD (Such *et al.*, 2011) (Tabla 7). En función de la puntuación obtenida según estas variables los pacientes se clasifican en 4 grupos con una SG y riesgo de progresión a LMA diferenciados: bajo riesgo (0 puntos; SG de 72 meses), intermedio-1 (1 punto; SG de 31 meses), intermedio.2 (2-3 puntos; SG de 13 meses) y alto riesgo (4-5 puntos; SG de 5 meses). En este trabajo también proponían otro modelo, el CPSS alternativo, que integraba el valor de hemoglobina como medida de la anemia en vez de la dependencia transfusional, lo que lo hacía más sencillo de aplicar. Este modelo funcionaba casi igual de bien que el CPSS, aunque no permitió separar los 4 grupos de riesgo, en cuanto a la progresión a LMA, en la serie de validación.

2.8.2. GFM CMML prognostic Model

El *GFM CMML prognostic Model* (*GFM Model*) es un índice pronóstico específico para la LMMC desarrollado por el Grupo Francés de SMD (Groupe Francophone des Myelodysplasies, GFM) (Itzykson *et al.*, 2013b). Para el desarrollo de este índice, se incluyeron 312 pacientes del GFM y, en la serie de validación, 165 pacientes del Munich Leukemia Laboratory. El *GFM Model* fue el primer índice pronóstico en incluir datos moleculares y distinguía 3 grupos en función de las siguientes variables: edad, leucocitosis, anemia, cifra de plaquetas y presencia de mutaciones somáticas en *ASXL1* (Tabla 7). Los 3 grupos de riesgo se diferenciaban en la mediana de SG y SLP: bajo riesgo (0-4 puntos; SG no alcanzada), intermedio (5-7 puntos; SG de 38,5 meses) y alto riesgo (8-11 puntos; SG de 14,4 meses).

2.8.3. Mayo prognostic model for CMML

El mismo año en que se publicaron el CPSS y el *GFM Model*, apareció un nuevo índice pronóstico específico para la LMMC desarrollado por un grupo de la Clínica Mayo, el *Mayo prognostic model for CMML* (Patnaik *et al.*, 2013a). Patnaik y cols. desarrollaron este índice con datos de 226 pacientes de la Clínica Mayo y lo validaron en una serie de 268 pacientes del Lee Moffitt Cancer Center. En este estudio analizaron variables tanto biológicas, como citogenéticas

(grupos de riesgo citogenético según el GESMD) y moleculares (mutaciones en *ASXL1*, *SRSF2*, *U2AF1* y *SF3B1*), pero solamente las primeras demostraron tener un impacto pronóstico independiente y por ello fueron las únicas que prevalecieron en el modelo final. En este modelo se definieron 4 factores de riesgo adverso: monocitosis $>10 \times 10^9/L$, hemoglobina $<10g/dL$, cifra de plaquetas $<100 \times 10^9/L$ y presencia de células inmaduras mieloides (IMC) circulantes (Tabla 7). En función del número de factores de riesgo que presentaran los pacientes, éstos se clasificaban en: bajo riesgo (0 factores; SG de 32 meses), riesgo intermedio (1 factor; SG de 18,5 meses) y alto riesgo (≥ 2 factores; SG de 10 meses).

2.8.4. CMML Mayo Molecular Model

Ante el fracaso en la incorporación de datos moleculares en el *Mayo prognostic model for CMML*, se llevó a cabo un estudio colaborativo entre la Clínica Mayo y el GFM que incluía 466 pacientes con LMMC (Patnaik *et al.*, 2014b). Las variables estudiadas fueron las mismas que se recogieron para el modelo de la Clínica Mayo, con la adición de las mutaciones en *SETBP1*. El modelo final incluía los mismos factores de riesgo que el modelo anterior, junto con las mutaciones en *ASXL1* (Tabla 7). La puntuación que se otorgaba a cada factor fue redefinida para este nuevo modelo, al que llamaron *CMML Mayo Molecular Model* (MMM). En el MMM se distinguían 4 grupos de riesgo: bajo riesgo (0 puntos; SG de 97 meses), intermedio-1 (≤ 2 puntos; SG de 59 meses), intermedio-2 (2,5-4,5 puntos; SG de 31 meses) y alto riesgo (≥ 5 puntos; SG de 16 meses).

2.8.5. Molecular CMML-specific prognostic scoring system

Poco después del MMM, y siguiendo la misma línea de este modelo, Elena y cols. publicaron una revisión del CPSS que incluía datos moleculares, el CPSS-Mol (Elena *et al.*, 2016). Este estudio se llevó a cabo con datos de pacientes con LMMC de varios centros europeos y consistía en una cohorte de estudio de 214 pacientes y una cohorte de validación de 260 pacientes. Para el desarrollo del CPSS-Mol, se diseñó previamente un índice genético específico para la LMMC que incluía variables citogenéticas y moleculares. Las variables que puntuaban para este índice genético eran las mutaciones de *ASXL1* (1 punto), *NRAS* (1 punto), *SETBP1* (1 punto), *RUNX1* (1 punto) y los tres grupos de riesgo citogenético definidos previamente por el GESMD (1 punto para el riesgo intermedio y 2 puntos para el alto riesgo). Este score genético parecía funcionar mejor que el primer score citogenético propuesto por el grupo (Such *et al.*, 2011). En el modelo final del CPSS-Mol, las variables incluidas fueron el porcentaje de blastos en MO, el recuento de leucocitos, la dependencia transfusional y el riesgo según el índice genético desarrollado (Tabla 7). El CPSS-Mol distinguía 4 grupos con diferencias en la SG y el riesgo de progresión a LMA: bajo riesgo (0 puntos; SG no alcanzada), intermedio-1 (1 punto; SG de 37 meses), intermedio-2 (2-3 puntos; SG de 18 meses) y alto riesgo (≥ 4 puntos; SG de 18 meses).

Tabla 7. Principales índices pronósticos en la LMMC

Índice	Subtipo OMS / Blastos MO (%)	Subtipo FAB / Leucocitos (x10 ⁹ /L)	Anemia / Hb (g/dL)	Plaquetas (x10 ⁹ /L)	IMC circulantes	Monocitos (x10 ⁹ /L)	Edad (años)	Citogenética	Molecular	
CMML-specific scoring system^a										
LMMC-1	0	LMMC-MD	0	Sin DT	0			Bajo	0	
LMMC-2	1	LMMC-MP	1	Con DT	1			Int	1	
								Alto	2	
GFM CMML prognostic Model^b										
	≤15	0	Sin anemia	0	≥100	0	≤65	0	ASXL1 wt	0
	>15	3	Con anemia	2	<100	2	>65	2	ASXL1 mut	2
Mayo prognostic Model for CMML										
			≥10	0	≥100	0	No	0	≤10	0
			<10	1	<100	1	Sí	1	>10	1
Mayo Molecular Model										
			≥10	0	≥100	0	No	0	≤10	0
			<10	2	<100	1,5	Sí	2	>10	2
Molecular CPSS^c										
<5	0	<13	0	Sin DT	0			Bajo	0	
>5	1	≥13	1	Con DT	1			Int-1	1	
								Int-2	2	
								Alto	3	

Abreviaturas: DT: dependencia transfusional; FAB: Grupo Franco-Americano-Británico; Hb: hemoglobina; IMC: células inmaduras mieloides; Int: intermedio; MO: médula ósea; mut: mutado OMS: Organización Mundial de la Salud; wt: *wild-type* (no mutado).

^aEn el CPSS: la dependencia transfusional se define como tener al menos 1 transfusión de eritrocitos cada 8 semanas durante más de 4 meses; Los grupos citogenéticos de riesgo se definen de acuerdo con Such *et al.*, 2011.

^bEn el *GFM Model*: la anemia se define como Hb <10 g/dL en mujeres y < 11 g/dL en hombre.

^cEn el CPSS-Mol: los grupos de riesgo genético incluyen datos citogenéticos y moleculares y se definen de acuerdo con Elena *et al.*, 2016.

2.9. Tratamiento

Debido a la heterogeneidad clínica de la LMMC, la evaluación del pronóstico de cada paciente es esencial para la toma de decisiones clínicas. El objetivo del tratamiento debería adaptarse al riesgo individual, con intención paliativa en la LMMC de bajo riesgo y curativa en la LMMC de alto riesgo. Dadas las similitudes con los SMD y las NMP, el enfoque terapéutico de los pacientes con LMMC y la evaluación de la respuesta se extrapolan generalmente de estas enfermedades.

De forma muy general, podemos dividir las estrategias terapéuticas en tratamiento de soporte y terapias intensivas o dirigidas, incluyendo el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Figura 7). El objetivo del tratamiento de soporte es paliar la sintomatología que presenta el paciente y que suele ser consecuencia de las citopenias, en la variante mielodisplásica, y de la leucocitosis en la variante mieloproliferativa. El tratamiento de soporte se indica en pacientes de bajo riesgo y en pacientes que, o bien no son candidatos a recibir tratamientos más intensivos, o bien este tipo de tratamientos han fracasado. La terapia dirigida suele ser el tratamiento de elección en pacientes de alto riesgo o con una enfermedad progresiva. En pacientes no candidatos a recibir tratamiento se aconseja la monitorización cada tres meses, mediante un hemograma completo, para controlar si el paciente muestra signos de progresión de la enfermedad (Xicoy *et al.*, 2012; Onida *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2014a; McCullough and Patnaik, 2015; Solary and Itzykson, 2017).

2.9.1. Manejo de las citopenias

El tratamiento de elección en los pacientes que presentan una o más citopenias es el tratamiento de soporte (Figura 7). Los pacientes con anemia sintomática se tratan mediante la transfusión de concentrados de hematíes (CH) (Xicoy *et al.*, 2012). El paciente con dependencia transfusional es aquel que, por necesidad, recibe al menos 1 transfusión de CH cada 8 semanas durante un periodo mínimo de 4 meses (Such *et al.*, 2013). Adicionalmente, se puede considerar el uso de agentes estimuladores de la eritropoyesis (AEE), como la eritropoyetina (EPO), que pueden ser de primera generación (EPO alfa, EPO beta o EPO delta) o de segunda generación (darbepoetina). Según algunos estudios que incluyen pacientes con SMD de bajo riesgo y LMMC-MD, la tasa de respuesta a los AEE varía entre el 30-60%, con una mediana de duración de la respuesta de 24 meses (Hellström-Lindberg, 1995; Jädersten *et al.*, 2005; Moyo *et al.*, 2008). En un estudio retrospectivo realizado exclusivamente en pacientes con LMMC, un 64% de los pacientes presentaron una respuesta eritroide, asociada a una supervivencia superior, y un 31% adquirieron independencia transfusional (Xicoy *et al.*, 2016). En este estudio, los niveles de EPO basal y el grupo de riesgo según el CPSS fueron predictores de respuesta a los AEE.

La neutropenia grave se suele tratar con factores estimulantes de colonias de granulocitos-monocitos (G-CSF), para evitar las infecciones recurrentes. Este tipo de factores debe usarse con precaución en pacientes con una enfermedad proliferativa, dado el riesgo de rotura esplénica (Patnaik *et al.*, 2014a).

Para el tratamiento de la trombocitopenia grave, algunos estudios en SMD y en algún caso puntual de LMMC, apuntan a que el tratamiento con eltrombopag, un receptor agonista de la trombopoyetina, podría ser eficaz en algunos pacientes (Modi *et al.*, 2015; Platzbecker *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016a; Ramadan *et al.*, 2016).

2.9.2. Enfoque terapéutico de la enfermedad proliferativa

La quimioterapia citotóxica o citoreductora es el tratamiento de elección para la mayoría de pacientes con LMMC mieloproliferativa que presentan hiperleucocitosis, esplenomegalia o síntomas constitucionales importantes (Figura 7). Aunque la quimioterapia no parece ser curativa en una proporción sustancial de pacientes ni ha demostrado alterar la historia natural de la enfermedad, puede controlar de forma temporal las visceromegalias y la leucocitosis (Xicoy *et al.*, 2012). La hidroxiurea, un agente mielodepresor, es el primer tratamiento de elección en la LMMC con sintomatología mieloproliferativa (Onida *et al.*, 2013). En uno de los primeros ensayos aleatorizados publicados en LMMC, la hidroxiurea fue superior al etopósido oral en términos de respuesta (60% vs. 36%), tiempo de respuesta (1,2 vs. 3,5 meses) y SG (20 vs. 9 meses) (Wattel *et al.*, 1996). Otros agentes mielosupresores, como la citarabina a dosis bajas, con o sin ácido trans retinoico, el topotecan, la 9-nitro-camptotecina o el agente lonafarnib, han sido evaluados en diversos ensayos clínicos para el tratamiento de la LMMC (Gerhartz *et al.*, 1994; Cambier *et al.*, 1996; Beran *et al.*, 1998, 1999; Venditti *et al.*, 2000; Quintas-Cardama *et al.*, 2006; Feldman *et al.*, 2008). En general, las tasas de respuesta de estos agentes fueron bajas y la mayoría de tratamientos se asociaron a toxicidades significativas. Ruxolitinib, un inhibidor de la vía JAK/STAT, también ha demostrado su eficacia en pacientes con LMMC mieloproliferativa, especialmente en la mejoría de los síntomas derivados de la mieloproliferación. Un ensayo fase-I con este fármaco demostró una tasa de respuesta del 35%, con una reducción de la esplenomegalia en el 56% de los pacientes y una reducción de los niveles de citoquinas inflamatorias (Padron *et al.*, 2016).

2.9.3. Agentes hipometilantes

Los agentes hipometilantes (HMA) 5-azacitidina (AZA) y decitabina (DEC) han sido aprobados para el tratamiento de pacientes con SMD de alto riesgo, tras demostrarse su eficacia y seguridad (Silverman *et al.*, 2002; Kantarjian *et al.*, 2006). Desde entonces, numerosos ensayos en fase-II han evaluado la eficacia de estos fármacos en pacientes con LMMC (Aribi *et al.*, 2007; Wijermans *et al.*, 2008; Braun *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2011; Garcia-Manero *et al.*, 2011; Thorpe *et al.*, 2012; Fianchi *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2013). En estos ensayos, la respuesta global varía

del 25 al 70%, con una SG de entre 12 y 37 meses. El tratamiento con HMA se recomienda en pacientes con LMMC y elevado número de blastos, de forma integrada con el tratamiento de soporte (Figura 7) (Onida *et al.*, 2013). El uso de AZA y DEC en la LMMC ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. De forma más restrictiva, la Agencia Europea de medicamentos ha aprobado el uso de AZA para el tratamiento de la LMMC-2 en ausencia de rasgos mieloproliferativos (Onida *et al.*, 2013). AZA y DEC son inhibidores de las ADN metiltransferasas y, aunque su mecanismo de acción en los SMD y los SMD/NMP es controvertido, sí se sabe que se incorporan al ADN durante la fase S del ciclo celular, donde atrapan de forma covalente las metiltransferasas y promueven su degradación en el proteasoma (Ghoshal *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2010). Algunos predictores de respuesta a HMA propuestos en pacientes con LMMC incluyen la duplicación de la cifra de plaquetas tras el primer ciclo de AZA, la expresión baja de los genes *CJUN* y *CMYB* y las mutaciones de *TET2* (Braun *et al.*, 2011; van der Helm *et al.*, 2011; Bejar *et al.*, 2014). Los inhibidores de histonas desacetilasas juegan un papel en la regulación epigenética, por lo que se han usado en combinación con HMA o con agentes inmunomoduladores, como la lenalidomida, bajo la hipótesis de un supuesto efecto sinérgico (Siitonen *et al.*, 2007; Thurn *et al.*, 2011; McCullough and Patnaik, 2015). Aun así, no existen estudios concluyentes que demuestren una mejoría frente a los tratamientos ya aprobados en la LMMC.

2.9.4. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es la única opción con capacidad curativa para los pacientes con LMMC. Sin embargo, dada la edad avanzada de la mayoría de pacientes, esta opción terapéutica es inviable en muchos casos. Además, el alo-TPH se asocia a numerosas complicaciones, como, la mortalidad no asociada a la recaída, la enfermedad de injerto contra receptor aguda, y la recaída de la enfermedad en el periodo post-trasplante (Onida *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2014a). No existen estudios prospectivos que analicen los beneficios y riesgos del alo-TPH en la LMMC. En estudios retrospectivos, la mayoría de los cuales corresponden a la experiencia de una sola institución, la tasa de respuesta se sitúa entre el 17-50%, la mortalidad asociada al trasplante es del 12-52%, la tasa de SLP a largo plazo varía entre el 18-40%, mientras que la tasa de recaída va del 27-48% (Kröger *et al.*, 2002; Mittal *et al.*, 2004; Kerbauy *et al.*, 2005; Elliott *et al.*, 2006; Ocheni *et al.*, 2009; Krishnamurthy *et al.*, 2010; Eissa *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013; Symeonidis *et al.*, 2015). Los resultados globales de estos estudios indican un manifiesto exceso de mortalidad (Cheng *et al.*, 2012). La edad avanzada, las comorbilidades, las alteraciones citogenéticas de alto riesgo y el grado de anemia se han asociado a una mayor mortalidad y una menor supervivencia libre de recaída (Krishnamurthy *et al.*, 2010; Eissa *et al.*, 2011). El alo-TPH es la opción terapéutica recomendada para pacientes menores de 60 años con LMMC de alto riesgo que requieran tratamiento (Figura 7). El alo-TPH puede ir precedido de otros tratamientos, según la manifestación clínica de la enfermedad. En la LMMC-MP con elevado número de blastos, el

alo-TPH debería ir precedido de tratamiento citoreductor, mientras que en la LMMC-MD debería considerarse tratamiento con AZA previo al alo-TPH (Onida *et al.*, 2013). Aun así, no se conoce el momento óptimo para la realización del alo-TPH, la necesidad y mejor opción para reducir la enfermedad antes del alo-TPH, ni la fuente de progenitores hematopoyéticos y regímenes ideales (Xicoy *et al.*, 2012).

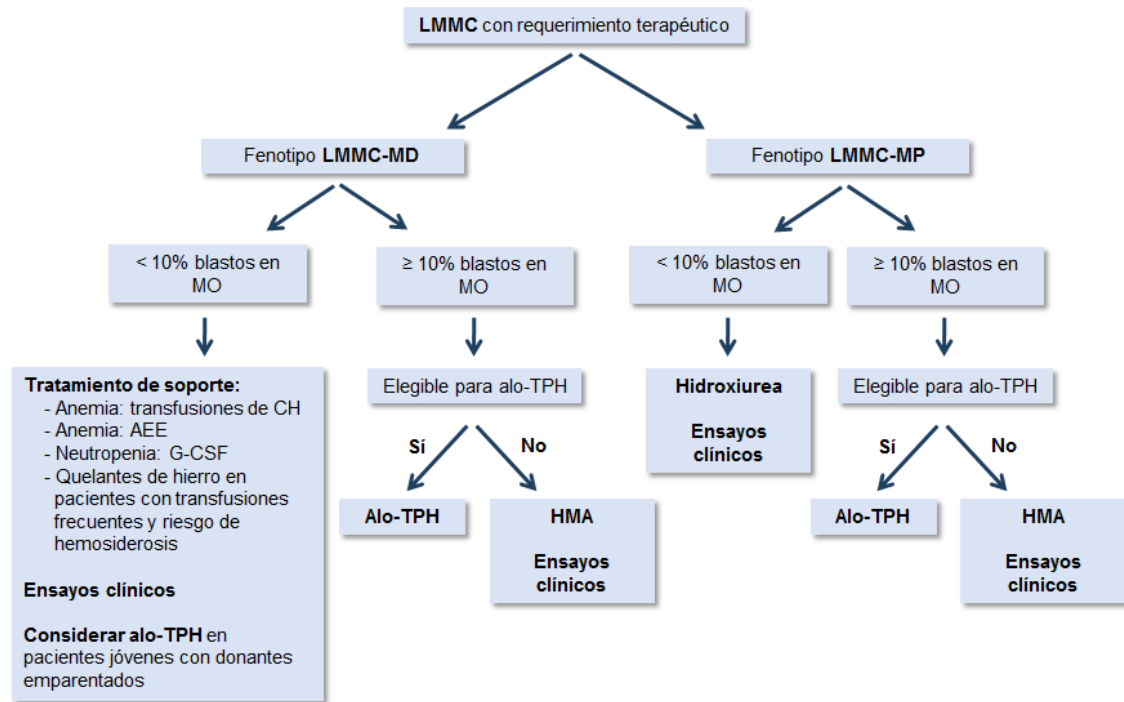


Figura 7. Algoritmo del tratamiento en la LMMC. Adaptación de Patnaik y cols. (Patnaik *et al.*, 2014a).

Abreviaturas: AEE: agentes estimulantes de la eritropoyesis; alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; CH: concentrados de hemáticas; G-CSF: factor de crecimiento de granulocitos; HMA: agentes hipometilantes (5-azacitidina y decitabina); MO: médula ósea.

3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO Y EPIGENÉTICO DE LA LMMC

3.1. Citogenética convencional y FISH

La citogenética es el campo de la genética que comprende el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas. La **citogenética convencional (CC)** es la técnica que permite estudiar los cromosomas según su tamaño y forma. Éstos se encuentran constituidos básicamente de un centrómero, que divide el cromosoma en un brazo corto (brazo p) y uno largo (brazo q). Según la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican en metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos y telocéntricos. El tamaño de los cromosomas

varía a lo largo del ciclo celular, pasando de estar muy poco compactados (interfase) a muy compactados (metafase). El estudio por CC se realiza en células en metafase (durante la división celular o mitosis) y da lugar al cariotipo, que es la ordenación de los cromosomas según su tamaño y patrón de bandas. Las técnicas de bandeo, desarrolladas a finales de los años 60, tiñen los cromosomas de forma diferencial y definen un patrón que se visualiza por microscopía. El cariotipo está constituido por 22 pares de cromosomas autosómicos (1-22) y dos cromosomas sexuales (X e Y). Mediante la CC se pueden detectar alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales con una resolución aproximada de 10 Mb.

Existen diferentes técnicas de bandeo de cromosomas. Las técnicas para la obtención de patrones de bandas específicos incluyen el bandeo por Quinacrina (bando-Q), bandeo con Giemsa (bando-G) y el bandeo de inversión (bando-R). Otras técnicas tiñen porciones específicas del cromosoma, como el bandeo-C, que tiñe la heterocromatina estructural, o la tinción NOR (de la zona del organizador nucleolar), que resalta los satélites y los brazos de los cromosomas acrocéntricos. La técnica más extendida para el estudio del cariotipo en las neoplasias hematológicas es la tinción de bandas G, que produce un patrón de bandas claras (ricas en nucleótidos GC y con un gran contenido de genes) y bandas oscuras (ricas en nucleótidos AT y pobres en genes).

La CC se ha convertido en un test de rutina en las neoplasias hematológicas, ya que la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas puede tener valor diagnóstico, pronóstico, e incluso puede ayudar a predecir la respuesta a determinados tratamientos. La CC en la LMMC, así como en la mayoría de neoplasias hematológicas, se realiza con la muestra obtenida del aspirado de MO. Los principales pasos de la técnica de CC incluyen: la obtención de un cultivo rico en metafases a partir de la muestra de MO, la fijación de las células y extensión en un portaobjetos, la tinción de bandas G y el análisis bajo un microscopio óptico (Figura 8). Se recomienda analizar un mínimo de 20 metafases y describir el cariotipo siguiendo la nomenclatura del sistema ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) (Shaffer *et al.*, 2013). Las limitaciones de esta técnica incluyen su baja sensibilidad (alrededor del 10%), su limitada resolución (aproximadamente 10Mb) y la necesidad de obtener células en división para realizar el análisis. Las características citogenéticas de la LMMC se han descrito en el apartado 2.6.

La **hibridación *in situ* fluorescente (FISH)** es una técnica de citogenética molecular que permite detectar y localizar secuencias específicas de ADN y ARN sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido. Se basa en la hibridación de una sonda de ADN fluorescente a una secuencia complementaria de la muestra de estudio y la posterior visualización bajo un microscopio de fluorescencia. La técnica de FISH es una técnica complementaria a la CC, ya que puede ayudar en la identificación de alteraciones crípticas que no pueden ser detectadas mediante CC. Permite la detección de alteraciones numéricas y estructurales con mayor resolución que la CC, es más sensible, no requiere células en metafase y puede ayudar a identificar cromosomas marcadores. Sin embargo, no permite obtener una

visión global del genoma, como con la CC, ya que requiere un ensayo específico para cada región que se quiera estudiar.

Aunque no es la técnica de elección para el estudio citogenético de la LMMC, puede resultar útil como complemento a la CC y, especialmente, en casos sin metafases (cultivos de CC sin crecimiento) ya que permite estudiar, de forma dirigida, las alteraciones más comunes de la LMMC, como la trisomía 8, la monosomía 7 y las deleciones de 7q (Fugazza *et al.*, 1995; VinSheth *et al.*, 2002; Ademà *et al.*, 2013; Saumell *et al.*, 2015).

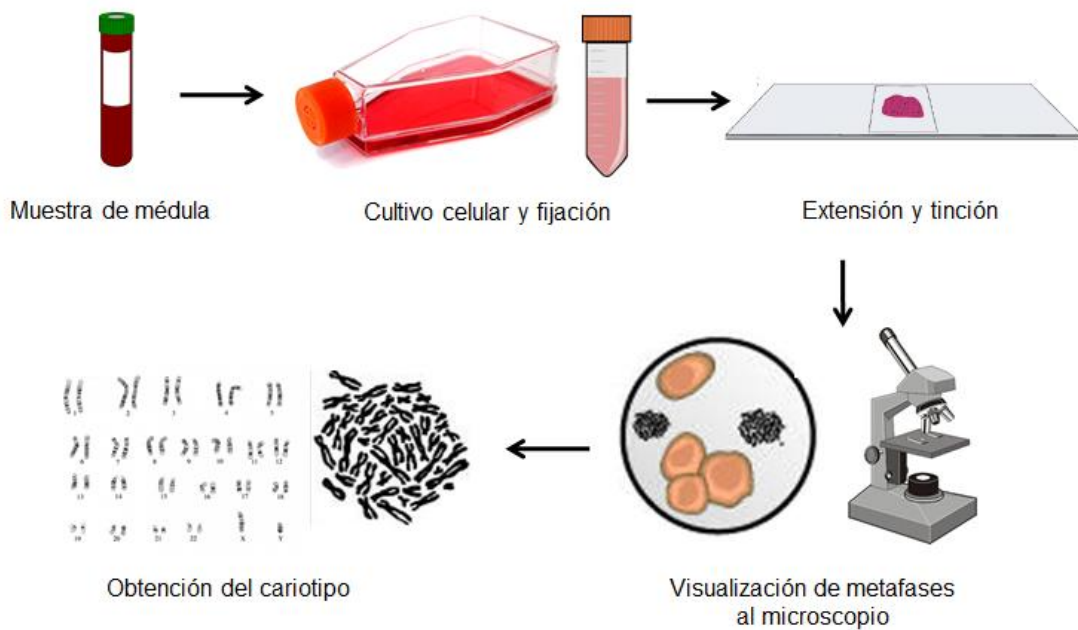


Figura 8. Principales pasos de la citogenética convencional.

3.2. Microarrays genómicos de ADN

Un *microarray* es una ordenación sistemática, generalmente bidimensional (filas y columnas), de material biológico unido a una superficie o sustrato sólido, que puede ser de plástico, vidrio o silicón. En los *microarrays* se combinan métodos de procesamiento en paralelo, de forma multiplexada y miniaturizada, con métodos de detección de alta capacidad (*high-throughput screening*). En función del tipo de bioelemento presente en el *microarray*, se puede distinguir entre *microarrays* genómicos, de expresión, de proteínas, de células o de tejidos.

3.2.1. Fundamento de la técnica

Un **microarray genómico** es una colección de fragmentos de ADN unidos de forma ordenada a una superficie sólida. Su funcionamiento consiste en medir el nivel de hibridación entre estos

fragmentos de ADN (que actúan como sondas específicas) y el ADN presente en la muestra de estudio (ADN diana). Existen dos tipos de *microarrays* genómicos: los *microarrays* de hibridación genómica comparada (*comparative genomic hybridization arrays*, CGHa) y los de SNP (*single nucleotide polymorphism arrays*, SNP-A).

Los **CGHa** son una evolución de la técnica de hibridación genómica comparada, que permite la detección de variaciones en el número de copias de ADN (*copy number variations*, CNVs). Esta técnica, desarrollada a finales de los años 90, se basa en la hibridación competitiva entre un ADN de estudio (tumoral) y un ADN control (normal, diploide), marcados con fluorocromos distintos. En esta competición, los desequilibrios debidos a las diferencias en el número de copias dan lugar a una desviación en el espectro fluorescente. En los CGHa la hibridación tiene lugar sobre un soporte sólido o chip que contiene miles o millones de sondas (oligonucleótidos) y que permite estudiar CNVs a lo largo del genoma completo, con una resolución de hasta 150-200 Kb y una sensibilidad aproximada del 20% (Gresham *et al.*, 2008; Maciejewski and Mufti, 2008; Maciejewski *et al.*, 2009).

Los **SNP-A**, desarrollados poco tiempo después, son una variación de los CGHa y presentan dos grandes diferencias respecto a éstos. En primer lugar, en los SNP-A no hay una competición entre muestras, ya que cada muestra se hibrida por separado en un chip individual y, posteriormente, se comparan los resultados obtenidos. En segundo lugar, los SNP-A contienen dos tipos de sondas, unas para el estudio de CNVs y otras que permiten el estudio de determinados SNPs. Gracias a la combinación de estas sondas, que cubren la mayor parte del genoma, los SNP-A permiten tanto la detección de CNVs como la identificación de regiones con pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*, LOH), mediante el estudio del genotipo por las sondas de SNPs. Las regiones con LOH son regiones diploides en homocigosis que pueden resultar de una disomía uniparental (*uniparental disomy*) heredada, no clonal y generalmente irrelevante a nivel clínico, o bien somática, adquirida mediante recombinación mitótica o mediante el reemplazamiento de un fragmento perdido debido a una delección segmental. Además, los SNP-A permiten estimar el nivel de mosaicismo presente en la muestra de estudio. Como en los CGHa, el nivel de resolución dependerá de la densidad de sondas en los *arrays*, de la distribución de éstas y de los algoritmos utilizados para el análisis. Los SNP-A permiten la detección de alteraciones con una resolución de hasta 10 Kb y con una sensibilidad aproximada del 20% (Gresham *et al.*, 2008; Maciejewski and Mufti, 2008; Maciejewski *et al.*, 2009). Además, en los SNP-A, así como en los CGHa, no se requieren células en división para llevar a cabo el estudio.

Se han desarrollado numerosos SNP-A, que varían en la densidad de sondas y que cada vez aumentan en precisión analítica. Las plataformas de SNP-A más comunes son la de Illumina (BeadArray) y la de Affymetrix (GeneChip), esta última utilizada en la presente tesis (Gunderson *et al.*, 2005; Syvänen, 2005).

La plataforma de Affymetrix incluye dos tipos de SNP-A que se diferencian en la densidad de sondas, los *arrays* Cytoscan 750K y Cytoscan HD. Este último es un *array* de alta densidad con

2,67 millones de marcadores, incluidas 750.000 sondas de SNP y 1,9 millones de sondas no polimórficas. La técnica de SNP-A para la plataforma de Affymetrix, así como para la mayoría de plataformas de SNP-A, incluye los siguientes pasos: digestión del ADN genómico con un enzima de restricción, ligación de adaptadores para la posterior unión de *primers* universales, amplificación por PCR (*polymerase chain reaction*) mediante *primers* específicos de los adaptadores, purificación del producto de PCR y cuantificación por espectrofotometría, fragmentación del ADN, marcaje con biotina, hibridación en el *array*, lavados y tinción con fluorescencia del *array*, escaneado del *array* y obtención de las imágenes con intensidades de fluorescencia, análisis de los resultados (Figura 9). Posteriormente, el análisis de las señales de fluorescencia, mediante un algoritmo específico, permite la identificación de los CNVs y de las regiones con LOH (Figura 9).

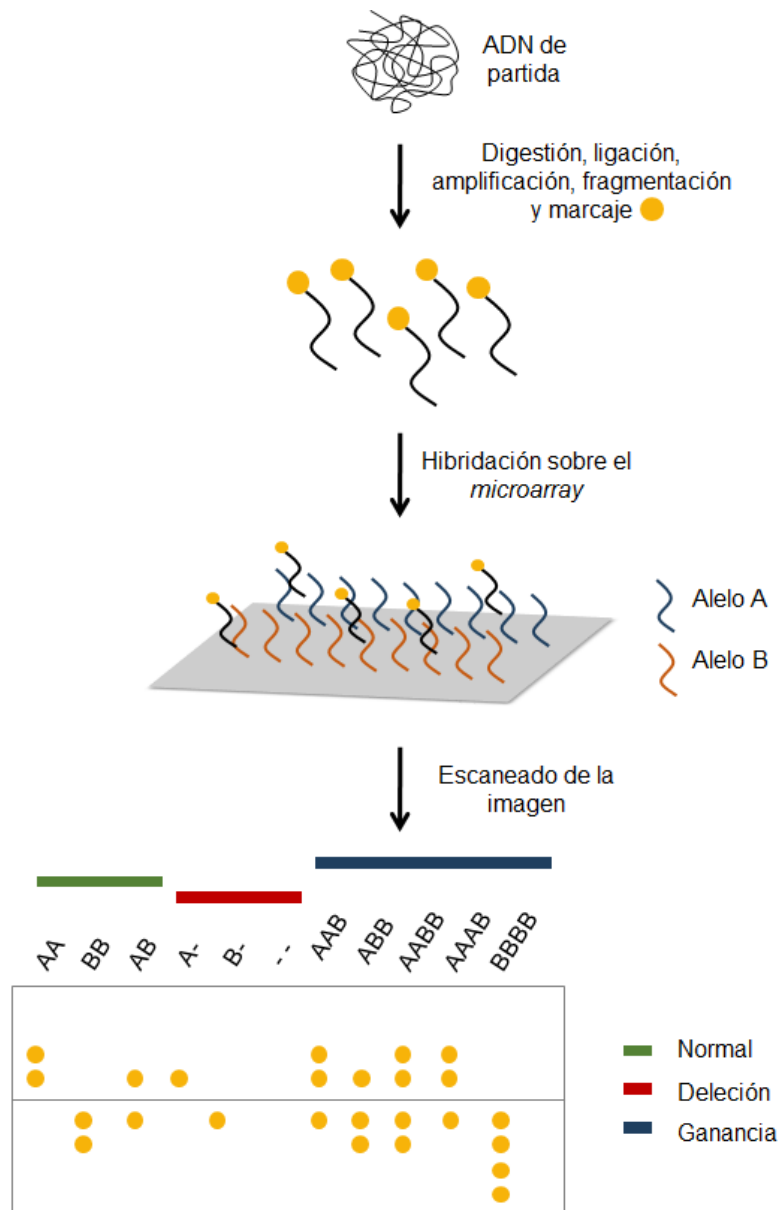


Figura 9. Pasos incluidos en la técnica de SNP-A.

3.2.2. Estudios de microarrays genómicos en la LMMC

Las técnicas de CGHa y SNP-A se han aplicado en numerosas neoplasias hematológicas, incluidos los SMD y la LMMC. Los primeros estudios en identificar ganancias y pérdidas crípticas (no detectables por CC) en pacientes con LMMC, fueron publicados por Gelsi-Boyer y cols., y consistían en estudios genómicos basados en la aplicación de CGHa (Gelsi-Boyer *et al.*, 2008, 2009, 2010). Dos de estos estudios detectaron alteraciones en el número de copias (CNAs) en una pequeña proporción de pacientes con LMMC (7/29 y 9/51, respectivamente), pero ninguno de éstos era recurrente (Gelsi-Boyer *et al.*, 2008, 2010). La implicación de estas alteraciones se desconocía, sin embargo, estos estudios sirvieron para la identificación de genes candidatos localizados en las zonas afectadas por CNAs, como *RUNX1* y *ASXL1*, que luego demostraron jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad.

Con el desarrollo de los SNP-A, esta técnica empezó a aplicarse en numerosas series de pacientes con SMD (Gondek *et al.*, 2007, 2008; Mohamedali *et al.*, 2007; Heinrichs *et al.*, 2009; Tiu *et al.*, 2011; Mallo *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013). Algunos de estos estudios incluían pacientes con LMMC, pero el número de casos estudiados era limitado (24, 54 y 9 pacientes, respectivamente) y las series eran heterogéneas (Gondek *et al.*, 2008; Tiu *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2013). Gondek y cols. identificaron alteraciones mediante SNP-A en un 75% (35/47) de pacientes con SMD/NMP, incluyendo un 35% de regiones con LOH, pero no analizaron los pacientes con LMMC de forma independiente (Gondek *et al.*, 2008). Tiu y cols. analizaron el impacto pronóstico de las alteraciones detectadas por SNP-A en una serie de 430 pacientes con SMD (n=250), SMD/NMP (n=95, incluyendo 54 LMMC y 41 SMD/NMP-I) y LMA secundaria a SMD (n=85) (Tiu *et al.*, 2011). En esta serie se detectaron alteraciones mediante SNP-A en el 75% de pacientes con SMD/NMP, pudiéndose detectar alteraciones cromosómicas en un porcentaje mucho mayor en comparación con la CC (38%). En cuanto al valor pronóstico, la presencia y el número de alteraciones detectadas por SNP-A se asociaron a una SG y supervivencia libre de enfermedad inferiores en la serie global. De nuevo, el subgrupo de pacientes con LMMC no se analizó de forma independiente.

De forma global, los estudios de *microarrays* genómicos publicados confirman la presencia de alteraciones cromosómicas (incluyendo alteraciones detectadas por CC, CNAs crípticas y LOH) en una gran proporción (75%) de pacientes con LMMC, aunque con un impacto pronóstico desconocido.

3.3. Técnicas de secuenciación del ADN

Las técnicas de **secuenciación del ADN** incluyen todos aquellos métodos cuyo objetivo es la determinación del orden de nucleótidos (A, C, G, T) en un fragmento de ADN. Los primeros métodos de secuenciación directa del ADN se desarrollaron durante la década de los 70 y fueron adoptados en la gran mayoría de laboratorios, dado que los métodos descritos hasta el

momento consistían en una secuenciación indirecta (a partir de ARN), eran muy complejos y tenían una aplicabilidad muy limitada. En 1975 Sanger y Coulson desarrollaron el primer método de secuenciación directa, denominado “más-menos” (*plus and minus*), que utilizaba las polimerasas de los organismos *E. coli* y el bacteriófago T4 (Sanger and Coulson, 1975). Este método tenía una baja eficiencia y fue rápidamente sustituido por el método de Maxam-Gilbert, publicado en 1977 y basado en la modificación química del ADN y posterior escisión de bases específicas (Maxam and Gilbert, 1977). Sin embargo, Sanger y cols. publicaron ese mismo año un nuevo método, el método de los “dideoxynucleótidos” o de “terminación de cadena”, que revolucionó la tecnología de secuenciación del ADN, dejando en desuso con el tiempo al método de Maxam-Gilbert (Sanger *et al.*, 1977). En 1980, se le concedió el Premio Nobel a Frederick Sanger por el desarrollo de esta técnica, más conocida como el método de Sanger. Este método y sus correspondientes variaciones han dominado el campo de la secuenciación del ADN durante 30 años, hasta la aparición de las técnicas de secuenciación masiva o de segunda generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), desarrolladas a finales de la década de los años 90.

3.3.1. Método de Sanger

El **método de Sanger** ha ido evolucionando con los años, principalmente gracias a una serie de avances desarrollados en los años 80: la invención de la PCR, la introducción de terminadores fluorescentes y el desarrollo de sistemas automatizados de secuenciación (Mullis *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1986). La versión más moderna del método de Sanger, que combina todos estos avances, es la más utilizada. Este método se basa en una reacción de PCR de secuencia, mediante la cual un *primer* se une por complementariedad a una secuencia flanqueante a la región de interés del ADN de estudio (ADN molde). Este ADN molde, que incluye la región de interés, se obtiene previamente por clonación, generalmente mediante una reacción convencional de PCR. Durante la PCR de secuencia, esta región se copia, gracias a un enzima con actividad ADN polimerasa, a través de varios ciclos de desnaturalización, renaturalización y elongación. Durante este proceso, se incorporan dos tipos de nucleótidos a las cadenas de ADN, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), que están en exceso, y los dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTP), que carecen del grupo 3'-hidroxilo (-OH) en la desoxirribosa. Estos últimos, al incorporarse a la cadena de ADN que se está sintetizando, impiden la formación del puente fosfodiéster con el siguiente nucleótido y provocan la terminación de la cadena. Además, están marcados con fluorescencia, según la base a la que corresponden: verde (A, adenina), azul (C, citosina), negro (G, guanina) y rojo (T, timina). De esta forma, se obtienen diferentes cadenas de ADN de distintos tamaños detenidas al azar en un nucleótido fluorescente A, C, G o T. Mediante un sistema automatizado de electroforesis capilar de alta resolución, acoplado a un detector de fluorescencia, las cadenas del producto de la reacción de PCR se ordenan por tamaño. Mediante la identificación, por fluorescencia, de la última base de cada una de estas cadenas, se establece la secuencia del ADN (Figura 10).

Las aplicaciones del método de Sanger incluyen la confirmación de SNPs, la identificación de reordenamientos cromosómicos y la detección de mutaciones (SNVs e indels). Aunque la fiabilidad de la técnica está probada, este método presenta también una serie de limitaciones. En primer lugar, la sensibilidad, ya que solamente permite detectar cambios presentes en más de un 15-20% de la muestra de ADN de partida. Además, es una técnica de bajo rendimiento, ya que cada ensayo permite secuenciar un único fragmento concreto de ADN, de hasta 800 pb. Finalmente, es una técnica costosa, lo cual hace que la secuenciación de paneles multigénicos sea cara y, además, muy laboriosa. A pesar de estas limitaciones el método de Sanger es la técnica *gold standard* para la detección de mutaciones somáticas en muchos campos, incluido el de las neoplasias hematológicas, tanto en investigación como en laboratorios de diagnóstico. En el estudio de la LMMC, esta técnica se utiliza para la detección de mutaciones somáticas. Las mutaciones somáticas de la LMMC se han descrito en el apartado 2.7.

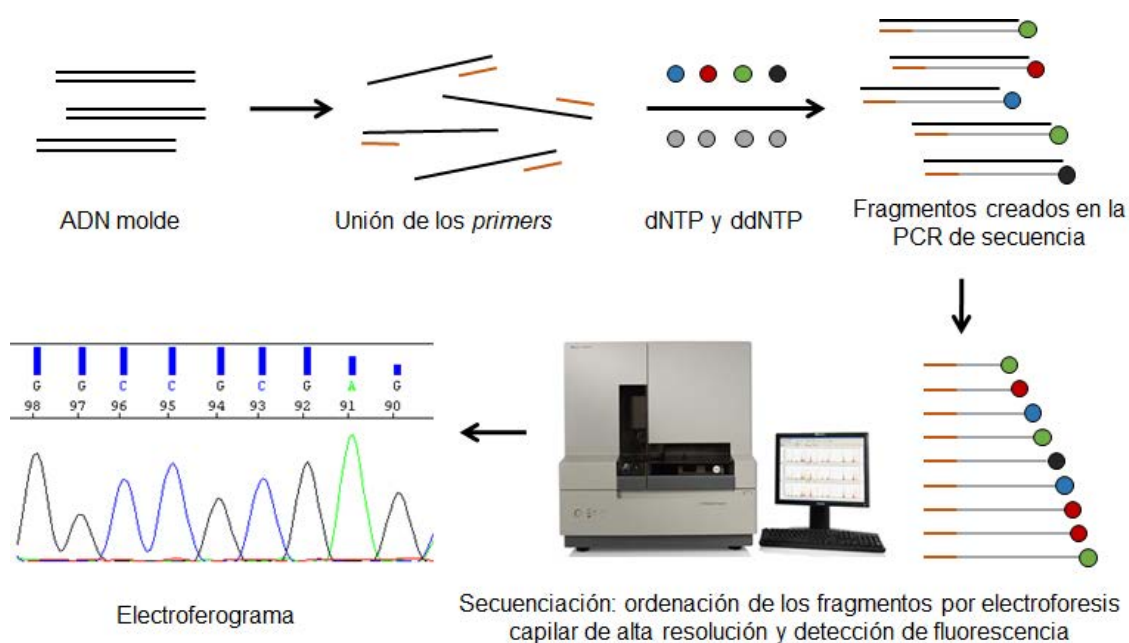


Figura 10. Principales pasos del método de Sanger, incluyendo la PCR de secuencia y el análisis mediante electroforesis capilar de alta resolución.

3.3.2. Técnicas de secuenciación masiva

Las **técnicas de secuenciación masiva o NGS** empezaron a desarrollarse a finales de la década de los 90 y han generado un gran impacto en el campo de la genómica. Utilizan métodos de alto rendimiento capaces de paralelizar millones de reacciones de secuenciación a la vez. Proporcionan numerosas ventajas respecto a los métodos tradicionales, principalmente su elevada sensibilidad y su gran rendimiento, que permite procesar a la vez millones de fragmentos y así secuenciar grandes regiones de ADN en un único experimento. En cada ensayo se generan millones de secuencias o lecturas que corresponden a distintos fragmentos

del ADN de partida. La sensibilidad es variable y dependerá de la profundidad a la cual se secuencie la muestra de ADN, es decir, del número de lecturas que se generen para cada una de las bases del ADN de partida. El desarrollo de estas técnicas ha tenido lugar gracias a la mejora en la química de las reacciones de secuenciación, así como al avance en los métodos de detección. Algunos de éstos incluyen la pirosecuenciación (detección de radiación emitida), la secuenciación por síntesis (detección de fluorescencia) o por semiconducción (detección de iones de hidrógeno).

Las aplicaciones de la NGS son las mismas que las del método de Sanger pero ésta además permite, en algunos casos, estudiar cambios en el número de copias y regiones con pérdida de heterocigosidad. Existen tres niveles de secuenciación del ADN por NGS: la secuenciación del genoma, la secuenciación del exoma y la secuenciación dirigida. Esta última consiste en secuenciar un panel determinado de genes o regiones seleccionadas, generalmente relacionados con el campo de interés. Todos los métodos de NGS se dividen en tres grandes etapas: la preparación de la muestra (generación de la librería, enriquecimiento y multiplexado), la secuenciación y el análisis de datos (Figura 11).

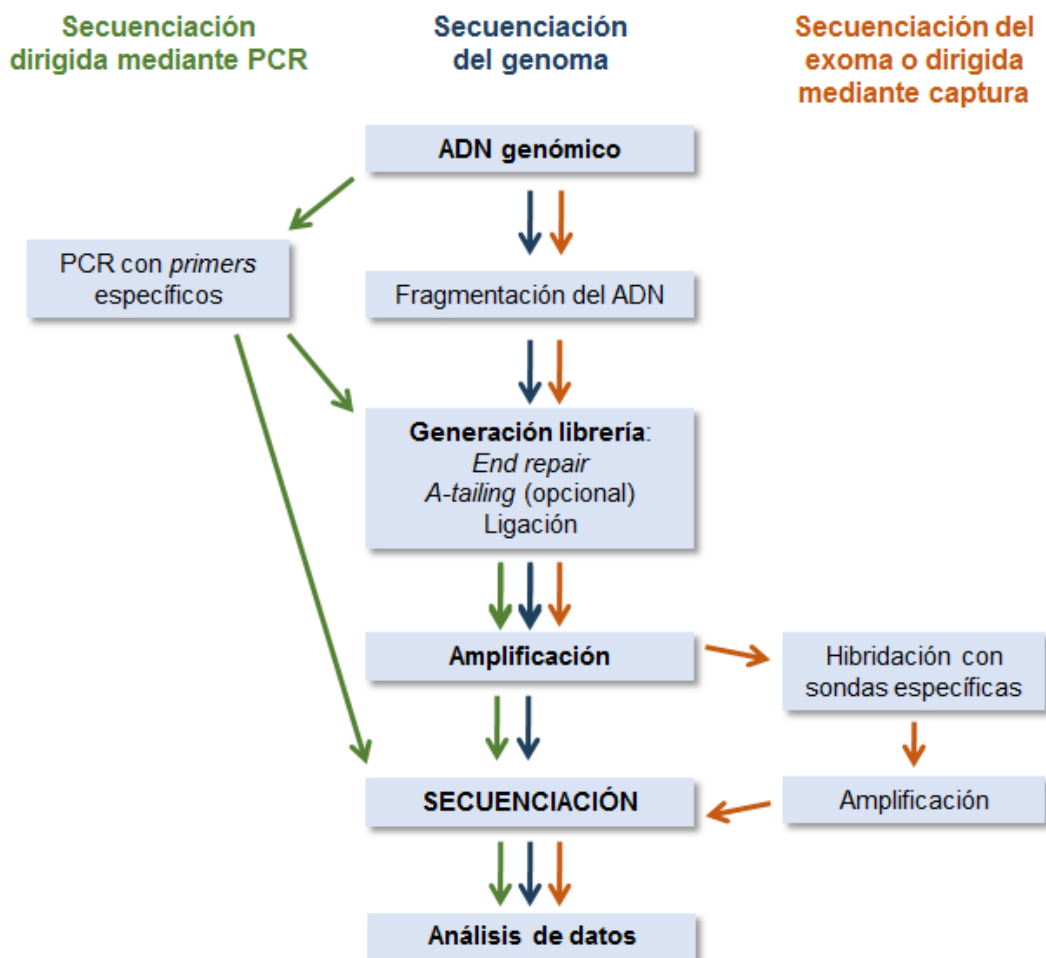


Figura 11. Pasos incluidos en cualquier método de secuenciación del ADN por NGS. Adaptación de Rehm y cols. (Rehm *et al.*, 2013).

A) Preparación de la librería: es el proceso de crear fragmentos de ADN de un tamaño determinado a partir de ADN genómico. Estos fragmentos contienen, en cada uno de sus extremos, una secuencia índice, específica del ADN de partida, y una secuencia adaptadora, específica de la plataforma de secuenciación (Figura 12). La secuencia índice sirve como identificador de la muestra. Durante la preparación de la librería, la generación de fragmentos de ADN puede ser aleatoria, por fragmentación mecánica o enzimática, o puede generarse a partir de una PCR *multiplex* (con varias parejas de *primers* dirigidos a las regiones de interés). Una vez generados estos fragmentos, se ligan los índices y adaptadores en cada extremo. Luego, los fragmentos de la librería se amplifican por PCR.

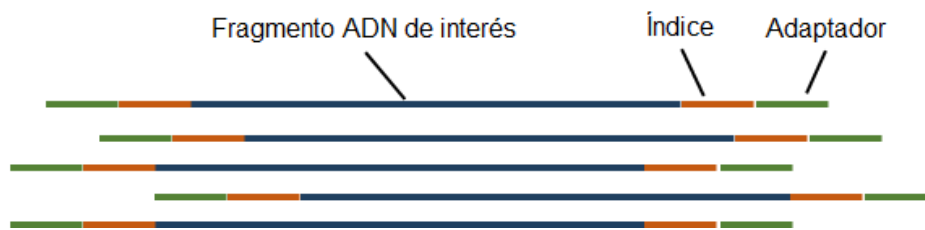


Figura 12. Representación de una librería de ADN.

B) Enriquecimiento en regiones de interés por captura: cuando la fragmentación del ADN se ha hecho de forma aleatoria, se debe enriquecer la muestra en las regiones de interés que se deseen secuenciar. Para ello, las librerías se hibridan con un conjunto de sondas complementarias a dichas regiones. Mediante la captura de estas sondas, la muestra quedará enriquecida en las regiones de interés. Este paso no es necesario para la secuenciación del genoma completo, donde interesa secuenciar todo el ADN genómico de partida.

C) Multiplexado: el multiplexado consiste en juntar varias librerías procedentes de muestras distintas para secuenciarlas a la vez dentro de la plataforma de secuenciación correspondiente. El número de librerías a multiplexar dependerá del tamaño de cada librería, de la capacidad del equipo de secuenciación y de la profundidad a la que se quiera secuenciar cada librería. Gracias a los índices incorporados durante la preparación de las librerías, las secuencias o lecturas generadas por el equipo se podrán asignar a la muestra de partida correspondiente.

D) Secuenciación: la secuenciación se lleva a cabo dentro del equipo o plataforma de secuenciación, donde tienen lugar miles o millones de reacciones químicas en paralelo. Estos equipos contienen una superficie con unos oligonucleótidos a los cuales las librerías se unen a través de los adaptadores. A partir de ahí, el sistema de secuenciación emplea una química u otra para la generación de las secuencias correspondientes a las muestras de ADN partida.

E) Análisis de datos: los métodos de NGS generan un gran volumen de datos por lo que se requiere un soporte bioinformático y una gran potencia a nivel computacional. El análisis de datos de NGS se divide en cuatro niveles. El análisis primario o *base calling* consiste en convertir las señales captadas en el secuenciador en bases nucleotídicas (A, C, T y G) y en

generar las correspondientes secuencias o lecturas. El análisis secundario o alineamiento consiste en alinear o mapear estas secuencias con un genoma de referencia. El análisis terciario o *variant calling* consiste en identificar las diferencias (variantes) entre las secuencias generadas (del ADN de estudio) y el genoma de referencia. El último paso corresponde al anotado y filtrado de variantes, que consiste en anotar toda la información existente de cada una de las variantes (efecto en la proteína, patogenicidad, frecuencia en la población, relevancia clínica, etc.) para luego poder filtrar estas variantes en función de su relevancia en la enfermedad de estudio.

La química del proceso de secuenciación varía según la tecnología empleada. El método utilizado en esta tesis es la secuenciación de Illumina, que es un método de secuenciación por síntesis (*sequencing by synthesis*) (Bentley *et al.*, 2008). Esta tecnología domina la industria y ha sido adoptada como método de NGS por excelencia debido, en parte, a su madurez como tecnología, a la amplia gama de equipos disponibles y a la alta compatibilidad entre éstos. Dentro de los equipos de Illumina tienen lugar dos procesos: la amplificación por puente (*bridge amplification*) y la secuenciación mediante terminación cíclica reversible (*cyclic reversible termination*, CRT) (Goodwin *et al.*, 2016). En la amplificación por puente los fragmentos de las librerías se unen, a través de los adaptadores y por complementariedad, a una serie de oligonucleótidos (*primers*) que se encuentran sobre una superficie plana, llamada *flowcell*, y que sigue un patrón. Mediante PCR se sintetiza *in situ* una segunda cadena desde el primer inmovilizado, mientras que la primera se descarta. El extremo libre de este nuevo fragmento puede interactuar con otro *primer* de la superficie, formando así una estructura de puente. A través de la formación de estas estructuras tipo puente los fragmentos de ADN de la librería se amplifican, formando una serie de *clusters*. Cada *cluster* es un conjunto de fragmentos localizado sobre un punto concreto de la superficie (Figura 13A). A continuación, tiene lugar la secuenciación mediante CRT, donde estos fragmentos sirven de molde para una secuenciación directa basada en la utilización de nucleótidos terminadores reversibles. Estos nucleótidos están marcados con un fluorocromo específico y distinto para cada base. Cada nucleótido que se incorpora a la cadena de ADN que se está sintetizando está bloqueado por un grupo 3'-O-azidometilo, que impide la incorporación de nucleótidos adicionales. De esta forma, los fragmentos incorporan un sólo nucleótido marcado en cada uno de los ciclos, que se visualiza mediante microscopía de fluorescencia de reflexión interna total usando dos o cuatro canales láser. Seguidamente, el fluorocromo se escinde y el 3'-OH se regenera con un agente reductor. Tras esto, el ciclo de adición, elongación y escisión de nucleótidos comienza de nuevo (Figura 13B). Después de estos dos procesos, el secuenciador generará las lecturas o secuencias a partir de las fluorescencias detectadas.

En el ámbito de las neoplasias hematológicas, las técnicas de NGS se utilizan para la detección de mutaciones somáticas. La secuenciación dirigida de un panel de genes previamente descritos en la enfermedad es la variante de NGS más utilizada. La secuenciación del genoma o del exoma es más costosa, su análisis e interpretación de resultados son mucho más

complejos y la relevancia clínica o biológica de la gran mayoría de variantes detectadas por estos métodos se desconoce. La implementación de la secuenciación masiva dirigida en los laboratorios de rutina clínica es un proceso muy complejo. Sin embargo, a la larga acabará posicionándose como técnica de elección, ya que permitirá establecer un perfil molecular propio de cada paciente para así poder ofrecer un tratamiento lo más personalizado posible.

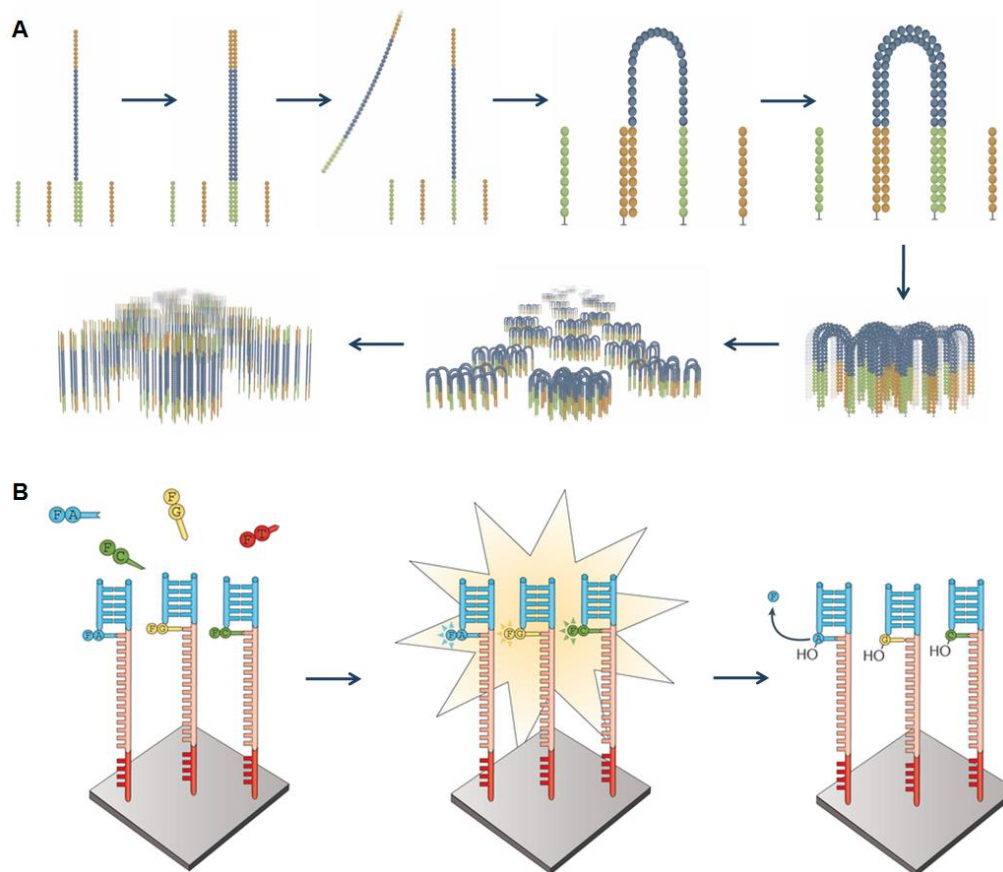


Figura 13. Método de secuenciación de Illumina. **A)** Amplificación por puente y generación de *clusters* sobre una superficie sólida. **B)** Secuenciación cíclica reversible sobre la superficie: adición del nucleótido marcado con fluorescencia, adquisición de la imagen y escisión del fluorocromo con regeneración del grupo hidroxilo (-OH). Adaptación de Goodwin y cols. (Goodwin *et al.*, 2016).

3.4. Metilación del ADN

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que juega un papel muy importante en el control de la expresión génica y la arquitectura del núcleo celular. La principal modificación epigenética en los humanos es la metilación de los nucleótidos de citosina, es decir, la adición de un grupo metilo (-CH₃) a un nucleótido de citosina (C) que da lugar a la 5'-metil-citosina (5mC) (Figura 14A). La metilación tiene lugar, principalmente, en las citosinas que preceden a

las guaninas, en los denominados dinucleótidos CpG. Los sitios CpG no se distribuyen de forma aleatoria en el genoma, sino que la mayoría de veces se concentran en regiones conocidas como islas CpG, ricas en estos dinucleótidos. En la célula normal, la mayoría de islas CpG se encuentran desmetiladas. Las islas CpG se distribuyen en las regiones reguladoras de muchos genes. Aproximadamente la mitad de las regiones promotoras de genes contienen islas CpG. Aunque muchas de éstas se asocian con genes endógenos (*housekeeping*), algunas están localizadas en los promotores de genes específicos de tejidos. La metilación del ADN generalmente actúa para reprimir la transcripción génica, ya que la metilación de las islas CpG localizadas en un promotor conlleva el silenciamiento del gen correspondiente (Figura 14B). En la célula sana, los patrones de metilación del ADN se conservan a través de las divisiones celulares, permitiendo la expresión de genes específicos y necesarios para ese determinado tipo celular. La metilación del ADN es esencial para el desarrollo normal de la célula y se asocia con una serie de procesos clave, incluyendo la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X, la represión de elementos repetitivos, el envejecimiento y la carcinogénesis (Antequera and Bird, 1999; Esteller, 2003, 2008; Weber *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010).

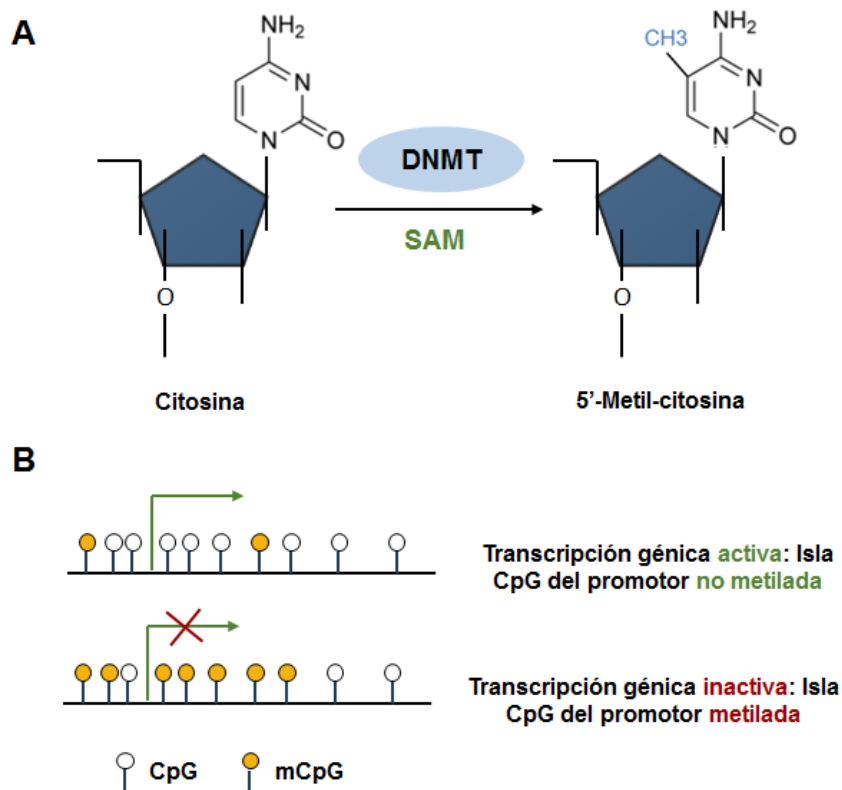


Figura 14. Mecanismo de metilación del ADN. **A)** Metilación del carbono 5 del nucleótido de citosina. **B)** La metilación de las islas CpG localizadas en los promotores de los genes conllevan la inactivación de la expresión del gen correspondiente.

Abreviaturas: DNMT: ADN metiltransferasa; CpG: dinucleótido CpG; mCpG: dinucleótido CpG metilado; SAM: S-adenosil-metionina.

En comparación con las células normales, las células tumorales presentan una hipometilación global del ADN acompañada por la metilación aberrante de islas CpG localizadas en zonas promotoras o en regiones codificantes. La hipermetilación de las islas CpG localizadas en los promotores de TSGs está establecida como un mecanismo de inactivación génica que juega un papel importante durante la carcinogénesis. La hipermetilación no es un mecanismo aislado en el control epigenético, sino que va ligada a otros componentes como las ADN metiltransferasas, las proteínas de unión al dominio metil-CpG, las histona desacetilasas o metiltransferasas y los factores de remodelación de la cromatina. Sin embargo, el conocimiento sobre el grado de especificidad y mecanismo de acción de todas estas capas epigenéticas en el silenciamiento de TSGs concretos permanece incompleto (Esteller *et al.*, 2001; Jenuwein and Allis, 2001; Ballestar and Esteller, 2002; Esteller and Herman, 2002; Feinberg and Tycko, 2004; Chen *et al.*, 2010)

Existen diferentes técnicas para estudiar la metilación del ADN, en función del objetivo que se quiera alcanzar. Los métodos de estudio de la metilación del ADN podemos dividirlos en dos grandes grupos: los métodos para estudiar los niveles de metilación global y los métodos para estudiar la metilación específica de uno o varios locus. En el primer grupo, la cromatografía líquida de alta resolución es el método clásico para cuantificar los niveles de metilación global. Otros métodos más modernos incluyen aquellos basados en la espectrometría de masas o en el estudio de zonas repetitivas mediante PCR a partir de ADN previamente tratado con bisulfito. Sin embargo, dado que los análisis de metilación global no proporcionan información sobre las posiciones genómicas donde la metilación tiene lugar, es difícil relacionar estos cambios con las posibles consecuencias funcionales. Los métodos para estudiar la metilación específica de locus pueden ser muy concretos, cuando van dirigidos a uno o más genes candidatos, o pueden proporcionar información a gran escala a lo largo de todo el genoma. El método *gold standard* para el análisis de la metilación en una región concreta es la secuenciación por bisulfito mediante el método de Sanger. Las técnicas para analizar la metilación a lo largo del genoma incluyen los *microarrays* de metilación del ADN y los métodos de NGS basados en la secuenciación por bisulfito. Los métodos de NGS son los únicos que hoy en día permiten tener la información del patrón de metilación a lo largo del genoma completo, lo que se conoce como metiloma (Shen *et al.*, 2011; Kurdyukov and Bullock, 2016).

3.4.1. Conversión por bisulfito

Algunos *microarrays* de metilación, así como las técnicas de secuenciación por bisulfito, se basan en un método desarrollado en los años 90 que supuso un gran avance en el análisis de la metilación del ADN. Este método consiste en tratar el ADN con bisulfito de sodio, que actúa convirtiendo las citosinas no metiladas del ADN en uracilos (Figura 15A). Esto permite distinguir entre ADN metilado y no metilado mediante la posterior amplificación del ADN tratado por PCR y el análisis de los productos de PCR. Durante esta amplificación, las citosinas no metiladas

(convertidas a uracilos) amplificarán como timinas, mientras que las citosinas metiladas (no convertidas) amplificarán como citosinas (Figura 15B) (Clark *et al.*, 1994).

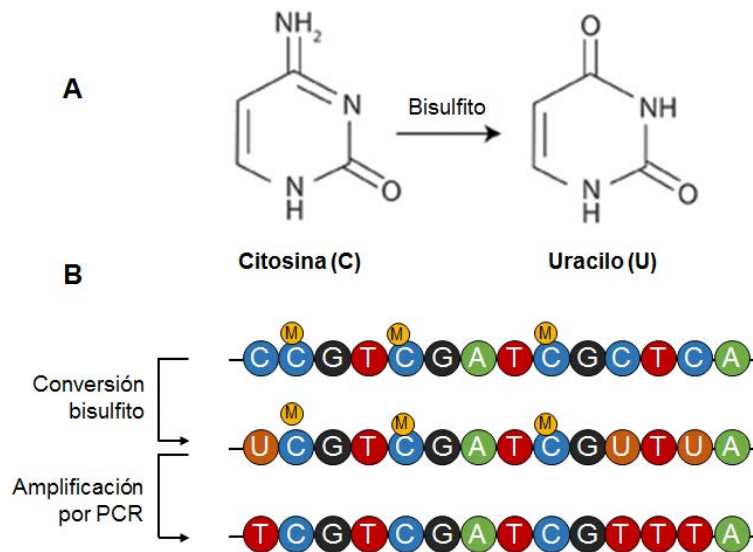


Figura 15. Método de conversión por bisulfito. **A)** Conversión de la citosina en uracilo por tratamiento con bisulfito. **B)** Acoplamiento de la conversión con un método de PCR para la distinción entre las citosinas previamente metiladas y no metiladas.

3.4.2. *Microarrays* de metilación del ADN

Existen tres clases de *microarrays* de metilación del ADN desarrollados para mapear los patrones de 5mC a lo largo del genoma: los métodos de enriquecimiento de regiones altamente metiladas mediante el uso de un anticuerpo específico de 5mC, los métodos que utilizan enzimas de restricción sensibles a la metilación y los métodos basados en la conversión por bisulfito (Shen and Waterland, 2007). Los primeros son útiles para detectar regiones de interés que luego pueden ser estudiadas por otros métodos con mayor resolución. Sin embargo, los métodos más utilizados son los basados en la conversión por bisulfito. Este tipo de *microarrays* consiste en la utilización de un *array* que contiene miles de sondas para interrogar el estado de metilación del ADN de un gran número de regiones, aunque no permite el estudio del genoma completo. Aun así, dado que el efecto funcional más pronunciado de la metilación del ADN ocurre en las regiones reguladoras de los genes, los *arrays* dirigidos a este tipo de regiones proporcionan una gran cantidad de información útil. Este es el método más popular para estudiar el perfil de metilación del ADN, ya que se sitúa entre la secuenciación por bisulfito del genoma completo, un método complejo y caro, y los métodos de bajo rendimiento que solo permiten estudiar una región concreta (Kurdyukov and Bullock, 2016).

El *microarray* más utilizado es el Infinium Human Mehtylation 450 Bead Chip Array, de Illumina, utilizado en esta tesis. Este *array* puede detectar el estatus de metilación de 485.000 sitios CpG en el 99% de los genes conocidos, incluyendo microARNs, promotores, regiones UTR, regiones

codificantes y hasta 2 Kb alrededor de las islas CpG (Dedeurwaerder *et al.*, 2011; Sandoval *et al.*, 2011). El microarray de Illumina utiliza, para cada CpG de interés, dos tipos distintos de bolas (*beads*) que contienen oligonucleótidos complementarios al sitio CpG no metilado (*bead* tipo U) y al metilado (*bead* tipo M). Estas *beads* están marcadas diferencialmente con fluorescencia. El ADN genómico previamente tratado con bisulfito se hibrida en el *array* con todas estas *beads* que contienen las sondas diseñadas para interrogar las distintas CpGs de interés. Tras la hibridación, hay una amplificación por PCR de aquellos productos donde hay total complementariedad entre el ADN convertido y la sonda. Es decir, si el ADN está metilado solo habrá amplificación cuando se una a la *bead* tipo M, y si no está metilado solo habrá amplificación cuando se una a la *bead* tipo U (Figura 16). Estos productos de PCR quedan inmovilizados en las *beads* correspondientes, de forma que la señal de fluorescencia se puede medir y la ratio entre los dos tipos de sondas para cada locus (CpG individual) es un indicador del nivel de metilación. El análisis de esta enorme cantidad de datos es muy complejo, pero ha sido mejorado a lo largo del tiempo (Bock, 2012; Ma *et al.*, 2013; Wilhelm-Benartzi *et al.*, 2013).

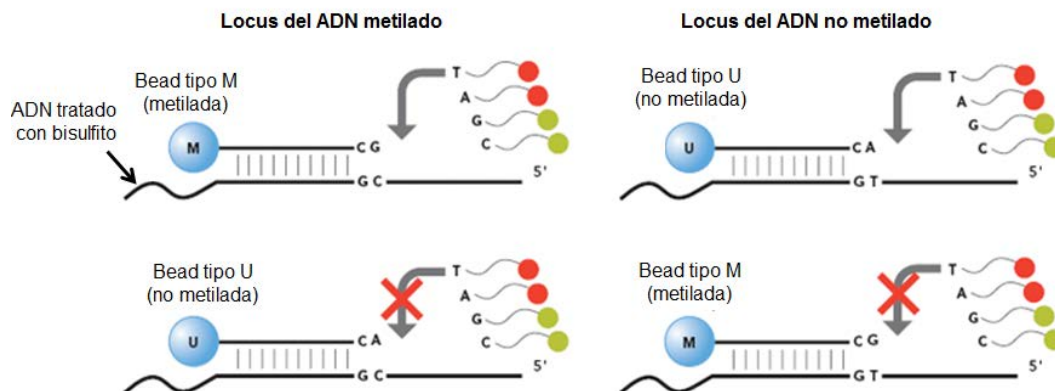


Figura 16. Fundamento del *microarray* de metilación de Illumina. Adaptación de Illumina.

3.4.3. Estudios de metilación del ADN en la LMMC

La metilación del ADN ha sido ampliamente estudiada en las neoplasias hematológicas. Los primeros estudios reportados se centraban en el análisis de uno o pocos genes candidatos y, con los años, los *microarrays* de metilación del ADN empezaron a utilizarse para estudiar el perfil de metilación a gran escala de las neoplasias hematológicas (Esteller, 2003; Lehmann *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2006; Boulwood and Wainscoat, 2007). En un estudio realizado en 367 muestras de distintas neoplasias hematológicas se observó que, generalmente, las neoplasias linfoides se asociaban con niveles superiores de metilación *de novo* del ADN en comparación con las neoplasias mieloides, que estaban principalmente no metiladas y se agrupaban con las muestras de controles sanos (Martin-Subero *et al.*, 2009).

En pacientes con SMD, y en algún caso con LMMC, la metilación del ADN se ha estudiado principalmente para entender el posible mecanismo de acción de los fármacos hipometilantes

AZA y DEC, así como para intentar predecir la respuesta a estos agentes. Sin embargo, los resultados son muy heterogéneos y poco concluyentes, sugiriendo que el efecto terapéutico de estos fármacos es más complejo de lo que se pensaba y no se debe, al menos de forma exclusiva, a la desmetilación de genes hipermetilados (Daskalakis *et al.*, 2002; Mund *et al.*, 2005; Gore *et al.*, 2006; Fandy *et al.*, 2009; Follo *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2011; Merlevede *et al.*, 2016). Meldi y cols. hipotetizaron que la falta de correlación entre la mayoría de estos estudios se debía a que los ensayos utilizados se focalizaban en estudiar solamente regiones promotoras, y que las diferencias en la metilación asociadas a una potencial respuesta terapéutica se encontraban probablemente fuera de los promotores y en zonas intergénicas. Para testar esta hipótesis, estudiaron por NGS el metiloma de 40 pacientes con LMMC tratados con DEC. Identificaron 167 regiones diferencialmente metiladas al diagnóstico capaces de distinguir entre los respondedores y los no respondedores. Estas regiones se localizaban principalmente en regiones no promotoras y se solapaban con elementos reguladores distales (Meldi *et al.*, 2015).

Otros estudios de metilación en la LMMC tenían como objetivo analizar el efecto de la hipermetilación de genes puntuales (Tessema *et al.*, 2003; Aucagne *et al.*, 2011). En cuanto a los estudios que evalúan el perfil de metilación del ADN en la LMMC, la mayoría se han centrado en evaluar la correlación entre la metilación del ADN y las mutaciones de *TET2*. Dado que el enzima *TET2* está involucrado en el mecanismo de metilación del ADN y las mutaciones del gen están presentes hasta en un 50-60% de los pacientes con LMMC, es lógico pensar que éstas puedan modificar el perfil de metilación de la enfermedad. En el primer estudio publicado, Ko y cols. estudiaron diferentes neoplasias mieloides, incluyendo 12 pacientes con LMMC. Reportaron que la pérdida de la marca 5mC era una característica notable de los pacientes con LMMC con mutaciones de *TET2* e identificaron, mediante *microarrays*, más de 2.500 regiones diferencialmente hipometiladas en estos pacientes y solamente dos hipermetiladas (Ko *et al.*, 2010). Poco después, Pérez y cols. analizaron mediante *microarrays* de metilación del ADN 24 pacientes con LMMC y demostraron que los pacientes con mutaciones de *TET2* tenían niveles superiores de metilación y un perfil distinto al de los pacientes *wild-type* (Pérez *et al.*, 2012). En otro trabajo, Yamazaki y cols. analizaron, en una serie de 30 pacientes con LMMC, los niveles de metilación global del ADN, así como el estatus de metilación de las zonas reguladoras de 21 genes previamente descritos en otras neoplasias mieloides. Concluyeron que los niveles de 5mC eran significativamente superiores en los pacientes con mutaciones de *TET2*. Además, los resultados de este estudio sugerían que el efecto de las mutaciones de *TET2* en la metilación de regiones promotoras se restringía a unos pocos genes y que probablemente recaía en regiones codificantes o intergénicas (Yamazaki *et al.*, 2012). Estos resultados fueron confirmados años después por el mismo grupo en un estudio en el que analizaron, por NGS, el metiloma de 40 pacientes con LMMC. En este estudio concluyeron que las mutaciones de *TET2* afectaban a la metilación de regiones reguladoras localizadas fuera de las islas CpG, aunque no explicaban las diferencias en la metilación del ADN en la LMMC (Yamazaki *et al.*, 2015).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La LMMC es una entidad que presenta una gran heterogeneidad a nivel clínico, morfológico y genético. El diagnóstico de la LMMC se basa en el análisis citomorfológico de la MO y la SP. El estudio citogenético es obligatorio al diagnóstico y puede resultar útil como marcador de clonalidad. Además, las alteraciones cromosómicas detectadas por CC, aunque poco frecuentes, tienen un gran impacto en el pronóstico de los pacientes con LMMC. Sin embargo, la gran mayoría de pacientes tiene un cariotipo normal (70-75%) y hasta el 80% de los casos se caracteriza por presentar características citogenéticas de bajo riesgo (cariotipo normal o pérdida aislada del cromosoma Y).

La aplicación de técnicas moleculares de alta resolución y/o sensibilidad, como los *microarrays* genómicos y los métodos de secuenciación, ha permitido aumentar el conocimiento de las bases moleculares de la LMMC. Mediante *microarrays* genómicos se han llegado a detectar anomalías cromosómicas hasta en un 75% de pacientes con LMMC, incluyendo alteraciones detectadas por CC y/o por SNP-A. Éstas incluyen CNAs y regiones con LOH. Sin embargo, esta técnica no ha sido utilizada en una serie única de pacientes con LMMC, ni tampoco se ha evaluado el posible valor pronóstico de las alteraciones detectadas por *microarrays*, y no por CC, en estos pacientes. Gracias a la secuenciación se sabe que más del 90% de los pacientes con LMMC presenta mutaciones somáticas en un conjunto de genes, aunque ninguna de éstas es específica de la enfermedad y el perfil de mutaciones detectado es muy heterogéneo. El papel pronóstico de estas mutaciones ha sido ampliamente estudiado, siendo las mutaciones de *ASXL1* las únicas que han demostrado tener un impacto pronóstico negativo independiente. Muchas de estas mutaciones afectan a reguladores epigenéticos involucrados en el mecanismo de metilación del ADN o la modificación de las histonas. Algunos estudios sugieren que estas mutaciones conllevan la pérdida de marcas epigenéticas, promoviendo la oncogénesis, junto con otros mecanismos epigenéticos, mediante la desregulación de la transcripción.

Este trabajo parte de la base que la mayoría de pacientes con LMMC pertenece a la categoría citogenética de bajo riesgo. Sin embargo, ésta es muy heterogénea a nivel clínico y un subgrupo de estos pacientes presenta una enfermedad más agresiva con un curso clínico desfavorable.

La **hipótesis** global de esta tesis es que los pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético presentan diferencias a nivel genético y que las alteraciones detectadas mediante técnicas poco usadas en el ámbito asistencial, como los SNP-A y la secuenciación masiva dirigida, podrían contribuir a definir mejor el pronóstico de este subgrupo de pacientes. Asimismo, la gran mayoría de pacientes con LMMC y citogenética de bajo riesgo presenta un cariotipo normal, por lo que la detección de alteraciones somáticas en este grupo de pacientes, es decir, de un marcador de clonalidad, podría ser útil a nivel diagnóstico. Además, dado que la metilación del ADN es el principal mecanismo epigenético descrito en la leucemogénesis, el estudio de las diferencias en la metilación del ADN entre los pacientes con citogenética de bajo riesgo y el resto de casos con LMMC, podría ayudar a identificar diferencias a nivel biológico entre estos subgrupos de pacientes, así como nuevos marcadores pronóstico.

Por lo tanto, el **objetivo general** de este trabajo es caracterizar a nivel genético y epigenético los pacientes diagnosticados de LMMC con citogenética de bajo riesgo, así como identificar factores pronóstico que permitan definir mejor el riesgo en este subgrupo de pacientes.

Los **objetivos concretos** son:

1. Mediante la técnica de SNP-A:

- Caracterizar la frecuencia y tipo de alteraciones detectadas por SNP-A en una serie de pacientes con LMMC y citogenética de bajo riesgo.
- Analizar la correlación entre estas alteraciones y las características clínico-biológicas de la serie.
- Evaluar el impacto pronóstico de las alteraciones detectadas por SNP-A en la supervivencia global y la progresión a LMA.

2. Mediante secuenciación masiva:

- Caracterizar la incidencia y tipo de mutaciones en una serie de pacientes con LMMC y citogenética de bajo riesgo, detectadas mediante la secuenciación masiva dirigida de un panel de genes relacionados con neoplasias mieloides.
- Analizar la correlación entre las mutaciones y las características clínico-biológicas de los pacientes.
- Determinar el impacto pronóstico de las mutaciones en estos pacientes, en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión.

3. Mediante estudios de metilación del ADN:

- Explorar las alteraciones en la metilación del ADN en una serie de pacientes con LMMC, mediante la comparación del perfil de metilación de estos pacientes con un grupo de controles sanos, e identificar genes y/o vías de señalización que podrían jugar un papel en la biología de la LMMC.
- Analizar la correlación del perfil de metilación y las características clínico biológicas y genéticas de los pacientes.
- Evaluar el posible impacto pronóstico de la metilación del ADN en la LMMC.
- Estudiar las diferencias en la metilación del ADN entre los pacientes con LMMC y citogenética de bajo riesgo y el resto de pacientes con LMMC.

RESULTADOS

Los resultados se presentan en forma de tres artículos, generados a partir del trabajo incluido en esta tesis.

Trabajo I

Palomo L, Xicoy B, Garcia O, Mallo M, Ademà V, Cabezón M, Arnan M, Pomares H, Larrayoz MJ, Calasanz MJ, Maciejewski JP, Huang D, Shih LY, Ogawa S, Cervera J, Such E, Coll R, Grau J, Solé F, Zamora L. Impact of SNP array karyotyping on the diagnosis and the outcome of chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features or no metaphases. *American Journal of Hematology*. 2016 Feb;91(2):185-92. Factor de impacto (2015): 5,000.

Trabajo II

Palomo L, Garcia O, Arnan M, Xicoy B, Fuster F, Cabezón M, Coll R, Ademà V, Grau J, Jiménez MJ, Pomares H, Marcé S, Mallo M, Millá F, Alonso E, Sureda A, Gallardo D, Feliu E, Ribera JM, Solé F, Zamora L. Targeted deep sequencing improves outcome stratification in chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features. *Oncotarget* 2016; 7:57021-35. Factor de impacto (2015): 5,005.

Trabajo III

Palomo L, Malinverni R, Cabezón M, Xicoy B, Arnan M, Coll R, Pomares H, Grau J, Navarro T, Feliu E, Solé F, Buschbeck M, Zamora L. DNA methylation profile in CMML associates with distinct clinical, biological and genetic features. 2017. [Submitted].

El trabajo III se incluye en el **Anexo I**.

Trabajo I

TRABAJO I: Impacto del cariotipado mediante SNP-A en el diagnóstico y el pronóstico de la leucemia mielomonocítica crónica de bajo riesgo citogenético

Entre un 20-30% de pacientes con LMMC presenta alteraciones citogenéticas. En todas las series estudiadas, la presencia de este tipo de alteraciones es indicativa de un pronóstico intermedio o desfavorable, exceptuando la pérdida aislada del cromosoma Y (Such *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014; Wassie *et al.*, 2014). Dicho de otro modo, la gran mayoría de pacientes con LMMC tiene un cariotipo normal y hasta el 80% puede presentar características citogenéticas de bajo riesgo (cariotipo normal, -Y aislado). Sin embargo, algunos pacientes con LMMC y bajo riesgo citogenético presentan una enfermedad más agresiva con una SG inferior. Nuestra hipótesis es que algunos de estos pacientes podrían presentar alteraciones submicroscópicas (no detectables por CC) con un impacto pronóstico distinto al que viene determinado por el cariotipo. Algunos trabajos que incluyen estudios de SNP-A en pacientes con LMMC han detectado CNAs y LOH hasta en un 75% de los casos. Aun así, las series publicadas son muy heterogéneas, incluyen pocos casos con LMMC y el impacto de estas alteraciones en estos pacientes no ha sido estudiado (Gondek *et al.*, 2008; Tiu *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se incluyeron 128 pacientes con LMMC con características citogenéticas de bajo riesgo (cariotipo normal, n=113; -Y, n=4) o con un resultado no informativo por CC (n=11). Se recogieron muestras de MO (n=124) y SP (n=4) al diagnóstico, así como datos clínicos de todos los pacientes. Se realizaron SNP-A en todos los casos utilizando el *microarray* Cytoscan HD (n=123) o el Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (n=5), de Affymetrix. Los resultados se analizaron y se correlacionaron con los datos clínicos de los pacientes.

Perfil de alteraciones detectadas por SNP-A

Los SNP-A revelaron alteraciones (CNAs y/o LOHs) en un 67% (86/128) de los pacientes con LMMC. Los casos no informativos por CC presentaron un mayor número de alteraciones (9/11, 82%) en comparación con los pacientes con citogenética de bajo riesgo (76/117, 65%), pero no se observaron diferencias en el número o tipo de alteraciones. De forma global, se detectó 1 alteración en 56/128 casos (44%), 2 en 16/128 (13%) y ≥ 3 en 14/128 (10%). Considerando todas las alteraciones, la mediana del tamaño de genoma afectado fue de 11Mb (rango 0,1 Mb - 460,97 Mb). En cuanto al tipo de alteraciones, se identificaron CNAs y LOHs con la misma frecuencia: 36 casos (28%) solo presentaban CNAs, 37 (29%) solo LOHs y en 13 (10%) pacientes se identificaron ambos tipos de alteraciones.

Se detectaron un total de 104 CNAs en 49/128 (38%) pacientes, la mayoría de los cuales correspondía a ganancias y pérdidas menores de 10 Mb (límite de resolución de la CC). Las ganancias en 8p12 y 21q22 se observaron de forma recurrente (presentes en ≥ 3 casos). Las

amplificaciones de 21q22, detectadas en tres pacientes, incluían el locus del gen *RUNX1*, que también se vio afectado en otros dos pacientes que presentaban una pequeña deleción de 21q22.12 y una LOH en 21q, respectivamente. También se detectaron, de forma recurrente, pérdidas en 10q21 y 12p13.2. Ésta última afectaba a la región donde se localiza el gen *ETV6*.

Se detectaron un total de 68 regiones con LOH, a nivel intersticial o telomérico, en 50/128 (39%) pacientes. Las LOHs intersticiales se vieron con mayor frecuencia que las teloméricas (30% y 13%, respectivamente) y fueron las únicas en observarse de forma recurrente. La región 4q24-4q35, que incluye el gen *TET2*, se encontraba afectada en 13/128 (10%) pacientes. Se detectaron LOHs recurrentes en la región 11q13.3-11q25 (7 casos), que contiene el gen *CBL*, así como en 7q32.1-7q36.3 (5 casos), que incluye el gen *EZH2*.

Correlación de las alteraciones con las características clínicas e impacto en la supervivencia

Ni la presencia ni el número de alteraciones detectadas por SNP-A se correlacionaban con las características clínico-biológicas de los pacientes, así como tampoco la presencia o tipo de CNAs. No obstante, la presencia de regiones con LOH intersticial se asoció con la variante LMMC-MP/recuento de leucocitos y con la presencia de esplenomegalia. De forma similar, un tamaño de genoma afectado >11 Mb se asociaba con la variante LMMC-MP/recuento de leucocitos, la presencia de esplenomegalia, los grupos de mayor riesgo según el CPSS y la dependencia transfusional.

Las medianas de SG y SLP de la serie fueron de 28,0 y 35,9 meses, respectivamente. En el análisis univariado, la mayoría de factores pronóstico clásicos de la LMMC se asociaron con la SG y la SLP: el subtipo de LMMC según la clasificación FAB, la dependencia transfusional, los niveles de hemoglobina, la cifra de leucocitos, la cifra de de plaquetas y los grupos de riesgo según el CPSS, el CPSS alternativo y el *GFM Model*. El subtipo de LMMC según la clasificación OMS 2008 y el porcentaje de blastos en MO solo se asociaron con la SG.

En cuanto al impacto de las alteraciones detectadas por SNP-A, ni la presencia ni el número de anomalías correlacionaba con la SG ni la SLP, pero sí el tamaño de éstas. Considerando como punto de corte 11 Mb (mediana del tamaño de genoma afectado en la serie), los pacientes con un tamaño de genoma afectado ≥ 11 Mb presentaban una SG y SLP inferiores. Además, cuando los pacientes se dividían en tres categorías de acuerdo con el tamaño de genoma afectado (0- <10 Mb, 10-<100 Mb, y ≥ 100 Mb), estos tres grupos de pacientes presentaban una SG significativamente distinta entre ellos. En cuanto al tipo de alteraciones, ni la presencia ni el número de CNAs o LOHs (intersticiales y/o teloméricas) tenían un impacto en el pronóstico. Sin embargo, los pacientes que presentaban LOHs intersticiales tenían una SG inferior comparado con el resto de pacientes.

Dado que tanto el tamaño de genoma afectado como la presencia de LOHs intersticiales se asociaban con la variante LMMC-MP, se evaluó el impacto pronóstico de las alteraciones detectadas por SNP-A en este subgrupo de pacientes que ya de por sí presenta un curso clínico

más agresivo. Ninguna de las características clínico-biológicas se asoció al pronóstico de estos pacientes. De hecho, el único parámetro capaz de predecir una SG y SLP inferiores en este subgrupo de pacientes fue la presencia de CNAs.

El impacto pronóstico de las alteraciones detectadas por SNP-A no mantuvo su significancia en el análisis multivariado. Las variables que presentaron un valor pronóstico independiente en el análisis multivariado de la SG fueron: el subtipo LMMC-MP/recuento leucocitario y la dependencia transfusional. De forma similar, las variables significativas en el análisis multivariado de la SLP fueron la dependencia transfusional y la cifra de plaquetas.

Esta es la mayor serie publicada de pacientes con LMMC analizados mediante la tecnología de SNP-A. Este estudio muestra que un 67% de los pacientes con LMMC y citogenética de bajo riesgo presenta alteraciones no detectables por CC (CNAs y LOHs). El perfil de estas alteraciones es muy heterogéneo, siendo las LOHs intersticiales de los cromosomas 4q, 7q y 11q las anomalías más recurrentes. Los pacientes con LOHs intersticiales, así como aquellos con un tamaño de genoma afectado ≥ 11 Mb, presentan una SG y SLP inferiores al resto de pacientes. Por tanto, la presencia de determinadas alteraciones crípticas, no detectables por CC, podría anular el buen pronóstico, asociado al cariotipo, de estos pacientes.

Trabajo I

Palomo L, Xicoy B, Garcia O, Mallo M, Ademà V, Cabezón M, Arnan M, Pomares H, Larrayoz MJ, Calasanz MJ, Maciejewski JP, Huang D, Shih LY, Ogawa S, Cervera J, Such E, Coll R, Grau J, Solé F, Zamora L. Impact of SNP array karyotyping on the diagnosis and the outcome of chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features or no metaphases. *American Journal of Hematology*. 2016 Feb;91(2):185-92. Factor de impacto (2015): 5,000.

Trabajo II

TRABAJO II: La secuenciación masiva dirigida mejora la estratificación pronóstica en la leucemia mielomonocítica crónica de bajo riesgo citogenético

Las alteraciones citogenéticas son poco frecuentes en los pacientes con LMMC, detectándose entre un 20-30% de los casos (Such *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014; Wassie *et al.*, 2014). Por el contrario, más del 90% de los pacientes presenta mutaciones somáticas. El valor pronóstico de estas mutaciones ha sido ampliamente estudiado, siendo las mutaciones en *ASXL1* las únicas que han demostrado tener un impacto pronóstico negativo independiente (Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2014b). Dado que las alteraciones cromosómicas, aunque poco frecuentes, tienen un gran impacto en el pronóstico de la LMMC, este estudio se ha focalizado en evaluar el valor pronóstico de las mutaciones somáticas en pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético, un grupo que puede llegar a representar el 80% de los casos (Such *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014; Wassie *et al.*, 2014). Este subgrupo presenta un curso clínico heterogéneo, por lo que nuestra hipótesis es que la presencia de mutaciones en este conjunto de pacientes podría ayudar a identificar aquellos casos con un pronóstico más desfavorable. Además, la gran mayoría de estos pacientes presenta un cariotipo normal y por tanto carece de un marcador clonal, por lo que la detección de mutaciones en estos casos podría ser útil a nivel diagnóstico.

En este trabajo se han incluido 56 pacientes con LMMC con características citogenéticas de bajo riesgo (cariotipo normal, n=53; -Y, n=1) o con un resultado no informativo por CC (n=2). Se recogió muestra de MO (n=58) o SP (n=6) en todos los casos al diagnóstico y, adicionalmente, en 7 pacientes que progresaron a LMA y 1 paciente que evolucionó a LMMC-2. Mediante secuenciación masiva dirigida, se estudió un panel de 83 genes relacionados con neoplasias mieloides. Las librerías se prepararon mediante captura con la química de Nimblegen (Roche) y se secuenciaron en la plataforma MiSeq (Illumina). Se realizó un análisis bioinformático de los datos y los resultados se correlacionaron con la información clínico-biológica de los pacientes.

Perfil de mutaciones detectado por secuenciación masiva

Mediante secuenciación masiva se detectaron mutaciones en el 98% (55/56) de los pacientes al diagnóstico. La mediana de mutaciones detectada por paciente fue de 4 (rango 0-8). Los genes más frecuentemente afectados fueron: *TET2* (71%), *ASXL1* (43%) y *SRSF2* (36%); seguidos de *RUNX1* (23%), *ZRSR2* (16%), *CBL* (13%) y *NRAS* (13%). También se detectaron mutaciones entre un 5-10% de los pacientes en los genes *EZH2*, *CREBBP*, *UMODL1*, *SETBP1*, *SH2B3*, *NF1*, *IDH2*, *SF3B1*, *KMT2D*, *CSF3R*, *JAK2*, *PTPN11*, *SMC1A*, *U2AF1* y *DNMT3A*. La gran mayoría de los genes afectados correspondía a componentes de vías de señalización celular, reguladores epigenéticos y elementos de la maquinaria de *splicing*.

La mayor parte de los pacientes (48/56) había sido estudiada previamente por SNP-A (Trabajo I). En 14 de estos casos se habían detectado LOHs intersticiales y 10 de ellos presentaban, además, una mutación en uno de los genes localizados en la región homocigota (*TET2*, *CBL*, *EZH2* y *KRAS*).

El espectro de mutaciones de los 7 pacientes estudiados en el momento de progresión a LMA era distinto en 6 de los casos y el número de mutaciones era superior al del diagnóstico en 5 de ellos. El número de alteraciones genéticas, detectadas tanto por CC como por secuenciación, en el momento de la progresión, era significativamente superior comparado al del diagnóstico. La gran mayoría de mutaciones adquiridas en la evolución a LMA correspondía a genes involucrados en vía de señalización RAS, como *BRAF*, *FLT3*, *KRAS*, *NRAS* y *PTPN11*.

Correlación de las mutaciones con las características clínicas e impacto en la supervivencia

Las mutaciones en los siguientes genes se asociaban con una o más características clínicas de riesgo adverso: *EZH2* con el subgrupo LMMC-2, la variante LMMC-MP/recuento leucocitario y los grupos de riesgo adverso según el CPSS y el *GFM Model*; *NRAS* con la variante LMMC-MP/recuento leucocitario y la presencia de esplenomegalia; *ASXL1* con la progresión a LMA y los grupos de riesgo adverso según el CPSS y el *GFM Model*; y *SRSF2* con una cifra de plaquetas $<100 \times 10^9/L$ y los grupos de riesgo adverso según el *GFM Model*. A diferencia de éstas, las mutaciones de *TET2* fueron las únicas que correlacionaban con características de buen pronóstico, como los niveles de hemoglobina $>10g/dL$, la no progresión a LMA y los grupos de bajo riesgo según el CPSS.

Las medianas de SG y SLP de la serie fueron de 47 y 128 meses, respectivamente. Las siguientes variables clínico-biológicas se asociaban tanto con la SG como con la SLP en el análisis univariado: los subtipos de LMMC según las clasificaciones OMS 2008 y FAB, la dependencia transfusional, la presencia de esplenomegalia, los niveles de hemoglobina, el recuento de leucocitos y los grupos de riesgo según el CPSS, el CPSS alternativo y el *GFM Model*.

En cuanto al impacto de las mutaciones, se observó una disminución en la SG y la SLP a medida que aumentaba el número de mutaciones. Además, la presencia de mutaciones en *ASXL1*, *NRAS* o *EZH2* se asociaba con una SG y SLP menores, mientras que las mutaciones de *SRSF2* correlacionaban con una SG inferior. En cambio, las mutaciones de *TET2* se asociaron con una SLP mayor. De forma global, el 61% (34/56) de los pacientes presentaba al menos una mutación de riesgo adverso (*ASXL1*, *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2*), lo cual se asociaba a una SG y SLP inferiores. También se observó una disminución en la SG y la SLP a medida que el número de mutaciones de riesgo adverso aumentaba.

Recientemente, Patnaik y cols. publicaron, en una serie de 175 pacientes con LMMC, una interacción pronóstica entre las mutaciones de *ASXL1* y *TET2*, confirmando el impacto negativo de *ASXL1* en la SG y sugiriendo un impacto favorable de *TET2* en ausencia de mutaciones en

ASXL1 (Patnaik et al, 2016). En nuestra serie de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético, las distintas combinaciones entre *ASXL1* y *TET2* también permitían estratificar a los pacientes en 4 subgrupos con diferencias significativas en la SG. En cuanto a la SLP, se observó una SLP superior en el grupo de pacientes que solo presentaba mutaciones en *TET2*, mientras que el resto de categorías mostraban un gran solapamiento. Con el objetivo de delinear el beneficio de las mutaciones de *TET2* en relación a otras mutaciones de riesgo adverso, se estudió la interacción entre *TET2* y el resto de genes de riesgo adverso, excluyendo *ASXL1*, lo cual permitió separar a los pacientes en cuatro grupos que mostraban una clara diferencia en la SG y la SLP. La comparación de estos cuatro grupos sugiere un posible papel protector de *TET2* tanto en presencia como en ausencia de mutaciones de riesgo adverso.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis multivariado, incluyendo todos aquellos parámetros clínico-biológicos y genéticos que habían mostrado un impacto pronóstico en el análisis univariado. Para la SG, las variables que permanecieron significativas en el modelo multivariado fueron el CPSS, usando de referencia el grupo de bajo riesgo, y la presencia de al menos una mutación de riesgo adverso (*ASXL1*, *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2*). En cuanto a la SLP, el modelo multivariado incluía el CPSS y la ausencia de mutaciones de *TET2*.

Esta es la primera serie en la que se ha investigado el impacto de las mutaciones genéticas en un grupo de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético. Más del 90% de los pacientes presentan al menos una mutación en uno de estos tres genes: *ASXL1*, *TET2* o *SRSF2*, lo cual puede ser de gran utilidad a nivel diagnóstico. Este estudio también muestra que tanto la presencia como el número de mutaciones en determinados genes (*ASXL1*, *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2*) confieren un pronóstico desfavorable. En cambio, las mutaciones de *TET2* son indicativas de un buen pronóstico en ausencia de mutaciones de riesgo adverso. El estudio de determinados genes, en la LMMC de bajo riesgo citogenético, permitiría identificar un subgrupo de pacientes con una enfermedad más agresiva y que podría beneficiarse de una monitorización más continuada y de tratamientos más intensivos.

Trabajo II

Palomo L, Garcia O, Arnan M, Xicoy B, Fuster F, Cabezón M, Coll R, Ademà V, Grau J, Jiménez MJ, Pomares H, Marcé S, Mallo M, Millá F, Alonso E, Sureda A, Gallardo D, Feliu E, Ribera JM, Solé F, Zamora L. Targeted deep sequencing improves outcome stratification in chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features. *Oncotarget* 2016; 7:57021-35. Factor de impacto (2015): 5,005.

DISCUSIÓN

La caracterización genética de las neoplasias hematológicas es importante no solo para comprender la biología de estas enfermedades sino también desde un punto de vista clínico. A nivel diagnóstico, la detección de determinadas anomalías genéticas puede confirmar la clonalidad y ayudar a clasificar a un paciente dentro de una entidad o subgrupo que presenta características clínicas y biológicas similares. A su vez, la presencia de determinadas alteraciones genéticas puede ayudar a establecer el pronóstico de un paciente. Tanto la clasificación de los pacientes con neoplasias hematológicas como la evaluación de su pronóstico son esenciales para determinar el tratamiento más adecuado en cada caso. Además, entender la genética de dichas enfermedades permitirá identificar posibles dianas terapéuticas y ayudar en la selección de tratamientos dirigidos de la forma más personalizada posible.

La LMMC es una enfermedad que comparte características tanto con los SMD como con las NMP y que presenta una elevada heterogeneidad a nivel clínico, morfológico y genético. La primera parte de esta tesis se centra en caracterizar genéticamente los pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético, la mayoría de los cuales presenta un cariotipo normal. Hasta el 80% de los pacientes con LMMC presenta características citogenéticas de bajo riesgo, pero su comportamiento clínico es heterogéneo. Creemos que la detección de anomalías genéticas en este subgrupo de pacientes puede ser de utilidad tanto a nivel diagnóstico como pronóstico. Por ello, en los Trabajos I y II, se han aplicado técnicas moleculares de alta resolución y/o sensibilidad, como los *microarrays* de SNP o la secuenciación masiva, respectivamente, para la caracterización de estos pacientes.

De acuerdo con numerosos estudios y como se demuestra en el Trabajo II, un gran porcentaje de pacientes con LMMC presenta mutaciones somáticas en reguladores epigenéticos. Por ello, la segunda parte de esta tesis (Trabajo III) se focaliza en el estudio de la metilación del ADN en una serie de pacientes con LMMC. Creemos que el estudio de este mecanismo epigenético puede contribuir a la detección de genes y vías de señalización implicados en la enfermedad, así como ayudar a identificar nuevos marcadores pronósticos.

1. Empleo de técnicas moleculares en el estudio de la LMMC

El diagnóstico de la LMMC incluye una revisión citomorfológica de la MO y de la SP, así como un estudio citogenético en MO. Aunque el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de la LMMC no se contempla en la última revisión de la clasificación de la OMS, sí se requiere, o se recomienda, en otras neoplasias mieloides (Arber *et al.*, 2016). Algunos ejemplos de la utilidad de los marcadores moleculares en el diagnóstico de las neoplasias mieloides, son la detección del redordenamiento *BCR-ABL1* en la LMC; las mutaciones de *JAK2*, *CALR* o *MPL* en las NMP Ph-; las mutaciones de *NPM1*, *CEBPA* o *RUNX1* en la LMA; o la presencia de mutaciones en *SF3B1* en los SMD con 5-14% de sideroblastos en anillo (Arber *et al.*, 2016). La

aplicación de los marcadores moleculares va más allá del diagnóstico ya que, en muchas de estas entidades, la presencia e incluso los niveles de determinadas anomalías genéticas se asocian con el pronóstico de los pacientes. Las técnicas *gold standard* para la detección de ganancias o pérdidas de material genético y de mutaciones, son la CC y la secuenciación de Sanger, respectivamente. Sin embargo, otras técnicas más novedosas, como los *microarrays* o la secuenciación masiva, se han aplicado en numerosos estudios para detectar estas mismas alteraciones con mayor resolución y/o sensibilidad.

1.1. *Microarrays* de SNP

En el Trabajo I se han utilizado los *microarrays* de SNP para la detección de alteraciones cromosómicas en una serie de 128 pacientes con LMMC.

Los SNP-A permiten la detección de cambios en el número de copias (ganancias y pérdidas de material genético) con una resolución de hasta 10 Kb, mucho mayor que la de la CC, que es de 10 Mb. Otras ventajas de esta técnica respecto a la CC es que permite detectar regiones con pérdida de heterocigosidad así como mapear con más precisión los puntos de corte de las alteraciones estructurales detectadas (Gondek *et al.*, 2008; Maciejewski and Mufti, 2008). Una última ventaja es que los SNP-A se aplican a muestras de ADN, por lo que no dependen de un cultivo celular, como la CC. Por contrapartida, esta técnica no permite la detección de translocaciones equilibradas, no permite distinguir si las alteraciones pertenecen a uno o más clones individuales, y su sensibilidad (aproximadamente 20%) es inferior a la de la CC (alrededor del 10%) (Gresham *et al.*, 2008; Maciejewski *et al.*, 2009).

Dado que las alteraciones más frecuentes en la LMMC son ganancias y pérdidas, la incidencia de translocaciones es muy baja y las regiones con LOH son comunes, el uso de SNP-A parece adecuado para el estudio de esta hemopatía (Gelsi-Boyer *et al.*, 2008; Gondek *et al.*, 2008; Such *et al.*, 2011; Tiu *et al.*, 2011). Especialmente teniendo en cuenta que el 70-75% de los pacientes con LMMC no presentan alteraciones por CC (Such *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014; Wassie *et al.*, 2014). Por todos estos motivos se eligió dicha técnica para el Trabajo I.

Mediante el uso de SNP-A se detectaron un total de 172 alteraciones que afectaban al 67% (86/128) de los pacientes. Dada la naturaleza de nuestra serie de pacientes, que incluía casos con LMMC de bajo riesgo citogenético o con un resultado no informativo por CC (<10 metafases), los SNP-A permitieron aumentar el rendimiento diagnóstico, en términos de detección de un marcador clonal, en más de la mitad de los casos. Se detectaron alteraciones mediante SNP-A en un 63% (74/117) de los pacientes con cariotipo normal y un 82% (9/11) de los casos con un resultado no informativo por CC, lo que demuestra la utilidad del uso de esta técnica en la LMMC, especialmente en estos subgrupos de pacientes. El uso de esta técnica permitió, además, detectar alteraciones con valor pronóstico, no detectables por CC, tal y como se discute en el apartado 3.2.1.

Una de las limitaciones técnicas del Trabajo I, al igual que en otros trabajos que utilizan esta técnica, es la falta de muestra control pareada para el análisis de los SNP-A. La utilización de ADN constitucional del propio paciente es recomendable para este análisis, especialmente para la detección de LOH, tal y como remarcan Heinrich y cols. (Heinrichs *et al.*, 2009). Al no disponer de dicha muestra control, se siguió el siguiente algoritmo: las ganancias y pérdidas detectadas se compararon con bases de datos públicas (*Database of Genomic Variants*) y con una serie de 1000 controles internos cedida por Affymetrix®; mientras que el análisis de LOH se hizo de acuerdo al algoritmo propuesto por Maciejewski y cols., que se basa en el tamaño y localización de la alteración (Maciejewski *et al.*, 2009). Esta aproximación permite asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos, reduciendo a la vez el coste económico de forma considerable.

1.2. Secuenciación masiva dirigida

Numerosos estudios han demostrado que la gran mayoría de pacientes con LMMC presenta mutaciones somáticas en un conjunto conocido de genes (Bastie *et al.*, 2012; McCullough and Patnaik, 2015; Patnaik and Tefferi, 2016). En el Trabajo II analizamos las mutaciones que presentaba un grupo de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético, mediante secuenciación masiva dirigida.

Aunque la técnica de secuenciación *gold standard* en los laboratorios de diagnóstico sigue siendo la secuenciación de Sanger, muchos laboratorios en todo el mundo están empezando a implementar las técnicas de NGS, por lo que creemos que los resultados de este trabajo son trasladables al ámbito clínico. Las técnicas de NGS presentan dos grandes ventajas respecto a la secuenciación de Sanger. En primer lugar, se trata de una técnica de elevada capacidad (técnica *high throughput*), que permite procesar, en un solo experimento, un gran volumen de datos. Esto permite analizar una gran cantidad de material genético a la vez, como por ejemplo un genoma completo, e incluso analizar varias muestras en un solo ensayo. En segundo lugar, la sensibilidad de la técnica, que permite detectar mutaciones por debajo del 5%, comparado con el límite del 15-20% de la secuenciación de Sanger. El principal inconveniente de la NGS es el análisis de datos, que es muy complejo, y su interpretación, especialmente cuando se secuencian regiones muy grandes, como un exoma o un genoma completo. Por ello, la secuenciación dirigida de un panel de genes o de regiones seleccionadas de interés es la aplicación más indicada en un laboratorio de rutina. Primero, porque permite trabajar con un número razonable de muestras y con sistemas de secuenciación más pequeños, haciendo que la técnica sea más coste-efectiva, y segundo porque facilita el análisis de datos y su interpretación en un contexto clínico.

Mediante la secuenciación dirigida de un panel que incluía regiones seleccionadas de 83 genes, en el Trabajo II se detectaron mutaciones somáticas en el 98% (55/56) de los pacientes estudiados. Se detectó al menos una mutación en la mayoría (50/51) de pacientes con cariotipo normal y en los 3 pacientes con un resultado no informativo por CC, demostrando la utilidad

diagnóstica de esta técnica, en cuanto a la detección de un marcador clonal en ausencia de una alteración citogenética. Aún más interesante, el 91% (51/56) de los pacientes presentaba al menos una mutación en los genes *ASXL1*, *SRSF2* o *TET2*. De todas formas, a pesar de que el estudio de unos pocos genes sea suficiente para la detección de un marcador clonal en la LMMC, conocer el perfil de mutaciones para cada paciente es importante para la evaluación adecuada de su pronóstico, como se discute en el apartado 3.1.2., y para la identificación de futuras dianas terapéuticas. Se necesitan estudios integrados en series que incluyan un gran número de pacientes para determinar la relevancia de cada patrón de mutaciones, como se ha observado en otras neoplasias hematológicas (Haferlach *et al.*, 2014; Malcovati *et al.*, 2014; Papaemmanuil *et al.*, 2016; Makishima *et al.*, 2017). Por lo tanto, cada vez hay más evidencias que refuerzan la necesidad de estudiar un conjunto diverso de genes, lo que requerirá, en un futuro próximo, la utilización de técnicas de secuenciación masiva. En el ámbito de las neoplasias mieloides existen genes implicados en varias entidades, incluyendo los SMD, los SMD/NMP, las NMP y la LMA; por lo que la utilización de paneles de genes pan-mieloides será probablemente de gran utilidad en los laboratorios de rutina.

2. Características de la LMMC de bajo riesgo citogenético

La incidencia de las alteraciones cromosómicas en la LMMC, detectadas por CC, está en torno al 25%, con un rango del 10-40%, según las series publicadas (Onida *et al.*, 2002; Germing *et al.*, 2004; Solé *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2007; Such *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014; Wassie *et al.*, 2014). Las anomalías cromosómicas son, por tanto, poco frecuentes en la LMMC, pero cuando están presentes, conllevan un pronóstico adverso. El primer estudio en demostrar el valor pronóstico de la citogenética en la LMMC fue publicado por el GESMD en 2011 (Such *et al.*, 2011). En este trabajo, Such y cols. propusieron una clasificación citogenética específica para la LMMC, donde el grupo de bajo riesgo incluía los pacientes con cariotipo normal y -Y aislado. Dicha clasificación citogenética es la variable con mayor peso en el índice pronóstico propuesto más adelante por el grupo español para la LMMC, el CPSS (Such *et al.*, 2013). Poco después, un consorcio formado por la Clínica Mayo y el Grupo Francés de SMD reafirmó el papel de la citogenética en la enfermedad, proponiendo una nueva clasificación citogenética (Wassie *et al.*, 2014). En ésta, el grupo de bajo riesgo era muy similar al del grupo español e incluía los pacientes con cariotipo normal, -Y aislado o der(3q) como única anomalía. De acuerdo con ambas clasificaciones, hasta un 80% de los pacientes con LMMC presenta características citogenéticas de bajo riesgo, mayoritariamente cariotipo normal. En los Trabajos I y II hemos caracterizado a nivel clínico, biológico y genético este subgrupo de pacientes.

2.1. Características clínico-biológicas

El Trabajo I supone, según nuestro conocimiento, la primera serie publicada de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético, e incluye un total de 128 casos. De éstos, 117 pacientes tenían características de bajo riesgo citogenético al diagnóstico (113 con cariotipo normal y 4 con -Y asilado). Dada la naturaleza del estudio, cuyo objetivo era evaluar la utilidad del cariotipado mediante SNP-A en estos pacientes, se decidió incluir también en la serie 11 pacientes con un resultado no informativo por CC (7 casos con <10 metafases normales y 4 sin metafases). Estos casos no presentaban ninguna diferencia a nivel clínico-biológico con el resto de los pacientes. De hecho, solo en uno de ellos se observó, mediante SNP-A, una alteración que hubiera podido ser detectada por CC (-Y aislado), por lo que todos ellos quedarían categorizados dentro del grupo de bajo riesgo también.

El estudio presenta algunas debilidades metodológicas inherentes a los estudios de registros mult institucionales, dado que incluye pacientes de diferentes centros: Chang Gung Memorial Hospital (n=28), ICO-Hospital Germans Trias i Pujol (n=27), ICO-Duran i Reynals (n=24), Cleveland Clinic (n=16), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (n=15), Hospital Universitario La Fe (n=14) y ICO-Josep Trueta (n=4). Los estudios multicéntricos suelen ser más complejos y requieren de una coordinación central. Cuando la metodología se lleva a cabo en más de una de las instituciones participantes, es necesario trabajar con un protocolo común y estandarizar tanto la técnica como el análisis de los resultados. En cuando a la recogida de datos clínicos, es importante establecer los parámetros y/o puntos de corte que se van a considerar, para que no haya ningún sesgo en la información recogida. En el Trabajo I, los SNP-A de todos los centros nacionales se llevaron a cabo en la Plataforma de Microarrays de Affymetrix (Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, ICO-Hospital Germans Trias i Pujol), mientras que los del Chang Gung Memorial Hospital y los de la Cleveland Clinic se llevaron a cabo en el centro de origen. Sin embargo, la gran mayoría de estudios de caracterización de la LMMC publicados en la literatura son de la misma naturaleza, principalmente debido a la baja incidencia de esta enfermedad. A pesar de esta limitación, se trata de una serie particularmente homogénea de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético, en comparación a muchos estudios que incluyen casos con LMMC en cohortes más grandes junto pacientes con SMD (Gondek *et al.*, 2008; Tiu *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2013).

En la Tabla 8 se pueden observar las características clínico-biológicas de nuestra serie de 128 pacientes de bajo riesgo citogenético, en comparación con las dos series mayores publicadas en LMMC, una serie española y otra americana, que incluyen pacientes de todos los grupos citogenéticos (Such *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014).

Tabla 8. Comparativa de las características clínico-biológicas de la serie del Trabajo I con otras series (no focalizadas en LMMC de bajo riesgo citogenético).

Variable	Palomo <i>et al.</i> , 2016 (n=125)	Such <i>et al.</i> , 2013 (n=558)	Tang <i>et al.</i> , 2014 (n=417)
Edad, años			
Mediana (rango)	73 (39-98)	73 (19-99)	69 (27-92)
<70, N (%)	43/128 (34)	196	211
≥70, N (%)	85/128 (66)	362	206
Género			
Hombre, N (%)	89 (70)	377 (68)	292 (70)
Mujer, N (%)	39 (30)	181 (32)	125 (30)
Clasificación FAB			
LMMC-MD, N (%)	83 (65)	338 (61)	187 (45)
LMMC-MP, N (%)	45/128 (35)	220 (39)	230 (55)
Clasificación 2008 OMS			
LMMC-1, N (%)	104 (81)	478 (86)	331 (79)
LMMC-2, N (%)	24/128 (19)	80 (14)	86 (21)
Hemoglobina, g/dL			
Mediana (rango)	10.6 (4.9-16.1)	11 (1-19)	10.7 (3.8-6.7)
<10 g/dL	52 (41)	190 (34)	152 (36)
≥10 g/dL	76 (59)	368 (66)	265 (64)
Cifra leucocitos, x10⁹/L			
Mediana (rango)	10.1 (2.5-127.5)	10 (1-156)	16 (2.6-209)
<13 x10 ⁹ /L, N (%)	83 (65)	338 (61)	187 (45)
≥13 x10 ⁹ /L, N (%)	45 (35)	220 (39)	230 (55)
Cifra plaquetas, x10⁹/L			
Mediana (rango)	109.0 (1.0-481.0)	123 (4-928)	102 (5-820)
<100 x10 ⁹ /L, N (%)	55 (43)	221 (40)	200 (48)
≥100 x10 ⁹ /L, N (%)	73 (57)	337 (60)	217 (52)
Cifra neutrófilos, x10⁹/L			
Mediana (rango)	4.4 (0.5-64.2)	4.2 (0.1-73.9)	Variable no recogida en el estudio
<1.8 x10 ⁹ /L, N (%)	15 (13)	103 (18)	
≥1.8 x10 ⁹ /L, N (%)	97 (87)	455 (82)	
Blastos en MO, %			
Mediana (rango)	3.0 (0.0-19.0)	3 (0-19)	4 (0-9)
<10%, N (%)	108 (86)	485 (87)	333 (80)
≥10%, N (%)	17 (14)	73 (13)	84 (20)
Dependencia transfusional^a			
No, N (%)	73 (71)	441 (70)	Variable no recogida en el estudio
Si, N (%)	30 (29)	116 (21)	
Supervivencia global, mediana	28	31	27
Progresión a LMA (%)	22% en total	29% a los 5 años	26% en total

Abreviaturas: FAB: Grupo Franco-Americano-Británico; LMA: leucemia mieloide aguda; MO: médula ósea; OMS: Organización Mundial de la Salud.

Llama la atención el gran número de pacientes de la serie de Tang y cols. con la variante LMMC-MP, que se corresponde con una mediana en la cifra de leucocitos superior a la de las otras series. Aun así, la proporción LMMC-MD:LMMC-MP varía considerablemente entre las series publicadas en la literatura: 1:1 (Germing *et al.*, 1998); 1:1,9 (Onida *et al.*, 2002), 1:1 (Germing *et al.*, 2007), 1,5:1 (Such *et al.*, 2013), 1:1,2 (Tang *et al.*, 2014), 1:1,4 (Cervera *et al.*, 2014); 1,4:1 (Elena *et al.*, 2016). Curiosamente, las únicas series basadas en el Registro Español de SMD o con un gran número de pacientes de este registro, son las únicas en las cuales la proporción de LMMC-MD es superior a la de LMMC-MP, lo que podría deberse a un sesgo de selección inherente a este registro. Aun así, cabe esperar que nuestra serie, en comparación con otras, presente más casos de LMMC-MD y de LMMC-1 al tratarse de una serie que, aunque presenta variabilidad a nivel clínico en términos de SG y SLP, se caracteriza por presentar un cariotipo de bajo riesgo.

Exceptuando este parámetro, a simple vista, no parece haber grandes diferencias a nivel clínico ni biológico entre nuestra serie de pacientes de bajo riesgo citogenético y las otras series, aunque estas posibles diferencias no han sido evaluadas estadísticamente. En el estudio publicado por Tang y cols. compararon las características clínico biológicas entre los pacientes con cariotipo normal (n=292) y los casos con alteraciones citogenéticas (n=125). A nivel biológico, la única diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre estos dos grupos, fueron los niveles de hemoglobina, más bajos en el grupo de pacientes con cariotipo anormal. A pesar de que los pacientes con $-Y$ (n=13) se incluyeron en el grupo de cariotipo alterado, éstos eran muy pocos y el número de casos con cariotipo normal de esta serie era muy elevado, por lo que se podría extrapolar que no existen grandes diferencias en los parámetros hematológicos entre los pacientes de bajo riesgo citogenético y el resto de casos. En cambio, sí que observaron diferencias a nivel clínico, ya que los pacientes con cariotipo alterado tenían una menor SG y un mayor riesgo de transformación a LMA.

2.2. Caracterización de las alteraciones genéticas

El principal objetivo de los Trabajos I y II era caracterizar a nivel genético los pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético. Creemos que esta caracterización tiene relevancia tanto diagnóstica como pronóstica. En primer lugar, al tratarse de un grupo casi definido por el cariotipo normal, la mayoría de estos pacientes carecen de un marcador clonal. La LMMC se caracteriza por la presencia de monocitosis persistente, que también puede ser causada por numerosas infecciones y trastornos. Por ello, los marcadores de clonalidad pueden resultar muy útiles en el proceso diagnóstico, para descartar la monocitosis reactiva, y especialmente en aquellos casos con una displasia morfológica moderada, como demostró nuestro grupo en un caso publicado en 2013 (Palomo *et al.*, 2013). En segundo lugar, creemos que la caracterización de las alteraciones genéticas que presentan estos pacientes, tanto a nivel de número de copias como de mutaciones, puede ayudar a definir marcadores pronóstico para este subgrupo de

pacientes (discutido en el apartado 2.3). Para dicha caracterización, en los Trabajos I y II se han empleado técnicas moleculares no utilizadas habitualmente en la práctica clínica para el diagnóstico de la LMMC, como ya se ha discutido en el apartado 1.

2.2.1. Alteraciones en el número de copias y pérdida de heterocigosidad

Numerosos estudios han demostrado la utilidad del cariotipado mediante SNP-A en pacientes con SMD y neoplasias relacionadas. En SMD, los estudios publicados reportan una frecuencia de alteraciones en el 50-75% de los pacientes, incluyendo CNAs submicroscópicas, regiones con LOH y alteraciones previamente detectadas por CC (Gondek *et al.*, 2007, 2008; Mohamedali *et al.*, 2007; Heinrichs *et al.*, 2009; Tiu *et al.*, 2011; Mallo *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2017). Todos estos trabajos hacen referencia a la importancia del uso de los SNP-A en la identificación de anomalías no detectables por CC. Algunos de ellos incluyen casos con LMMC, pero siempre dentro de cohortes muy heterogéneas, junto con pacientes con SMD, LMA secundarias y otros SMD/NMP. Además, el número de pacientes con LMMC incluido en estas series es limitado y queda muy diluido en la serie total. Concretamente, tres de estos estudios incluyen 54, 24 y 9 casos con LMMC, respectivamente (Gondek *et al.*, 2008; Tiu *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2013). Gracias a estos trabajos, se sabe que el 75% de los pacientes con SMD/NMP presenta alteraciones por SNP-A y que las LOH son frecuentes en estos pacientes. Aun así, dentro de este porcentaje se incluyen alteraciones previamente detectadas por CC, así como pacientes con SMD/NMP distintos a la LMMC. El único hallazgo que se destaca característico del subgrupo de pacientes con LMMC, es la mayor frecuencia de casos con LOH respecto a los pacientes con SMD: 35% vs. 20%, respectivamente (Gondek *et al.*, 2008).

El Trabajo I supone, por tanto, el primer estudio de SNP-A publicado en una serie única de pacientes con LMMC. Como ya se ha explicado anteriormente, este estudio se centra en pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético. Debido al valor pronóstico que ya tienen de por sí las alteraciones detectadas por CC en la LMMC, creemos que la relevancia de las alteraciones detectadas por SNP-A (y no detectables por CC) será mayor en este grupo de pacientes. Se detectaron un total de 172 alteraciones que afectaban al 67% (86/128) de los pacientes, 104 de las cuales correspondían a CNAs (21 ≥ 10 Mb y 83 < 10 Mb) y 68 a regiones con LOH (45 intersticiales ≥ 25 Mb y 23 teloméricas ≥ 2 Mb). Poco después de la publicación del Trabajo I, un grupo alemán publicó un estudio en el que analizaban, mediante SNP-A, una serie de 99 pacientes con LMMC y cariotipo normal (Vetro *et al.*, 2016). En este estudio, Vetro y cols. reportaron alteraciones en un 40% de los pacientes. Dada la gran similitud entre las dos series de pacientes, creemos que la diferencia en los resultados se debe al hecho de que, en el estudio alemán, no se reportaron LOH por debajo de 10 Mb. En cambio, en nuestro trabajo, sí se consideraron todas las LOH ≥ 2 Mb siempre y cuando fueran teloméricas, según recomiendan Maciejewski y cols. (Maciejewski *et al.*, 2009). De acuerdo con esto, el porcentaje de casos con CNAs en el estudio de Vetro y cols. (40%) es similar al de nuestra serie (38%), mientras que la proporción de casos con LOH (22%) es inferior a la nuestra (39%) (Vetro *et al.*, 2016). En cuanto

a los 11 pacientes con un resultado no informativo por CC (7 casos con <10 metafases normales y 4 sin metafases), 9 de ellos (82%) presentaron alteraciones por SNP-A. Solo una de éstas hubiera sido detectada por CC y correspondía a una pérdida aislada del cromosoma Y en uno de los casos sin metafases. Tanto el número como el tipo de alteraciones detectadas en este grupo eran similares al del resto de los casos.

De acuerdo con los resultados del Trabajo I, un 38% (49/128) de los pacientes presentaba CNAs. Aunque se detectaron algunas regiones recurrentemente afectadas por pequeñas ganancias o pérdidas en unos pocos pacientes, la variedad de CNAs detectados refleja la gran heterogeneidad genética de la LMMC. De forma similar, en el estudio de Vetro y cols. no hacen referencia a regiones recurrentemente afectadas por CNAs, probablemente debido a la heterogeneidad en sus resultados (Vetro *et al.*, 2016). En nuestro trabajo, algunas de las regiones recurrentemente afectadas por CNAs incluían genes previamente descritos en la enfermedad, como *RUNX1* o *ETV6*, lo que refuerza la utilidad de esta técnica en la identificación de genes candidatos. Además, estos resultados muestran cómo una célula tumoral puede utilizar diferentes mecanismos para generar una misma consecuencia funcional. Por ejemplo, se detectaron pequeñas deleciones en el locus del gen *RUNX1* en dos pacientes. Asimismo, se han descrito mutaciones con pérdida de función en el gen *RUNX1* en pacientes con LMMC, como también se demuestra en el Trabajo II (Gelsi-Boyer *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2009). Ambos tipos de alteraciones genéticas conllevan una pérdida de función en la proteína, dando lugar al mismo efecto a nivel funcional.

En cuanto a las regiones con LOH, se detectaron con la misma frecuencia que las CNAs, afectando a un 39% (50/128) de los pacientes. La considerable incidencia de las LOH en los SMD y la LMMC sugiere una predisposición subyacente a la inestabilidad genómica. En el estudio de Mohamedali y cols. observaron que el 43% de las regiones con LOH se localizaban en regiones reconocidas como “sitios frágiles”, que son regiones conocidas que presentan, con gran frecuencia, inestabilidad genómica (Mohamedali *et al.*, 2007). La variedad de regiones con LOH teloméricas identificadas en el Trabajo I pone de manifiesto, de nuevo, la heterogeneidad molecular de la LMMC. En cambio, las LOH intersticiales afectaban a un menor número de cromosomas y a algunos de ellos de forma recurrente. Se detectaron LOH intersticiales recurrentes en 4q24-4q35 (10%, 13/128), 11q13.3-11q25 (5%, 7/128) y 7q32.1-7q36.3 (4%, 5/128). Estas anomalías ya habían sido descritas en la LMMC y en otras neoplasias mieloides y, mediante nuestro estudio, hemos podido estimar su incidencia en la LMMC de bajo riesgo citogenético. La presencia de regiones con LOH puede contribuir a la identificación de genes candidatos, pues la LOH generada por recombinación mitótica promueve la activación de potenciales oncogenes recesivos o a la inactivación de TGSs (Mohamedali *et al.*, 2007). De hecho, la detección de LOHs en 4q, 11q y 7q sirvió en su día para la identificación de genes implicados en la LMMC como *CBL*, *TET2* y *EZH2*, respectivamente (Dunbar *et al.*, 2008; Delhommeau *et al.*, 2009; Ernst *et al.*, 2010). Estos tres genes se encuentran mutados en un porcentaje variable de pacientes con LMMC (Tefferi *et al.*, 2009; Abdel-Wahab *et al.*, 2011a;

Jankowska *et al.*, 2011; Schnittger *et al.*, 2012). En el Trabajo II demostramos que todos los pacientes estudiados que presentaban una LOH en 4q24 (n=4) tenían además mutaciones en *TET2*, de acuerdo con resultados previos (Delhommeau *et al.*, 2009; Jankowska *et al.*, 2009). Asimismo, también se han descrito microdeleciones en 4q24 que afectan al locus del gen *TET2* en pacientes con mielodisplasia (Viguié *et al.*, 2005). De forma similar, todos los casos con LOH en 11q23.3 (n=3) presentaban mutaciones en *CBL*, de acuerdo con resultados previamente publicados (Dunbar *et al.*, 2008; Makishima *et al.*, 2009). También se detectaron casos individuales con mutaciones en *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2* y con LOH en 7q35-q36, 12p12.1 y 17q25.3, respectivamente. En el estudio posterior de Vetro y cols. detectan también regiones con LOH en 4q24 en 6 casos (5 de los cuales tienen mutaciones en *TET2*) y en 11q23.3 en 3 casos (todos ellos con mutaciones en *CBL*) (Vetro *et al.*, 2016). Todos estos resultados demuestran la asociación entre ambos eventos moleculares y sugieren que la detección de regiones con LOH en la LMMC podría indicar la presencia de mutaciones homocigotas en genes localizados en la región afectada. El impacto pronóstico negativo de las LOH en la LMMC (discutido en el apartado 3.2.1) podría estar influenciado o incluso acentuado por la presencia de mutaciones en genes de estas regiones.

2.2.2. Mutaciones somáticas

La aplicación de la secuenciación masiva dirigida a grandes series de pacientes con LMMC ha contribuido a la caracterización molecular de esta entidad. Los trabajos más relevantes incluyen los estudios de Meggendorfer y cols., que estudiaron 9 genes en una proporción variable de un grupo de 275 pacientes; Itzykson y cols., que estudiaron 18 genes en una proporción variable de un total de 312 casos; y Patnaik y cols., 2016, que analizaron 27 genes en una serie de 175 pacientes (Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2016a). Otro de los estudios moleculares más relevantes en la LMMC fue publicado poco después del Trabajo II, por Elena y cols. En este estudio analizaron 38 genes en una cohorte de 214 casos con LMMC con el objetivo de desarrollar una versión revisada del CPSS que incluyera mutaciones somáticas, el CPSS Molecular (CPSS-Mol) (Elena *et al.*, 2016). El resto de estudios publicados incluyen series más limitadas de pacientes o bien se centran en el análisis de uno o muy pocos genes (Gelsi-Boyer *et al.*, 2008, 2010; Kuo *et al.*, 2009; Pich *et al.*, 2009; Kohlmann *et al.*, 2010; Ricci *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010; Abdel-Wahab *et al.*, 2011a, b; Jankowska *et al.*, 2011; Braun *et al.*, 2011; Grossmann *et al.*, 2011; Makishima *et al.*, 2012; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2013b, 2017; Damm *et al.*, 2013; Cervera *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2015, 2016). Gracias a todos estos trabajos se sabe que >90% de los pacientes con LMMC presenta mutaciones somáticas en un conjunto conocido de genes, siendo las más comunes las mutaciones en *TET2*, *ASXL1* o *SRSF2*, que afectan aproximadamente a la mitad de los pacientes.

En el Trabajo II se secuenciaron las regiones seleccionadas de 83 genes en una serie de 57 pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético (51 con cariotipo normal, 3 con -Y aislado y 2 sin metafases pero sin alteraciones detectadas por SNP-A). La principal limitación de este

trabajo es el número de pacientes analizados, especialmente en comparación con las series publicadas previamente mencionadas (Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016; Patnaik *et al.*, 2016a). Por motivos tanto económicos como de disponibilidad de muestra, éste último debido a la baja incidencia de la LMMC, no se pudo ampliar la serie de pacientes. Sin embargo, creemos que tanto la homogeneidad de los pacientes incluidos en el estudio como los resultados del análisis multivariado, son dos hechos positivos de nuestro estudio y sugieren que estos resultados podrían aplicarse a series más largas de pacientes.

En la Figura 17 se puede observar el perfil de mutaciones detectado en nuestra serie en comparación con los resultados de las series de Itzykson y cols. y Elena y cols. para los genes comúnmente estudiados (Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016). Estos dos trabajos incluían pacientes de todos los riesgos citogenéticos. Cabe destacar que en nuestra serie se detectaron mutaciones en *TET2*, *RUNX1* y *ZRSR2* con mayor frecuencia que en las otras dos series. Para el gen *RUNX1*, la frecuencia detectada en nuestro trabajo, 23%, está dentro del intervalo observado en la literatura, que es del 10-30% (Kuo *et al.*, 2009; Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Meggendorfer *et al.*, 2012; Cervera *et al.*, 2014; Patnaik *et al.*, 2016a). En cambio, el porcentaje de casos con *TET2* es superior al reportado por el resto de estudios (Kosmider *et al.*, 2009; Tefferi *et al.*, 2009; Kohlmann *et al.*, 2010; Meggendorfer *et al.*, 2012). Creemos que esta diferencia se debe a la naturaleza de nuestra serie y, de hecho, Itzykson y cols. reportaron una asociación positiva entre las mutaciones de *TET2* y la citogenética de bajo riesgo (Itzykson *et al.*, 2013b). Además, como se demuestra en el Trabajo II y en otros estudios, las mutaciones de *TET2* se asocian a un mejor pronóstico en la LMMC (discutido en el apartado 3.2.2), y por tanto tiene sentido que sean más frecuentes en pacientes con citogenética favorable (Kohlmann *et al.*, 2010; Patnaik *et al.*, 2016a).

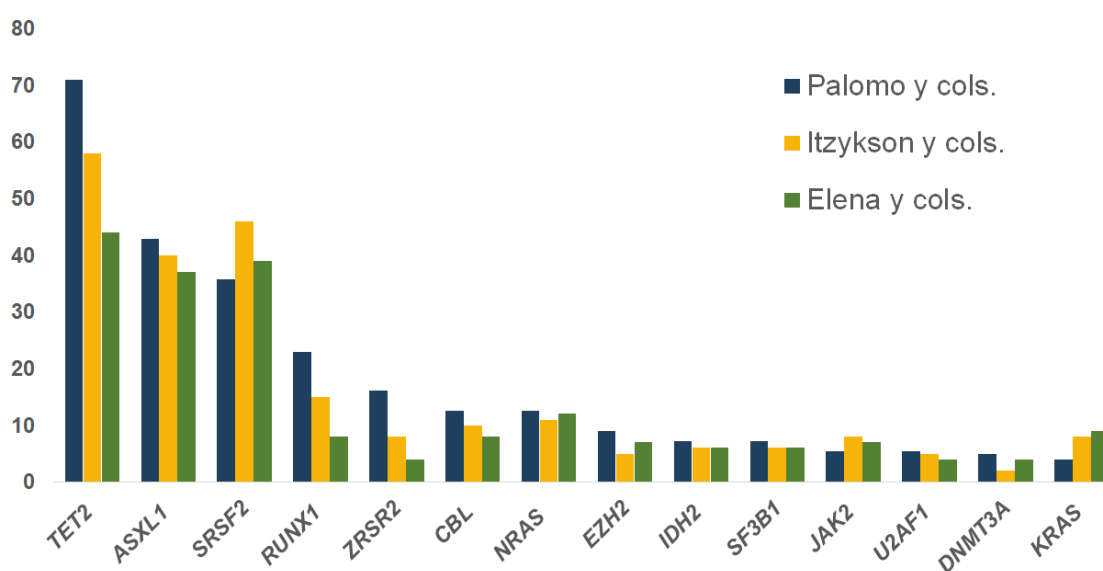


Figura 17. Comparación de la frecuencia de las mutaciones en los genes estudiados en el Trabajo II en comparación con las series publicadas de Itzykson y cols. y Elena y cols. (Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016).

Cabe destacar que en el Trabajo II se describen, por primera vez en la LMMC y con frecuencias del 5-10%, mutaciones en los genes *CREBBP*, *KMT2D* y *UMODL1*. Los genes *CREBBP* y *KMT2D* son reguladores epigenéticos que codifican para una histona aciltransferasa y una histona metiltransferasa, respectivamente. Sus mutaciones se han descrito en varios tipos de tumores sólidos, así como en neoplasias hematológicas linfoides como la leucemia aguda linfoblástica, el linfoma folicular o el linfoma B difuso de célula grande (Gui *et al.*, 2011; Morin *et al.*, 2011; Pasqualucci *et al.*, 2011; Peifer *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014; Mullighan, 2014; Bouska *et al.*, 2017). Dichas mutaciones podrían conllevar una pérdida de la actividad enzimática de estas proteínas y una desregulación transcripcional (Mullighan *et al.*, 2011; Kantidakis *et al.*, 2016). El papel del gen, así como de las mutaciones, de *UMODL1* se desconoce. En neoplasias hematológicas, las mutaciones de *UMODL1* se han reportado, en dos estudios puntuales, en un porcentaje bajo de pacientes con mieloma (Chapman *et al.*, 2011) y con LMA secundaria a SMD (Walter *et al.*, 2012). Se desconoce el posible papel de estas mutaciones en la LMMC y serían necesario estudios en cohortes más grandes para elucidar su relevancia en esta enfermedad.

En cuanto al número de alteraciones, en el Trabajo II se detectaron mutaciones en el 98% (56/57) de los pacientes, con una media de 4 mutaciones por paciente, de acuerdo con otros estudios (Elena *et al.*, 2016; Patnaik *et al.*, 2016a). El número de mutaciones observado por paciente en la LMMC es superior al de los SMD o las NMP, lo que refleja una mayor heterogeneidad e inestabilidad genética (Bejar *et al.*, 2011; Papaemmanuil *et al.*, 2013; Haferlach *et al.*, 2014; Vainchenker and Kralovics, 2017). A pesar de dicha heterogeneidad, el 91% de los pacientes presentaba al menos una mutación en *TET2*, *ASXL1* o *SRSF2*, siendo este porcentaje un poco superior al de otras series debido a la alta proporción de casos con mutaciones en *TET2* en nuestro trabajo, como ya se ha comentado. Este hecho puede resultar muy útil a nivel diagnóstico, aunque es recomendable investigar la presencia de mutaciones en otros genes para poder evaluar correctamente el pronóstico de los pacientes.

También exploramos la correlación entre las distintas mutaciones para poder identificar posibles interacciones funcionales entre los distintos genes afectados. El análisis estadístico reveló que las mutaciones de *ASXL1* se detectaban frecuentemente junto con las mutaciones de *NRAS* y *EZH2*, y, de forma similar, que los genes *RUNX1* y *CBL* se encontraban frecuentemente comutados. Asociaciones similares se han descrito en la LMMC en la literatura, entre los genes *TET2* y *CBL* (Kohlmann *et al.*, 2010; Schnittger *et al.*, 2012); *TET2* y *SRSF2* (Meggendorfer *et al.*, 2012; Patnaik *et al.*, 2016b); *ASXL1* y *SETBP1* (Damm *et al.*, 2013); *ASXL1* y *U2AF1* (Patnaik *et al.*, 2013b); y *DNMT3A* con *ASXL1*, *SF3B1* y *PTPN11* (Patnaik *et al.*, 2017). Esta gran variedad de resultados sugiere que, por ahora, no existe una asociación clara entre ninguna de estas mutaciones. Se requieren estudios en series mucho más grandes para poder extraer información sobre este tipo de asociaciones, así como estudios biológicos que investiguen las posibles interacciones de estos distintos eventos moleculares a nivel funcional. Lo que sí está establecido es la mutua exclusividad de las mutaciones en los genes de *splicing*,

como observamos en el Trabajo II (las mutaciones de *SRSF2* son mutuamente excluyentes con las de *ZRSR2*) y como se ha descrito en numerosos estudios (Yoshida *et al.*, 2011a; Meggendorfer *et al.*, 2012; Kar *et al.*, 2013; Patnaik *et al.*, 2013a, b). Este patrón sugiere que estas mutaciones tienen un impacto equivalente en la célula a nivel funcional y que, o bien no existe un efecto cooperativo ventajoso para la célula al mutar dos de estos genes, o bien las mutaciones concomitantes son letales para la célula. Como apuntan Yoshida y cols., este hecho también sugiere que estas mutaciones juegan un papel central en la patogénesis de la mielodisplasia propia de los SMD y la LMMC (Yoshida *et al.*, 2011a).

2.2.3. Adquisición de mutaciones en la progresión de la enfermedad

En el Trabajo II se analizó el perfil mutacional de 7 pacientes en la progresión a LMA, 6 de los cuales habían adquirido al menos una mutación adicional respecto al diagnóstico. El número de alteraciones (detectadas por CC o por secuenciación) en el momento de la progresión fue significativamente superior al del diagnóstico. Además, estos 6 pacientes adquirieron mutaciones en genes implicados en vías de señalización, 5 de ellos en genes de la vía RAS. La vía RAS es una importante vía de transducción de señales que controla fenómenos como la proliferación, diferenciación y apoptosis, y que se encuentra alterada en numerosos tumores y neoplasias hematológicas (Forbes *et al.*, 2015; Rauch *et al.*, 2016). Estos resultados son un ejemplo del modelo clásico de evolución del cáncer en el que se postula que éste evoluciona a través de la adquisición secuencial de distintas mutaciones o alteraciones genéticas (Greaves and Maley, 2012; Greaves, 2015). Más concretamente, y según el modelo propuesto en los SMD, una o más mutaciones fundadoras darían lugar inicialmente a una expansión clonal asintomática en el compartimento hematopoyético, lo que explicaría la presencia de mutaciones somáticas en personas sanas de edad avanzada, entidad definida como CHIP (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*) (Steensma *et al.*, 2015). Durante la progresión, la adquisición de nuevas mutaciones en el mismo clon alteraría la hematopoyesis (ineficaz en la variante LMMC-MD y exagerada en la LMMC-MP) dando lugar a la aparición de la enfermedad. En última instancia, la adquisición de nuevas mutaciones resultaría en una eventual progresión a una LMA secundaria (Kennedy and Ebert, 2017). Estas mutaciones deberían proporcionar a la célula una mayor ventaja proliferativa, lo que cuadraría con la adquisición de mutaciones en vías de señalización que controlan la proliferación y apoptosis, como es la vía RAS. Patel y cols. demostraron que más de la mitad de los pacientes con LMMC tienen mutaciones ancestrales (dominantes o co-dominantes) en los genes *TET2*, *ASXL1* y *SRSF2*, mientras que la progresión de la enfermedad se asocia a la expansión clones que han adquirido mutaciones en genes de la familia *RAS* así como mutaciones bialélicas de *TET2* (Patel *et al.*, 2017). De hecho, en este trabajo sugieren que la clasificación de la LMMC de acuerdo con su arquitectura clonal (eventos ancestrales y subclonales) se correlaciona con la clínica de la enfermedad y podría ser de utilidad para evaluar el pronóstico de los pacientes (Patel *et al.*, 2017).

3. Factores pronósticos genéticos en la LMMC de bajo riesgo citogenético

Como ya se ha comentado anteriormente, hasta el 80% de los pacientes con LMMC presenta características citogenéticas de bajo riesgo. Aun así, este subgrupo de pacientes es heterogéneo a nivel clínico, con un porcentaje variable de pacientes que progresa a LMA o que se caracteriza por tener un curso clínico desfavorable (Such *et al.*, 2013). Por lo tanto, se requieren herramientas que permitan identificar estos casos, ya sea para una monitorización más continuada o como candidatos a tratamientos más intensivos. En los Trabajos I y II, además de caracterizar este subgrupo de pacientes, se ha evaluado también el impacto pronóstico de las características clínico-biológicas, así como de las alteraciones genéticas detectadas mediante técnicas moleculares.

3.1. Factores pronóstico clínico-biológicos

Existen factores clínico-biológicos conocidos con valor pronóstico en la LMMC, como el grado de anemia, la leucocitosis, la trombocitopenia, el porcentaje de blastos en MO o la presencia de células inmaduras circulantes (Catalano *et al.*, 1996; Germing *et al.*, 1998, 2002, 2004, 2007; Onida *et al.*, 2002; Breccia *et al.*, 2004; Adès *et al.*, 2013; Such *et al.*, 2013; Itzykson *et al.*, 2013b; Schuler *et al.*, 2014). Estos factores podrían ayudar a identificar aquellos casos con LMMC de bajo riesgo citogenético que podrían presentar un curso clínico más agresivo. Sin embargo, según nuestro conocimiento, previamente al Trabajo I, su valor pronóstico no había sido evaluado en una serie de pacientes con LMMC y citogenética de bajo riesgo.

De acuerdo con los resultados del análisis de supervivencia univariado de los Trabajos I y II, los siguientes factores clínico-biológicos se correlacionaban con una SG inferior en ambos estudios: la presencia de $\geq 10\%$ de blastos en MO (correspondiente al subtipo LMMC-2), una cifra de leucocitos $\geq 13 \times 10^9/L$ (correspondiente a la variante LMMC-MP), niveles de hemoglobina $< 10g/dL$, la presencia de esplenomegalia y la dependencia transfusional. En cuanto a la SLP, las siguientes variables se asociaron a una menor SLP en ambos estudios: una cifra de leucocitos $\geq 13 \times 10^9/L$ (correspondiente a la variante LMMC-MP), niveles de hemoglobina $< 10g/dL$, la presencia de esplenomegalia y la dependencia transfusional. Además, en ambas series se validó la aplicabilidad de los índices pronósticos CPSS, CPSS alternativo y GFM Model. Todos los modelos fueron capaces de predecir, con una diferencia estadísticamente significativa, la SG y la SLP de los diferentes grupos de riesgo. Los factores con mayor capacidad predictiva, según demuestran los análisis multivariados, son la LMMC-MP, la dependencia transfusional y el CPSS. De estos resultados se deduce que los factores pronóstico clínico-biológicos clásicos de la LMMC siguen teniendo aplicabilidad dentro del subgrupo de pacientes de bajo riesgo citogenético.

3.2. Factores pronóstico genéticos

La gran mayoría de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético presenta un cariotipo normal. Sin embargo, tal y como se ha discutido en el apartado 2, estos pacientes presentan otro tipo de alteraciones genéticas, incluidas las pequeñas ganancias y pérdidas de material genético, las regiones con LOH y las mutaciones somáticas.

3.2.1. Alteraciones detectadas mediante SNP-A

El impacto pronóstico de las alteraciones detectadas por SNP-A ha sido evaluado en varios estudios en pacientes con SMD. Algunos de estos trabajos sugieren que las deleciones detectadas por SNP-A (Mohamedali *et al.*, 2007) o la presencia de alteraciones adicionales (detectadas por SNP-A y no por CC) (Gondek *et al.*, 2008), tienen un impacto pronóstico adverso en pacientes con SMD. Otro estudio reportó que la presencia de alteraciones detectadas por SNP-A se asociaba con una menor tasa de respuesta al tratamiento con decitabina y a una menor SG (Yi *et al.*, 2013). Sin embargo, ninguna de estas variables era capaz de predecir la supervivencia, de forma significativa, en los análisis multivariados. El trabajo más relevante, publicado por Tiu y cols., incluía 430 pacientes con SMD (n=250), SMD/NMP (n=95 (54 LMMC)) y LMA secundaria a SMD (n=85) (Tiu *et al.*, 2011). En este estudio observan, en la serie global de pacientes, que la presencia de alteraciones adicionales (detectadas por SNP-A y no por CC) se asocia con la SG y la SLP independientemente del cariotipo, en los análisis univariado y multivariado. Además, enfatizan la complementariedad entre las técnicas de CC y SNP-A y proponen 4 grupos de riesgo basados en las alteraciones detectadas mediante ambas técnicas, y que presentan diferencias en la SG y la supervivencia libre de evento (Tiu *et al.*, 2011).

El Trabajo I ha sido el primero en explorar el valor pronóstico del número, tamaño y tipo de alteraciones detectadas por SNP-A en la LMMC. La variable que mejor correlacionaba con la supervivencia de los pacientes era el tamaño de genoma afectado, definido como la suma del tamaño de todas las alteraciones detectadas en los cromosomas autosómicos de cada paciente. Considerando un punto de corte de 11 Mb (mediana del tamaño de genoma afectado en la serie de pacientes), los pacientes con un tamaño afectado ≥ 11 Mb presentaban una SG y una SLP significativamente inferiores. La clasificación de los pacientes en 3 grupos de acuerdo con el tamaño de genoma afectado también correlacionaba con la SG. La mayoría de los pacientes con un gran tamaño de genoma afectado se caracterizaba por presentar regiones con LOH intersticiales ≥ 25 Mb. De acuerdo con esto, el grupo de pacientes con LOH intersticiales también presentaban una SG significativamente inferior al resto de casos. Sin embargo, en el análisis de supervivencia multivariado, ninguna de estas variables retuvo un impacto pronóstico independiente y solo las variables clínico-biológicas se validaban en el modelo: la variante LMMC-MP y la dependencia transfusional para la SG, y la cifra de plaquetas

y la dependencia transfusional para la SLP. Se observó una asociación significativa entre el tamaño de genoma afectado o las LOH intersticiales con la variable LMMC-MP. Esta asociación junto con el hecho de que la LMMC-MP fuera capaz de predecir mejor tanto la SG como la SLP, podría explicar por qué ninguno de estos dos factores genéticos fue significativo en el análisis multivariado. Curiosamente, al focalizarnos en el subgrupo de pacientes con LMMC-MP, que ya de por sí presenta un curso clínico más agresivo, la única variable (incluyendo los parámetros clínico-biológicos y genéticos) capaz de predecir una SG y SLP inferiores, fue la presencia de CNAs (ganancias y pérdidas detectadas por SNP-A).

Los resultados del Trabajo I sugieren que, aunque no detectables por CC, las ganancias y pérdidas submicroscópicas de material genético y las regiones con LOH podrían tener un valor pronóstico en pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético. El tamaño de genoma afectado es relevante ya que permite detectar un subgrupo de pacientes que presenta una mediana de SG equivalente a la del grupo citogenético de riesgo intermedio (Such *et al.*, 2011). Sin embargo, en el trabajo publicado poco después por Vetro y cols. en 99 pacientes con LMMC y cariotipo normal, no encontraron ninguna asociación entre las características detectadas por SNP-A y la supervivencia de los pacientes (Vetro *et al.*, 2016). En su estudio, las mutaciones de determinados genes se correlacionaban mucho mejor con la clínica de los pacientes. Se necesitan estudios en series más largas de pacientes para confirmar el verdadero valor pronóstico de las alteraciones detectadas por SNP-A en la LMMC. Aun así, el fuerte impacto pronóstico de algunas mutaciones, como las de *ASXL1*, sugiere que las mutaciones somáticas jugarán, en un futuro, un papel más importante en el manejo clínico de la LMMC, tal y como se discute en el siguiente apartado (Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2014b; Elena *et al.*, 2016).

3.2.2. Mutaciones somáticas

Numerosos estudios han evaluado el impacto pronóstico de las mutaciones somáticas en la LMMC (Patnaik and Tefferi, 2016). En el Trabajo II se identificaron 4 genes cuyas mutaciones se asociaban, en nuestra serie y de acuerdo con el análisis univariado, con una SG inferior: *ASXL1*, *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2*. Las mutaciones en tres de estos genes predecían también una menor SLP: *ASXL1*, *EZH2* y *NRAS*. Las mutaciones en dichos genes se asociaban también con algunas variables clínico-biológicas de mal pronóstico, como la anemia, la leucocitosis, un mayor porcentaje de blastos en MO o la presencia de esplenomegalia. Esto sugiere que las características clínicas y morfológicas que presentan los pacientes al diagnóstico podrían ser un reflejo de la genética del clon neoplásico.

De acuerdo con la literatura, el único gen que, de forma consistente, se asocia a un pronóstico desfavorable en la LMMC y retiene su impacto en los modelos multivariados, es *ASXL1* (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2014b, 2016a; Cui *et al.*, 2015; Elena *et al.*, 2016). Por ello, *ASXL1* ha sido el único gen incluido en los primeros índices pronósticos que incorporaron datos moleculares en la LMMC, el *GFM Model* y el *MMM* (Itzykson *et al.*,

2013b; Patnaik *et al.*, 2014b). Además de *ASXL1*, nuestro estudio identificó otros tres genes con relevancia clínica. Previamente al Trabajo II, las mutaciones en *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2* se habían relacionado con un mal pronóstico en los pacientes con LMMC en algunos estudios: *NRAS* (Ricci *et al.*, 2010; Itzykson *et al.*, 2013b), *EZH2* (Grossmann *et al.*, 2011), *SRSF2* (Itzykson *et al.*, 2013b); aunque en muchos otros estudios no se determinó que tuvieran ningún impacto. Nuestros datos refuerzan estos resultados. En el Trabajo II observamos también que, a mayor número de mutaciones de riesgo adverso (*ASXL1*, *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2*), menor era la SG y la SLP de los pacientes. Esto sugiere que la acumulación de mutaciones en determinados genes podría conferir mayor ventaja proliferativa al clon neoplásico, promoviendo su expansión y contribuyendo a la progresión de la enfermedad. Además, la presencia de al menos una mutación de riesgo adverso retuvo un valor pronóstico independiente en el modelo multivariado, junto con los grupos de riesgo del CPSS. Poco después de la publicación del Trabajo II, Elena y cols. publicaron la revisión del CPSS que incluía datos moleculares, el CPSS-Mol (Elena *et al.*, 2016). La variable con mayor peso en el CPSS-Mol es un índice genético específico para la LMMC que incluye los grupos de riesgo citogenético y las mutaciones en *ASXL1*, *NRAS*, *SETBP1* y *RUNX1*.

En el Trabajo II identificamos otro gen con relevancia clínica en nuestra serie de pacientes, *TET2*. A diferencia de los otros genes, las mutaciones de *TET2* se asociaron con una mayor SLP, reforzando el impacto favorable de *TET2* que ha sido reportado en algunos estudios pero que es controvertido (Jankowska *et al.*, 2009; Tefferi *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Patnaik *et al.*, 2016a, b). En un estudio llevado a cabo en una serie de 175 pacientes con LMMC, Patnaik y cols. analizaron la interacción pronóstica entre las mutaciones de *TET2* y *ASXL1*. En este estudio sugerían que las mutaciones de *TET2* tenían un impacto favorable en ausencia de mutaciones en *ASXL1* y demostraban que las distintas combinaciones entre las mutaciones en estos dos genes estratificaban a los pacientes en 4 grupos con distinta SG (Patnaik *et al.*, 2016a). Nosotros investigamos esta interacción en nuestra serie y observamos que la clasificación de los pacientes de acuerdo con el estatus mutacional de estos dos genes se asociaba con la SG y la SLP, confirmando el impacto negativo de las mutaciones de *ASXL1* y el impacto favorable de las mutaciones de *TET2* en ausencia de mutaciones en *ASXL1*. En cambio, el pronóstico del grupo *TET2*wt-*ASXL1*wt en nuestra serie fue inferior al reportado por Patnaik y cols., y podría explicarse porque algunos de los pacientes de este grupo albergaban mutaciones en otros genes de riesgo adverso. De forma similar, analizamos la interacción entre *TET2* y otras mutaciones de riesgo adverso. El análisis confirmó que el impacto negativo de las mutaciones de riesgo adverso prevalece sobre las mutaciones de *TET2*, aunque los pacientes con mutaciones de *TET2* muestran un pronóstico mejor comparado con los pacientes sin, sugiriendo el posible papel protector de éstas. También observamos que, en ausencia de mutaciones de riesgo adverso, las mutaciones de *TET2* confieren el mejor pronóstico. Este impacto beneficioso de *TET2* fue más significativo en el análisis de SLP, no reportado por Patnaik y cols (Patnaik *et al.*, 2016a). Además, la presencia/ausencia de mutaciones de *TET2*

fue la única variable con valor pronóstico independiente en el modelo multivariado de la SLP, además del CPSS.

Todos estos resultados demuestran que la incorporación de datos moleculares mejora la eficacia de los índices pronóstico basados en datos clínico-biológicos y citogenéticos. También ilustran que, aunque la gran mayoría de pacientes con LMMC presenta mutaciones en unos pocos genes, conocer el contexto molecular de cada paciente es importante para la evaluación adecuada de su pronóstico. Estudios integrados en series que incluyan un gran número de pacientes ayudarán a determinar las posibles interacciones entre distintos genes, así como la relevancia de cada patrón de mutaciones.

4. Características epigenéticas de la LMMC

La LMMC es una enfermedad heterogénea caracterizada por la presencia de alteraciones citogenéticas en el 20-30% de los pacientes y de mutaciones somáticas, en un conjunto de genes, que afectan a >90% de los casos. Sin embargo, la presencia de dichas alteraciones genéticas no es suficiente para explicar la diversidad biológica de la enfermedad. Además, no solo las alteraciones genéticas están involucradas en el proceso de iniciación y desarrollo del cáncer, sino también las epigenéticas. Notablemente, >60% de pacientes con LMMC presenta mutaciones en reguladores epigenéticos. Éstas incluyen las mutaciones en enzimas involucrados en la metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) y en la modificación de las histonas (*ASXL1*, *EZH2*). La metilación del ADN es el mecanismo epigenético más estudiado en los humanos. En el cáncer existen cambios complejos en la metilación del ADN, incluyendo la desmetilación global del ADN, el aumento de expresión de las DNA metiltransferasas y la metilación *de-novo* de islas CpG previamente no metiladas (Issa et al, 2010). La metilación aberrante de las islas CpG localizadas en las regiones promotoras de los genes se asocia con el silenciamiento transcripcional de TSGs conocidos o candidatos (Boulwood and Wainscoat, 2007). La metilación del ADN ha sido ampliamente estudiada en las neoplasias hematológicas y existen numerosas evidencias que demuestran que la hipermetilación aberrante de genes tiene lugar en las neoplasias mieloides y que contribuye potencialmente a la patogénesis de estas enfermedades (Lehmann *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2006; Boulwood and Wainscoat, 2007). Varios trabajos han demostrado que existen alteraciones en la metilación del ADN en la LMMC. Estos estudios se han focalizado en analizar la hipermetilación de uno o unos pocos genes específicos (Tessema *et al.*, 2003; Aucagne *et al.*, 2011), explorar las diferencias entre los pacientes con y sin mutaciones de *TET2* (Ko *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2012; Yamazaki *et al.*, 2012, 2015) y evaluar la respuesta al tratamiento con agentes hipometilantes (Braun *et al.*, 2011; Meldi *et al.*, 2015). Sin embargo, el papel de la metilación en la LMMC aún no está claro. Además, excepto el trabajo publicado por Meldi y cols., en el que identificaron 167 regiones diferencialmente metiladas capaces de predecir la respuesta al tratamiento con decitabina, en

ninguno de estos trabajos se asocian las alteraciones en la metilación del ADN con la clínica de los pacientes (Meldi *et al.*, 2015).

En el Trabajo III (Anexo 1) hemos evaluado el perfil de metilación, a lo largo del genoma, de una serie de pacientes con LMMC, y lo hemos correlacionado con las características clínico-biológicas y genéticas de los pacientes. Para ello se ha utilizado la técnica de los *microarrays* de metilación del ADN, en concreto, el Infinium HumanMethylation450 Bead Array. Éste analiza el estatus de metilación de 485764 citosinas distribuidas por todo el genoma, que corresponden a secuencias CpG (99,3%) y CNG (0,7%) (Sandoval *et al.*, 2011). Cabe destacar que, aunque este *array* cubre una gran parte del genoma, incluyendo el 99% de los genes RefSeq, se focaliza en promotores de transcripción, por lo que no permite evaluar el efecto de las CpGs localizadas en regiones distales y en regiones intergénicas reguladoras. Otra limitación del estudio es el uso de ADN de MO total y no solamente de la fracción tumoral. Al utilizar ADN total, se analiza la metilación tanto de las células tumorales como de las que no lo son, por lo que los cambios más sutiles en la metilación del ADN de las células tumorales podrían quedar enmascarados.

4.1. Alteraciones en la metilación del ADN y presencia de regiones significativamente alteradas en la LMMC

En el Trabajo III (Anexo 1) analizamos el perfil de metilación de 64 pacientes con LMMC y de 10 controles sanos. Primero, mediante un análisis de componentes principales no supervisado, observamos que el perfil de metilación de los pacientes con LMMC era claramente diferente al de los controles sanos, que se agrupaban entre ellos. Después, llevamos a cabo un análisis diferencial del ADN, entre pacientes y controles, para observar aquellas diferencias, estadísticamente significativas, entre los dos grupos (>30% de diferencia, $P < 0,05$). Mediante este análisis se vio que >1800 CpGs se encontraban significativamente más metiladas en los pacientes con LMMC y que éstas afectaban a 1100 genes distintos y a un total de 636 regiones promotoras o reguladoras de la transcripción. Estudios previos han descrito que algunos genes puntuales, como *CSNK2B* o *TFI γ* , se encuentran hipermetilados en la LMMC (Tessema *et al.*, 2003; Aucagne *et al.*, 2011). En el Trabajo III, gracias a la utilización de técnicas genómicas, pudimos constatar que la hipermetilación de regiones promotoras en la LMMC se distribuye por todo el genoma y afecta a un gran número de genes. El alcance y la ubicuidad de la metilación aberrante del ADN sugiere que ésta podría ser una fuerza dominante en el silenciamiento de TSGs y la variación clonal, que podría contribuir a la selección positiva en la evolución neoplásica. No obstante, también se espera que el efecto de algunas de estas variaciones sea pasajero, lo que se conoce como “epi-fenómeno” (Jiang *et al.*, 2009). Cabe destacar que la desregulación observada en la metilación del ADN no se limitaba a genes asociados con el cáncer, sino que tenía un efecto más amplio.

Se detectó una metilación aberrante en numerosos genes implicados en la vía de señalización WNT, tal y como se ha descrito en pacientes con SMD, LMA secundaria (Figuroa *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009) y en tumores sólidos (Yu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016b; Liu *et al.*, 2017). Entre estos genes destaca *CDH1*, cuya hipermetilación se ha reportado en pacientes con SMD en más de un estudio y se ha asociado a un pronóstico desfavorable (Aggerholm *et al.*, 2006; Grövdal *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). La desregulación de la vía WNT se ha asociado a la iniciación del cáncer (Reya and Clevers, 2005). De hecho, los antagonistas y los inhibidores de esta vía son TSGs conocidos, lo que sugiere que el silenciamiento de estos genes, inducido por la hipermetilación del ADN, podría jugar un papel en la patogénesis y la progresión de estas neoplasias mieloides. La metilación aberrante también afectaba a numerosos genes implicados en la inflamación mediada por vías de señalización de citocinas y quimiocinas, en la vía de señalización PDGF y en la apoptosis. La hipermetilación de algunos de estos genes se ha reportado también en los SMD y la LMA. Por ejemplo, el silenciamiento, inducido por la hipermetilación del ADN, del gen apoptótico *ETS1* fue reportado por del Rey y cols. en pacientes con SMD de bajo riesgo (del Rey *et al.*, 2013). Zhao y cols. identificaron un “fenotipo de islas CpG metilador” (*CpG island methylator phenotype*) en pacientes con SMD definido por la hipermetilación de 6 genes, 4 de los cuales (*DAPP1*, *FADD*, *LRRFIP1* and *SMPD3*) estaban también hipermetilados en nuestra serie de pacientes con LMMC (Zhao *et al.*, 2014). Otros genes hipermetilados detectados en nuestro análisis y previamente descritos en SMD y LMA incluyen: *BCL11A*, *BRCA2*, *CYFIP2*, *DAXX*, *KLF11*, *LCK*, *NOTCH4*, *PDCHB3*, *PDCHB7*, *TGFA*, *TNF* y *ZFP161* (Figuroa *et al.*, 2009, 2010; Bullinger *et al.*, 2010; Potapova *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014). Todos estos resultados sugieren que algunos de estos genes podrían estar involucrados en pasos patogénicos comunes en el espectro de neoplasias mieloides. Éstos podrían ser un evento necesario, pero no suficiente, durante el proceso de transformación maligna de las células hematopoyéticas. Aun así, las diferentes formas de neoplasias hematológicas podrían estar caracterizadas por patrones específicos de desregulación epigenética que podrían contribuir, de forma potencial, a la biología de cada enfermedad (Figuroa *et al.*, 2009). La identificación de genes alterados por la metilación del ADN conservados en las neoplasias mieloides podría ayudar en la identificación de impulsores (*drivers*) de estas enfermedades que podrían ser dianas para el desarrollo de nuevas terapias.

Mediante un análisis de *hotspot* pudimos ver que el efecto de la hipermetilación no era completamente estocástico, y que ciertas regiones cromosómicas eran más propensas a la hipermetilación que otras. De acuerdo con esta observación, se ha demostrado que la hipermetilación del ADN puede extenderse a lo largo de regiones genómicas de un tamaño de 100 Kb a >1 Mb y se asocia al “silenciamiento epigenético de amplio rango” (*long-range epigenetic silencing*) (Novak *et al.*, 2008). La región con una diferencia más significativa, según nuestro análisis, correspondía a una región de 10 Mb localizada en 5q31.3-q32 y que incluía la familia de genes protocadherina (*PCDH*), formada por tres *clusters* de genes *PCDH* (α , β , y γ) dispuestos en tándem y que codifican para una superfamilia de moléculas de adhesión. Los genes de los *cluster* α y γ comparten los mismos 3 últimos exones, mientras que los genes del

cluster β son distintos y están formados por un único exón (Wu and Maniatis, 1999). Cada gen *PCDH* de estos tres *clusters* tiene, además, un promotor de islas CpG. El silenciamiento global de estos *cluster* mediante la metilación de estas islas CpG se ha descrito previamente en tumores sólidos (Novak *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015). Otra región detectada mediante este análisis fue 17q24.3-q25.3. Cabe destacar que Bullinger y cols. identificaron una región densa en islas CpG en 17q25.3 cuya metilación se asociaba con un pronóstico desfavorable en pacientes con LMA (Bullinger *et al.*, 2010). Otra región significativamente alterada fue 6p22.1-p21.2, que incluía varios genes relacionados con apoptosis, como *DAXX*, *LTB*, *HSPA1L* y *TNF*, algunos de los cuales se encuentran hipermetilados en pacientes con SMD y LMA secundaria (Figueroa *et al.*, 2009).

En resumen, estos datos muestran que las alteraciones epigenéticas son abundantes en la LMMC, sugiriendo que algunas lesiones *driver* podrían ser de naturaleza epigenética. Además, estos resultados podrían ser útiles para la identificación de posibles dianas terapéuticas.

4.2. Correlación del perfil de metilación de la LMMC con las características clínico-biológicas y genéticas de los pacientes

Con el objetivo de explorar posibles asociaciones o diferencias, a nivel de la metilación del ADN, entre las muestras de los pacientes con LMMC, se llevó a cabo un análisis de *clusters* jerárquico considerando aquellas sondas que más variaban entre los pacientes y los controles (>40% de diferencia, $P < 0,05$). Este análisis distinguía 2 *clusters* principales. El Grupo 1 estaba enriquecido en pacientes con características clínico-biológicas de mal pronóstico, como el subtipo LMMC-2, la presencia de anemia o trombocitopenia, los cariotipos de riesgo intermedio y alto y los grupos de mayor riesgo según el CPSS (Such *et al.*, 2013). Además, el Grupo 1 presentaba una SG y una SLP significativamente inferiores a las del Grupo 2. Estos resultados sugieren que las alteraciones en la metilación del ADN tienen un gran impacto en la biología de la enfermedad, que estos patrones son un reflejo del estado de la enfermedad y que podrían ser un factor determinante en el diferente comportamiento clínico de los pacientes con LMMC. Además, la diferencia en el patrón de metilación de los pacientes al diagnóstico podría ser útil para la identificación de biomarcadores que puedan predecir el pronóstico de los pacientes.

Además, los dos *clusters* se asociaban estadísticamente con algunas características genéticas de los pacientes. El Grupo 2 estaba enriquecido en pacientes con cariotipo normal. La correlación entre los patrones de metilación y las características citogenéticas se ha descrito también en pacientes con LMA y con leucemia aguda linfoblástica, aunque, como en nuestro estudio, la correlación nunca es absoluta (Figueroa *et al.*, 2010; Milani *et al.*, 2010; Gabriel *et al.*, 2015). También se analizó la correlación con las mutaciones presentes en >10% de los pacientes. Las mutaciones de *ZRSR2* se detectaron solo en el Grupo 1, mientras que el Grupo 2 estaba enriquecido en pacientes con mutaciones de *TET2* y *SRSF2*. Aunque se desconoce

el impacto pronóstico de las mutaciones en *ZRSR2* en la LMMC, las de *TET2* se asocian con un pronóstico favorable, como se observó en el Trabajo II (Kohlmann *et al.*, 2010; Patnaik *et al.*, 2016b). En cuanto a *SRSF2*, aunque en nuestro estudio en pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético (Trabajo II) se asoció con un peor pronóstico, los resultados en series completas de LMMC no son concluyentes (Meggendorfer *et al.*, 2012; Itzykson *et al.*, 2013b; Patnaik *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016). Aun así, estos resultados deberían interpretarse con cuidado, ya que solamente disponíamos de datos moleculares para un subgrupo de los pacientes (57/64 para *ASXL1*, *SRSF2* y *CBL*; 46/64 para *TET2*, *RUNX1*, *ZRSR2* y *EZH2*). Además, al derivarse estos resultados principalmente del Trabajo II, que incluía pacientes de bajo riesgo citogenético, la mayoría de los pacientes sin datos moleculares correspondía al Grupo 1.

Puesto que la evaluación de perfiles de metilación a gran escala tiene poca aplicabilidad en la práctica clínica, se investigó el impacto pronóstico de la metilación aberrante de genes individuales con el objetivo de detectar posibles marcadores. Se seleccionaron genes previamente descritos en pacientes con SMD y neoplasias relacionadas (*CDH1*, *BCL2*, *ETS1*, *DAXX*, *MFADD*, *DAPP1*, *AATK*, *CYFIP*, *TP53BP2* y *AIM2*). La mayoría de estos genes se encontraba hipermetilados en los pacientes con LMMC, pero este hecho no se asoció con la supervivencia. Por el contrario, la hipometilación de *BCL2* sí se correlacionaba con la SG y la SLP de los pacientes. Los pacientes con una desmetilación de *BCL2* tenían una SG y una SLP inferiores al grupo de paciente que presentaba un nivel de metilación comparable a la de los controles sanos. El efecto de esta hipometilación de *BCL2* podría ser similar al causado, en varios tipos de linfomas, por la expresión constitutiva de *BCL2* (Tsuyama *et al.*, 2017).

Todos estos resultados muestran que los perfiles de metilación del ADN pueden ser útiles para identificar grupos de pacientes que comparten unas características genéticas comunes, así como una clínica y pronóstico similares.

4.3. Diferencias en la metilación del ADN entre la LMMC de bajo riesgo citogenético y el resto de grupos citogenéticos

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de metilación diferencial entre el grupo de pacientes de bajo riesgo citogenético (n= 50; 47 con cariotipo normal y 3 con -Y aislado) y el grupo de riesgo citogenético intermedio/alto (n=14; 7 de riesgo intermedio y 7 de alto riesgo). Este análisis reveló que el grupo de riesgo intermedio/alto tenía niveles de metilación significativamente superiores al de bajo riesgo. El análisis diferencial (>30% de diferencia, P<0,05) identificó 240 sondas hipermetiladas y 12 hipometiladas en los pacientes de riesgo intermedio/alto, que afectaban a 122 y 3 genes, respectivamente. Los resultados de este análisis, así como del análisis de *hotspot*, nos permitieron identificar genes y regiones que podrían ser de interés. La región con una diferencia más significativa, de acuerdo con el análisis de *hotspot*, correspondía al gen *WT1* y su antisentido *WT1-AS*. Este gen puede actuar como oncogén o como TSG, y juega un papel

en la patogénesis de algunas neoplasias hematológicas (Yang *et al.*, 2007). Además, la hipermetilación de los promotores de *WT1* y *WT1-AS* se ha detectado tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos (Cosialls *et al.*, 2012; Magnani *et al.*, 2015; Stirzaker *et al.*, 2015; Mžik *et al.*, 2016). También se detectó otra región ampliamente metilada en los pacientes con cariotipo de riesgo intermedio/alto en 17q21.2-q21.33. Esta región incluye el *cluster* de genes homeobox *HOXB*, que codifica para una familia de factores de transcripción que se ha visto que juegan un papel en algunas neoplasias tanto mieloides como linfoides (Strathdee *et al.*, 2007; Jost *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2015; Spencer *et al.*, 2015). Otros factores de transcripción detectados incluyen *PAX8*, *NR5A2*, *LMO3*, *PRDM16*, *THRB*, *EVX2*, *TFAP2B*, *TFAP2E*, *PDLIM4*, así como otros genes homeobox (*HOXA2*, *HOXA10*, *HOXC4*, *HOXC9*, *HOXC12*, *HOXD9*, *HOXD10*).

Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la metilación aberrante es un proceso progresivo que aumenta en estados más avanzados de la enfermedad, como el observado en los pacientes con alteraciones cromosómicas (Jiang *et al.*, 2009). Otra posibilidad es que la metilación aberrante del ADN podría estar desencadenada por la inestabilidad genómica (Figuerola *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

1. El estudio de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético mediante SNP-A muestra que:
 - 1.1. En cuanto a la frecuencia y tipo de alteraciones detectadas:
 - El 67% de los pacientes de la serie presenta alteraciones por SNP-A. En concreto, estas alteraciones afectan al 63% de pacientes con cariotipo normal y al 82% de pacientes con CC no informativa.
 - El 38% de los pacientes presenta CNAs. principalmente ganancias y pérdidas submicroscópicas. El perfil es muy heterogéneo, con unas pocas regiones cromosómicas recurrentemente afectadas: 8p12, 10q21.2, 12p13.2 y 21q22.
 - El 39% de los pacientes presenta regiones con LOH intersticiales y/o teloméricas. Las LOH intersticiales en 4q24-4q35 son frecuentes y afectan al 10% de los pacientes. Los pacientes presentan otras LOH intersticiales recurrentes (4-5%) de interés en 11q13.3-11q25 y 7q32.1-7q36.3.
 - 1.2. El tamaño de genoma afectado y la presencia de regiones con LOH intersticial se asocian con características clínico-biológicas de riesgo adverso, como la leucocitosis, la esplenomegalia y la dependencia transfusional.
 - 1.3. El tamaño de genoma afectado y la presencia de regiones con LOH intersticial se asocian con la SG y la SLP de los pacientes y permiten detectar un subgrupo de pacientes con mal pronóstico. Estas dos variables no tienen un impacto pronóstico independiente a otros factores clínico-biológicos ya conocidos, como la leucocitosis y la dependencia transfusional.
2. El estudio de pacientes con LMMC de bajo riesgo citogenético mediante la secuenciación masiva dirigida de un panel de 83 genes muestra que:
 - 2.1. En cuanto a la frecuencia y tipo de mutaciones detectadas:
 - El 98% de los pacientes presenta al menos una mutación en alguno de los genes estudiados, con una media de 4 mutaciones por paciente.
 - Los genes más frecuentemente mutados son: *TET2* (71%), *ASXL1* (43%), *SRSF2* (36%), *RUNX1* (23%), *ZRSR2* (16%), *CBL* (13%) y *NRAS* (13%). La frecuencia de las mutaciones de *TET2* es superior a la descrita en otras series de pacientes con LMMC, probablemente porque muestra serie se focaliza en pacientes de bajo riesgo citogenético y dicha mutación se asocia a este grupo de pacientes.
 - Los pacientes con LOHs en 4q24, 11q23.3 y 7q36.1 presentaban mutaciones en *TET2*, *CBL* y *EZH2*, respectivamente.
 - El número de alteraciones (detectadas por CC y/o secuenciación) en el momento de la progresión a LMA es significativamente superior al diagnóstico. Los

pacientes que progresan a LMA se caracterizan por la adquisición de mutaciones en genes implicados en vías de señalización, principalmente la vía RAS.

2.2. Las mutaciones en los genes *ASXL1*, *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2* se asocian con características clínico-biológicas de riesgo adverso, como la anemia, la leucocitosis, un mayor porcentaje de blastos en MO o la esplenomegalia.

2.3. En cuanto al impacto pronóstico de las mutaciones detectadas:

- La presencia de mutaciones en los genes *ASXL1*, *EZH2*, *NRAS* y *SRSF2* permite identificar un grupo de pacientes con una SG y SLP inferiores. Cuantas más mutaciones en estos genes de riesgo adverso acumula un paciente, peor es su pronóstico.
- La presencia de mutaciones de riesgo adverso y el CPSS muestran un impacto pronóstico independiente en el análisis multivariado.
- Los pacientes con mutaciones de *TET2* tienen una SLP significativamente superior. Los dos factores pronóstico con valor independiente en el análisis multivariado de la SLP son el CPSS y las mutaciones de *TET2*.

3. Del estudio de la metilación del ADN de pacientes con LMMC se ha concluido que:

3.1. En cuanto a las alteraciones en la metilación del ADN en una serie de pacientes con LMMC:

- Los pacientes con LMMC presentan un perfil de metilación distinto al del grupo de controles sanos. Este perfil se caracteriza por la presencia de un gran número de CpGs hipermetiladas que involucran más de 1000 genes distintos.
- Algunas regiones genómicas parecen tener más tendencia a presentar alteraciones en la metilación del ADN. Algunos ejemplos son las regiones 5q31.3-q32, 17q24.3-q25.3 y 6p22.1-p21.2.
- La metilación aberrante del ADN afecta a numerosos genes implicados en la vía de señalización WNT, en la inflamación mediada por vías de señalización de citocinas y quimiocinas, en la vía de señalización PDGF y en la apoptosis. Estas vías podrían estar implicadas en la biología de la LMMC.

3.2. Los pacientes con distintas características clínico-biológicas y genéticas presentan perfiles de metilación distintos. La mayoría de los pacientes que presentan características clínico-biológicas de riesgo adverso comparten un mismo perfil de metilación.

3.3. En cuanto al papel pronóstico de la metilación del ADN en la LMMC:

- El perfil de metilación de los pacientes con LMMC permite identificar dos grupos de pacientes con una SG y una SLP significativamente distintas.

- Los pacientes con una hipometilación del promotor del gen *BCL2* presentan una SG y una SLP inferiores a los pacientes con niveles de metilación de *BCL2* comparables a los controles sanos. La metilación del gen *BCL2* podría suponer un nuevo biomarcador con valor pronóstico en la LMMC.
- 3.4. En cuanto a las diferencias en la metilación del ADN entre pacientes con distinto riesgo citogenético:
- Los pacientes con citogenética de riesgo intermedio/alto presentan niveles de metilación superiores a los pacientes de bajo riesgo citogenético.
 - Numerosos factores de transcripción, como los genes *WT1* y los que forman el cluster *HOXB*, se encuentran más metilados en los pacientes con citogenética de riesgo intermedio/alto, en comparación con los pacientes de bajo riesgo citogenético.

BIBLIOGRAFIA

Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, Beran M, Gilliland DG, Levine RL and Tefferi A (2011a) Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25** 1200–1202.

Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL and Tefferi A (2011b) DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25** 1219–1220.

Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R et al. (2012) ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* **22** 180–193.

Ademà V, Hernández JM, Abáigar M, Lumberras E, Such E, Calull A, Dominguez E, Arenillas L, Mallo M, Cervera J et al. (2013) Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: does -7/7q- detection by FISH have prognostic value? *Leukemia Research* **37** 416–421.

Adès L, Sekeres MA, Wolfromm A, Teichman ML, Tiu RV, Itzykson R, Maciejewski JP, Dreyfus F, List AF, Fenaux P et al. (2013) Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. *Leukemia Research* **37** 609–613.

Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, Olesen LH and Hokland P (2006) Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *European Journal of Haematology* **76** 23–32.

Alsahlawi A, Alkhateeb H, Patnaik M, Begna K, Elliott M, Hogan WJ, Litzow M and Al-Kali A (2015) Monosomal karyotype predicts adverse prognosis in patients diagnosed with chronic myelomonocytic leukemia: a single-institution experience. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* **15** e39–41.

Antequera F and Bird A (1999) CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Current Biology: CB* **9** R661–667.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M and Vardiman JW (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127** 2391–2405.

Aribi A, Borthakur G, Ravandi F, Shan J, Davisson J, Cortes J and Kantarjian H (2007) Activity of decitabine, a hypomethylating agent, in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* **109** 713–717.

Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A, Bataille A, Martin L, Yan K-P, Fenaux P et al. (2011) Transcription intermediary factor 1γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* **121** 2361–2370.

Aul C, Gattermann N, Heyll A, Germing U, Derigs G and Schneider W (1992) Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia* **6** 52–59.

Aul C, Bowen, DT. and Yoshida, Y. (1998) Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **83** 71–86.

Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, Chang X, Hastie RB, Togher SM, Lähdesmäki H and Rao A (2015) Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nature Communications* **6** 7307.

Ballestar E and Esteller M (2002) The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* **23** 1103–1109.

Bastie J-N, Aucagne R, Droin N, Solary E and Delva L (2012) Heterogeneity of molecular markers in chronic myelomonocytic leukemia: a disease associated with several gene alterations. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **69** 2853–2861.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet (London, England)* **365** 1054–1061.

Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D et al. (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine* **364** 2496–2506.

Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, Wang H, Caughey B, Stojanov P, Getz G et al. (2014) TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* **124** 2705–2712.

Bench AJ, Cross NC, Huntly BJ, Nacheva EP and Green AR (2001) Myeloproliferative disorders. *Best Practice & Research. Clinical Haematology* **14** 531–551.

Bennett JM (2013) The myelodysplastic syndromes: a personal recollection of four decades of classification and prognostic scoring systems. *Leukemia & Lymphoma* **54** 2588–2591.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology* **33** 451–458.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* **51** 189–199.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick H, Sultan C and Cox C (1994) The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *British Journal of Haematology* **87** 746–754.

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR et al. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456** 53–59.

Beran M, Estey E, O'Brien SM, Giles FJ, Koller CA, Kornblau S, Keating M and Kantarjian HM (1998) Results of topotecan single-agent therapy in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **31** 521–531.

Beran M, Estey E, O'Brien S, Cortes J, Koller CA, Giles FJ, Kornblau S, Andreeff M, Vey N, Pierce SR et al. (1999) Topotecan and cytarabine is an active combination regimen in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **17** 2819–2830.

Block M, Jacobson LO and Bethard WF (1953) Preleukemic acute human leukemia. *Journal of the American Medical Association* **152** 1018–1028.

Bock C (2012) Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nature Reviews. Genetics* **13** 705–719.

Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* **49** 4682–4689.

Boulwood J and Wainscoat JS (2007) Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *British Journal of Haematology* **138** 3–11.

Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L et al. (2010) Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **24** 1062–1065.

Bouska A, Zhang W, Gong Q, Iqbal J, Scuto A, Vose J, Ludvigsen M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC et al. (2017) Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. *Leukemia* **31** 83–91.

Braun T, Itzykson R, Renneville A, de Renzis B, Dreyfus F, Laribi K, Bouabdallah K, Vey N, Toma A, Recher C et al. (2011) Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood* **118** 3824–3831.

Breccia M, Latagliata R, Mengarelli A, Biondo F, Mandelli F and Alimena G (2004) Prognostic factors in myelodysplastic and myeloproliferative types of chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 83 patients from a single institution. *Haematologica* **89** 866–868.

Bullinger L, Ehrich M, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Nelson MR and van den Boom D (2010) Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood* **115** 636–642.

Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, Wang L, Wei M, Arnoczky KJ, Marburger TB, Wen J, Perrotti D, Bloomfield CD et al. (2007) Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood* **110** 1022–1024.

Cambier N, Wattel E, Menot ML, Guerci A, Chomienne C and Fenaux P (1996) All-trans retinoic acid in adult chronic myelomonocytic leukemia: results of a pilot study. *Leukemia* **10** 1164–1167.

Catalano L, Improta S, de Laurentiis M, Molica S, Majolino I, Musto P, Fragasso A, De Placido S and Rotoli B (1996) Prognosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **81** 324–329.

Cazzola M, Malcovati L and Invernizzi R (2011) Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2011** 264–272.

Cervera N, Itzykson R, Coppin E, Prebet T, Murati A, Legall S, Vey N, Solary E, Birnbaum D and Gelsi-Boyer V (2014) Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia. *American Journal of Hematology* **89** 604–609.

Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet J-P, Ahmann GJ, Adli M et al. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471** 467–472.

Chen J, Odenike O and Rowley JD (2010) Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nature Reviews. Cancer* **10** 23–36.

Cheng H, Kirtani VG and Gergis U (2012) Current status of allogeneic HST for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* **47** 535–541.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL and Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research* **22** 2990–2997.

Cosialls AM, Santidrián AF, Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, González-Gironès DM, Pérez-Perarnau A, Rubio-Patiño C, González-Barca E, Alonso E, Pons G et al. (2012) Epigenetic profile in chronic lymphocytic leukemia using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Epigenomics* **4** 491–501.

Costa R, Abdulhaq H, Haq B, Shaddock RK, Latsko J, Zenati M, Atem FD, Rossetti JM, Sahovic EA and Lister J (2011) Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* **117** 2690–2696.

Cui Y, Tong H, Du X, Li B, Gale RP, Qin T, Liu J, Xu Z, Zhang Y, Huang G et al. (2015) Impact of TET2, SRSF2, ASXL1 and SETBP1 mutations on survival of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Experimental Hematology & Oncology* **4** 14.

Cui Y, Tong H, Du X, Li B, Gale RP, Qin T, Liu J, Xu Z, Zhang Y, Huang G et al. (2016) TET2 mutations were predictive of inferior prognosis in the presence of ASXL1 mutations in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Stem Cell Investigation* **3** 50.

Czader M and Orazi A (2009) Therapy-related myeloid neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology* **132** 410–425.

Damm F, Itzykson R, Kosmider O, Droin N, Renneville A, Chesnais V, Gelsi-Boyer V, de Botton S, Vey N, Preudhomme C et al. (2013) SETBP1 mutations in 658 patients with myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and secondary acute myeloid leukemias. *Leukemia* **27** 1401–1403.

Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Köhler G, Wijermans P, Jones PA and Lübbert M (2002) Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* **100** 2957–2964.

Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, Denis H, Sotiriou C and Fuks F (2011) Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. *Epigenomics* **3** 771–784.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic J-P, Robert F, Alberdi A et al. (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine* **360** 2289–2301.

DiNardo CD, Daver N, Jain N, Pemmaraju N, Bueso-Ramos C, Yin CC, Pierce S, Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM et al. (2014) Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable (MDS/MPN, U): natural history and clinical outcome by treatment strategy. *Leukemia* **28** 958–961.

Dinmohamed AG, van Norden Y, Visser O, Posthuma EFM, Huijgens PC, Sonneveld P, van de Loosdrecht AA and Jongen-Lavrencic M (2015) The use of medical claims to assess incidence, diagnostic procedures and initial treatment of myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia in the Netherlands. *Leukemia Research* **39** 177–182.

Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, Sekeres MA, Wang XF, McDevitt MA and Maciejewski JP (2008) 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Research* **68** 10349–10357.

Eissa H, Gooley TA, Sorrow ML, Nguyen F, Scott BL, Doney K, Loeb KR, Martin PJ, Pagel JM, Radich JP et al. (2011) Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: relapse-free survival is determined by karyotype and comorbidities. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **17** 908–915.

Elena C, Gallì A, Such E, Meggendorfer M, Germing U, Rizzo E, Cervera J, Molteni E, Fasan A, Schuler E et al. (2016) Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **128** 1408–1417.

Elliott MA, Tefferi A, Hogan WJ, Letendre L, Gastineau DA, Ansell SM, Dispenzieri A, Gertz MA, Hayman SR, Inwards DJ et al. (2006) Allogeneic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusions for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* **37** 1003–1008.

Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A et al. (2010) Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics* **42** 722–726.

Esteller M (2003) Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* **109** 80–88.

Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine* **358** 1148–1159.

Esteller M and Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *The Journal of Pathology* **196** 1–7.

Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaurs-Barrière C, Bignon YJ, Ramus S et al. (2001) DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human Molecular Genetics* **10** 3001–3007.

Fandy TE, Herman JG, Kerns P, Jiemjit A, Sugar EA, Choi S-H, Yang AS, Aucott T, Dausers T, Odchimar-Reissig R et al. (2009) Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood* **114** 2764–2773.

Feinberg AP and Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews. Cancer* **4** 143–153.

Feldman EJ, Cortes J, DeAngelo DJ, Holyoake T, Simonsson B, O'Brien SG, Reiffers J, Turner AR, Roboz GJ, Lipton JH et al. (2008) On the use of lonafarnib in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* **22** 1707–1711.

Fianchi L, Criscuolo M, Breccia M, Maurillo L, Salvi F, Musto P, Mansueto G, Gaidano G, Finelli C, Aloe-Spiriti A et al. (2013) High rate of remissions in chronic myelomonocytic leukemia treated with 5-azacytidine: results of an Italian retrospective study. *Leukemia & Lymphoma* **54** 658–661.

Figuroa ME, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy TE, Paietta E, Fernandez H, Tallman MS, Greally JM, Carraway H et al. (2009) MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* **114** 3448–3458.

Figuroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L et al. (2010) DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **17** 13–27.

Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S, Clissa C, Bosi C, Testoni N, Chiarini F, Ramazzotti G, Baccarani M, Martelli AM et al. (2009) Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** 16811–16816.

Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S et al. (2015) COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research* **43** D805–811.

Fugazza G, Bruzzone R, Dejana AM, Gobbi M, Ghio R, Patrone F, Rattenni S and Sessarego M (1995) Cytogenetic clonality in chronic myelomonocytic leukemia studied with fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* **9** 109–114.

Gabriel AS, Lafta FM, Schwalbe EC, Nakjang S, Cockell SJ, Iliasova A, Enshaei A, Schwab C, Rand V, Clifford SC et al. (2015) Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics* **10** 717–726.

Galm O, Herman JG and Baylin SB (2006) The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Reviews* **20** 1–13.

Ganguly BB and Kadam NN (2016) Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **769** 47–62.

Gao Y-B, Chen Z-L, Li J-G, Hu X-D, Shi X-J, Sun Z-M, Zhang F, Zhao Z-R, Li Z-T, Liu Z-Y et al. (2014) Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. *Nature Genetics* **46** 1097–1102.

Garcia-Manero G, Gore SD, Cogle C, Ward R, Shi T, Macbeth KJ, Laille E, Giordano H, Sakoian S, Jabbour E et al. (2011) Phase I study of oral azacitidine in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **29** 2521–2527.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Aceto N, Remy V, Pinson S, Houdayer C, Arnoulet C, Sainy D, Bentires-Alj M et al. (2008) Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer* **8** 299.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccioni N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainy D et al. (2009) Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* **145** 788–800.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccioni N, Esterni B, Finetti P, Murati A, Arnoulet C, Zerazhi H et al. (2010) ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* **151** 365–375.

Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci M-J and Birnbaum D (2012) Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of Hematology & Oncology* **5** 12.

Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M et al. (2014) Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England Journal of Medicine* **371** 2477–2487.

Gerhartz HH, Marcus R, Delmer A, Zwierzina H, Suci S, Dardenne M, Solbu G, de Witte T, Jacobs A and Visani G (1994) A randomized phase II study of low-dose cytosine arabinoside (LD-AraC) plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) in myelodysplastic syndromes (MDS) with a high risk of developing leukemia. EORTC Leukemia Cooperative Group. *Leukemia* **8** 16–23.

Germing U, Gattermann N, Minning H, Heyll A and Aul C (1998) Problems in the classification of CMML--dysplastic versus proliferative type. *Leukemia Research* **22** 871–878.

Germing U, Strupp C, Aivado M and Gattermann N (2002) New prognostic parameters for chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **100** 731–732; author reply 732–733.

Germing U, Kündgen A and Gattermann N (2004) Risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia & Lymphoma* **45** 1311–1318.

Germing U, Strupp C, Knipp S, Kuendgen A, Giagounidis A, Hildebrandt B, Aul C, Haas R, Gattermann N and Bennett JM (2007) Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. *Haematologica* **92** 974–977.

Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T and Jacob ST (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Molecular and Cellular Biology* **25** 4727–4741.

Gondek LP, Tiu R, Haddad AS, O’Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS and Maciejewski JP (2007) Single nucleotide polymorphism arrays complement metaphase cytogenetics in detection of new chromosomal lesions in MDS. *Leukemia* **21** 2058–2061.

Gondek LP, Tiu R, O’Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS and Maciejewski JP (2008) Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* **111** 1534–1542.

González-Medina I, Bueno J, Torrequebrada A, López A, Vallespí T and Massagué I (2002) Two groups of chronic myelomonocytic leukaemia: myelodysplastic and myeloproliferative. Prognostic implications in a series of a single center. *Leukemia Research* **26** 821–824.

Goodwin S, McPherson JD and McCombie WR (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews. Genetics* **17** 333–351.

Gorczyca W (2004) Flow cytometry immunophenotypic characteristics of monocytic population in acute monocytic leukemia (AML-M5), acute myelomonocytic leukemia (AML-M4), and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Methods in Cell Biology* **75** 665–677.

Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, Grever M, Galm O, Dausers T, Karp JE et al. (2006) Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Research* **66** 6361–6369.

Greaves M (2015) Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discovery* **5** 806–820.

Greaves M and Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* **481** 306–313.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D et al. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89** 2079–2088.

Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F et al. (2012) Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **120** 2454–2465.

Gresham D, Dunham MJ and Botstein D (2008) Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nature Reviews. Genetics* **9** 291–302.

Grignano E, Mekinian A, Braun T, Liozon E, Hamidou M, Decaux O, Puéchal X, Kahn JE, Schoindre Y, Rossignol J et al. (2016) Autoimmune and inflammatory diseases associated with chronic myelomonocytic leukemia: A series of 26 cases and literature review. *Leukemia Research* **47** 136–141.

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK and National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116** 354–365.

Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, Haferlach C, Kern W, Cross NCP, Haferlach T and Schnittger S (2011) Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia* **25** 877–879.

Grövdal M, Karimi M, Khan R, Aggerholm A, Antunovic P, Astermark J, Bernell P, Engström L-M, Kjeldsen L, Linder O et al. (2010) Maintenance treatment with azacytidine for patients with high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) or acute myeloid leukaemia following MDS in complete remission after induction chemotherapy. *British Journal of Haematology* **150** 293–302.

Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R, Chen C, Li X, Zhou L et al. (2011) Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature Genetics* **43** 875–878.

Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG and Chee MS (2005) A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nature Genetics* **37** 549–554.

Guru Murthy GS, Dhakal I and Mehta P (2016) Incidence and survival outcomes of chronic myelomonocytic leukemia in the United States. *Leukemia & Lymphoma* 1–7.

Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T and Schmid M (1995) Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *American Journal of Human Genetics* **57** 1143–1150.

Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AAN et al. (2007) New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **110** 4385–4395.

Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T et al. (2014) Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28** 241–247.

Hamilton-Paterson JL (1949) Pre-leukaemic anaemia. *Acta Haematologica* **2** 309–316.

Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, Neuberg D, Kornblau SM, Issa J-P, Gilliland DG et al. (2009) Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* **23** 1605–1613.

Heller G, Topakian T, Altenberger C, Cerny-Reiterer S, Herndlhofer S, Ziegler B, Datlinger P, Byrgazov K, Bock C, Mannhalter C et al. (2016) Next-generation sequencing identifies major DNA methylation changes during progression of Ph+ chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **30** 1861–1868.

Hellström-Lindberg E (1995) Efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta-analysis of 205 patients from 17 studies. *British Journal of Haematology* **89** 67–71.

Van der Helm LH, Alhan C, Wijermans PW, van Marwijk Kooy M, Schaafsma R, Biemond BJ, Beeker A, Hoogendoorn M, van Rees BP, de Weerd O et al. (2011) Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) and acute myeloid leukaemia (AML) patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. *British Journal of Haematology* **155** 599–606.

Hirsch-Ginsberg C, LeMaistre AC, Kantarjian H, Talpaz M, Cork A, Freireich EJ, Trujillo JM, Lee MS and Stass SA (1990) RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-

negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **76** 1214–1219.

Ho AS, Kannan K, Roy DM, Morris LGT, Ganly I, Katabi N, Ramaswami D, Walsh LA, Eng S, Huse JT et al. (2013) The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nature Genetics* **45** 791–798.

Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Takeuchi K, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K and Hirai H (2000) Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood* **96** 3154–3160.

Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC and Zhang Y (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466** 1129–1133.

Itzykson R and Solary E (2013) An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* **27** 1441–1450.

Itzykson R, Itzkson R, Fenaux P and Solary E (2013a) Chronic myelomonocytic leukemia: myelodysplastic or myeloproliferative? *Best Practice & Research. Clinical Haematology* **26** 387–400.

Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, Berthon C, Adès L, Fenaux P, Beyne-Rauzy O et al. (2013b) Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **31** 2428–2436.

Jädersten M, Montgomery SM, Dybedal I, Porwit-MacDonald A and Hellström-Lindberg E (2005) Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood* **106** 803–811.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H and Vardiman JW (2001) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC.

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A et al. (2014) Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England Journal of Medicine* **371** 2488–2498.

Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA and Maciejewski JP (2009) Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113** 6403–6410.

Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, Visconte V, Sugimoto Y, Prince C, O'Keefe C et al. (2011) Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* **118** 3932–3941.

Jenuwein T and Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)* **293** 1074–1080.

Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekeres M, Saunthararajah Y and Maciejewski JP (2009) Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* **113** 1315–1325.

Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T and Liu YC (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science (New York, N.Y.)* **286** 309–312.

Jost E, Lin Q, Weidner CI, Wilop S, Hoffmann M, Walenda T, Schemionek M, Herrmann O, Zenke M, Brümmendorf TH et al. (2014) Epimutations mimic genomic mutations of DNMT3A in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **28** 1227–1234.

Kantarjian H, Issa J-PJ, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek V, Slack J, de Castro C, Ravandi F et al. (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* **106** 1794–1803.

Kantidakis T, Saponaro M, Mitter R, Horswell S, Kranz A, Boeing S, Aygün O, Kelly GP, Matthews N, Stewart A et al. (2016) Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress and genome instability. *Genes & Development* **30** 408–420.

Kar SA, Jankowska A, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, Muramatsu H, Traina F, Afable M, Guinta K et al. (2013) Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **98** 107–113.

Kennedy JA and Ebert BL (2017) Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **35** 968–974.

Kerbaui DMB, Chyou F, Gooley T, Sorror ML, Scott B, Pagel JM, Myerson D, Appelbaum FR, Storb R and Deeg HJ (2005) Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **11** 713–720.

Kim SJ, Zhao H, Hardikar S, Singh AK, Goodell MA and Chen T (2013) A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. *Blood* **122** 4086–4089.

Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R et al. (2010) Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468** 839–843.

Kohlmann A, Grossmann V, Klein H-U, Schindela S, Weiss T, Kazak B, Dicker F, Schnittger S, Dugas M, Kern W et al. (2010) Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **28** 3858–3865.

Kon A, Shih L-Y, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R et al. (2013) Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature Genetics* **45** 1232–1237.

Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racœur C, Jooste V, Vey N, Quesnel B, Fenaux P, Bastie J-N, Beyne-Rauzy O et al. (2009) TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **94** 1676–1681.

Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Quesnel B, Hunault-Berger M, Slama B, Vey N, Lacombe C et al. (2010) Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **24** 1094–1096.

Krishnamurthy P, Lim ZY, Nagi W, Kenyon M, Mijovic A, Ireland R, Marsh J, Ho AYL, Mufti GJ and Pagliuca A (2010) Allogeneic haematopoietic SCT for chronic myelomonocytic leukaemia: a single-centre experience. *Bone Marrow Transplantation* **45** 1502–1507.

Kröger N, Zabelina T, Guardiola P, Runde V, Sierra J, Van Biezen A, Niederwieser D, Zander AR and De Witte T (2002) Allogeneic stem cell transplantation of adult chronic myelomonocytic leukaemia. A report on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the

European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *British Journal of Haematology* **118** 67–73.

Kuo M-C, Liang D-C, Huang C-F, Shih Y-S, Wu J-H, Lin T-L and Shih L-Y (2009) RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia* **23** 1426–1431.

Kurdyukov S and Bullock M (2016) DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* **5**.

Laborde RR, Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Knudson RA, Ketterling RP, Pardanani A and Tefferi A (2013) SETBP1 mutations in 415 patients with primary myelofibrosis or chronic myelomonocytic leukemia: independent prognostic impact in CMML. *Leukemia* **27** 2100–2102.

Lajtha LG (1963) ON THE CONCEPT OF THE CELL CYCLE. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **62** SUPPL1:143–145.

Lehmann U, Brakensiek K and Kreipe H (2004) Role of epigenetic changes in hematological malignancies. *Annals of Hematology* **83** 137–152.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7** 387–397.

Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J et al. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* **363** 2424–2433.

Li Z, Cai X, Cai C-L, Wang J, Zhang W, Petersen BE, Yang F-C and Xu M (2011) Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* **118** 4509–4518.

Li W, Morrone K, Kambhampati S, Will B, Steidl U and Verma A (2016a) Thrombocytopenia in MDS: epidemiology, mechanisms, clinical consequences and novel therapeutic strategies. *Leukemia* **30** 536–544.

Li J, Huang KL, Zhang T, Li H, Zhao J and Wang H (2016b) Pan-cancer methylation and expression profiling of adenocarcinomas revealed epigenetic silencing in the WNT signaling pathway. *Neoplasia* **63** 208–214.

Liu S, Chen X, Chen R, Wang J, Zhu G, Jiang J, Wang H, Duan S and Huang J (2017) Diagnostic role of Wnt pathway gene promoter methylation in non small cell lung cancer. *Oncotarget*.

Ma X, Wang Y-W, Zhang MQ and Gazdar AF (2013) DNA methylation data analysis and its application to cancer research. *Epigenomics* **5** 301–316.

Maciejewski JP and Mufti GJ (2008) Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematological malignancies. *Blood* **112** 965–974.

Maciejewski JP, Tiu RV and O’Keefe C (2009) Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *British Journal of Haematology* **146** 479–488.

Magnani G, Furlan D, Sahnane N, Reggiani Bonetti L, Domati F and Pedroni M (2015) Molecular Features and Methylation Status in Early Onset (≤ 40 Years) Colorectal Cancer: A Population Based, Case-Control Study. *Gastroenterology Research and Practice* **2015** 132190.

Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, Dunbar A, Tiu R, Huh J, Muramatsu H, O’Keefe C, Hsi E, Paquette RL et al. (2009) Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **27** 6109–6116.

Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, Przychodzen B, Bupathi M, Guinta K, Afable MG et al. (2012) Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* **119** 3203–3210.

Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Suzuki H, Przychodzen B, Nagata Y, Meggendorfer M, Sanada M et al. (2017) Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics* **49** 204–212.

Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulton J, Della Porta MG, Pascutto C, Travaglino E, Groves MJ, Godfrey AL, Ambaglio I et al. (2011) Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118** 6239–6246.

Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Gallì A, Della Porta MG, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, Ubezio M et al. (2014) Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood* **124** 1513–1521.

Mallo M, Del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoiz MJ, Pedro C, Jerez A, Maciejewski J, Costa D et al. (2013) Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *British Journal of Haematology* **162** 74–86.

Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD et al. (2009) Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England Journal of Medicine* **361** 1058–1066.

Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Agirre X, Alvarez S, Brüggemann M, Bug S, Calasanz MJ, Deckert M et al. (2009) A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One* **4** e6986.

Maschek H, Georgii A, Kaloutsi V, Werner M, Bandekar K, Kressel MG, Choritz H, Freund M and Hufnagl D (1992) Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a retrospective study of 352 patients. *European Journal of Haematology* **48** 208–214.

Mason CC, Khorashad JS, Tantravahi SK, Kelley TW, Zabriskie MS, Yan D, Pomictter AD, Reynolds KR, Eiring AM, Kronenberg Z et al. (2016) Age-related mutations and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* **30** 906–913.

Maxam AM and Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** 560–564.

McCullough KB and Patnaik MM (2015) Chronic Myelomonocytic Leukemia: a Genetic and Clinical Update. *Current Hematologic Malignancy Reports* **10** 292–302.

Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S et al. (2012) SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* **120** 3080–3088.

Mekinian A, Grignano E, Braun T, Decaux O, Liozon E, Costedoat-Chalumeau N, Kahn J-E, Hamidou M, Park S, Puéchal X et al. (2016) Systemic inflammatory and autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia: a French multicentre retrospective study. *Rheumatology (Oxford, England)* **55** 291–300.

Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol J-B, Selimoglu-Buet D, Masala E, Allione B, Gioia D et al. (2015) Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* **125** 1857–1872.

Merlevede J, Droin N, Qin T, Meldi K, Yoshida K, Morabito M, Chautard E, Auboeuf D, Fenaux P, Braun T et al. (2016) Mutation allele burden remains unchanged in chronic myelomonocytic leukaemia responding to hypomethylating agents. *Nature Communications* **7** 10767.

Miescher PA and Farguet JJ (1974) Chronic myelomonocytic leukemia in adults. *Seminars in Hematology* **11** 129–139.

Milani L, Lundmark A, Kiialainen A, Nordlund J, Flaegstad T, Forestier E, Heyman M, Jonmundsson G, Kanerva J, Schmiegelow K et al. (2010) DNA methylation for subtype classification and prediction of treatment outcome in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115** 1214–1225.

Mittal P, Saliba RM, Giralto SA, Shahjahan M, Cohen AI, Karandish S, Onida F, Beran M, Champlin RE and de Lima M (2004) Allogeneic transplantation: a therapeutic option for myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and Philadelphia-negative/BCR-ABL-negative chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplantation* **33** 1005–1009.

Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y and Ohki M (1991) t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88** 10431–10434.

Modi Y, Shaaban H, Gauchan D and Maroules M (2015) Successful treatment of severe thrombocytopenia with the use of thrombopoietin receptor agonist eltrombopag in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners* **21** 74–75.

Mohamedali A, Gäken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC, Hayden J, Donaldson N, Aul C, Gattermann N et al. (2007) Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* **110** 3365–3373.

Molica S, Iannaccaro P and Alberti A (1990) Chronic myelomonocytic leukemia: a test of a proposed staging system. *American Journal of Hematology* **35** 129–130.

Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Patel J, Zhao X et al. (2011) Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20** 11–24.

Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M et al. (2011) Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* **476** 298–303.

Moyo V, Lefebvre P, Duh MS, Yektashenas B and Mundle S (2008) Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Annals of Hematology* **87** 527–536.

Mufti GJ, Stevens JR, Oscier DG, Hamblin TJ and Machin D (1985) Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. *British Journal of Haematology* **59** 425–433.

Mullighan CG (2014) The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2014** 174–180.

Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, Heatley SL, Holmfeldt L, Collins-Underwood JR, Ma J et al. (2011) CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **471** 235–239.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51 Pt 1** 263–273.

Mund C, Hackanson B, Stresemann C, Lübbert M and Lyko F (2005) Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Research* **65** 7086–7090.

Mžik M, Chmelařová M, John S, Laco J, Slabý O, Kiss I, Bohovicová L, Palička V and Nekvindová J (2016) Aberrant methylation of tumour suppressor genes WT1, GATA5 and PAX5 in hepatocellular carcinoma. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **54** 1971–1980.

Nösslinger T, Reisner R, Grüner H, Tüchler H, Nowotny H, Pittermann E and Pfeilstöcker M (2001) Dysplastic versus proliferative CMML--a retrospective analysis of 91 patients from a single institution. *Leukemia Research* **25** 741–747.

Novak P, Jensen T, Oshiro MM, Watts GS, Kim CJ and Futscher BW (2008) Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Research* **68** 8616–8625.

Ocheni S, Kröger N, Zabelina T, Zander AR and Bacher U (2009) Outcome of allo-SCT for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* **43** 659–661.

Ogawa M (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81** 2844–2853.

Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, Glassman AB, Albitar M, Kwari MI and Beran M (2002) Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* **99** 840–849.

Onida F, Barosi G, Leone G, Malcovati L, Morra E, Santini V, Specchia G and Tura S (2013) Management recommendations for chronic myelomonocytic leukemia: consensus statements from the SIE, SIES, GITMO groups. *Haematologica* **98** 1344–1352.

Orazi A, Chiu R, O'Malley DP, Czader M, Allen SL, An C and Vance GH (2006) Chronic myelomonocytic leukemia: The role of bone marrow biopsy immunohistology. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **19** 1536–1545.

Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K et al. (1999) Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood* **93** 1817–1824.

Osca-Gelis G, Puig-Vives M, Saez M, Gallardo D, Solé F and Marcos-Gragera R (2012) Incidence and survival of chronic myelomonocytic leukemia in Girona (Spain): a population-based study, 1993-2007. *Leukemia Research* **36** 1262–1266.

Ouyang Y, Qiao C, Chen Y and Zhang S-J (2017) Clinical significance of CSF3R, SRSF2 and SETBP1 mutations in chronic neutrophilic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget*.

Padron E, Garcia-Manero G, Patnaik MM, Itzykson R, Lasho T, Nazha A, Rampal RK, Sanchez ME, Jabbour E, Al Ali NH et al. (2015) An international data set for CMML validates

prognostic scoring systems and demonstrates a need for novel prognostication strategies. *Blood Cancer Journal* **5** e333.

Padron E, Dezern A, Andrade-Campos M, Vaddi K, Scherle P, Zhang Q, Ma Y, Balasis ME, Tinsley S, Ramadan H et al. (2016) A Multi-Institution Phase I Trial of Ruxolitinib in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **22** 3746–3754.

Palomo L, Zamora L, Xicoy B, Cortés M, Cabezón M, Torrent A, Feliu E, Millá F and Ribera J-M (2013) Chronic myelomonocytic leukemia diagnosed by means of mutational analysis in a patient with persistent monocytosis and tuberculosis. *Leukemia & Lymphoma* **54** 2297–2298.

Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat JS, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C et al. (2011) Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *The New England Journal of Medicine* **365** 1384–1395.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A et al. (2013) Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122** 3616–3627; quiz 3699.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N et al. (2016) Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* **374** 2209–2221.

Park S, Labopin M, Yakoub-Agha I, Delaunay J, Dhedin N, Deconinck E, Michallet M, Robin M, De Revel T, Bernard M et al. (2013) Allogeneic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *European Journal of Haematology* **90** 355–364.

Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, Kasper LH, Lerach S, Tang H, Ma J et al. (2011) Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **471** 189–195.

Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D and Ramsahoye B (2010) Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Research* **38** 4313–4324.

Patel B, Przychodzen B, Thota S, Radivoyevitch T, Visconte V, Kuzmanovic T, Clemente M, Hirsch C, Morawski A, Souaid R et al. (2017) Genomic determinants of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*.

Patnaik MM and Tefferi A (2016) Chronic myelomonocytic leukemia: 2016 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology* **91** 631–642.

Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Al-kali A. et al. (2013a) Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia* **27** 1504–1510.

Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Pardanani A and Tefferi A (2013b) Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *American Journal of Hematology* **88** 201–206.

Patnaik MM, Parikh SA, Hanson CA and Tefferi A (2014a) Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. *British Journal of Haematology* **165** 273–286.

Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, Knudson RA, Ketterling RP, Tefferi A and Solary E (2014b) ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia* **28** 2206–2212.

Patnaik MM, Wassie EA, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling R and Tefferi A (2015a) Blast transformation in chronic myelomonocytic leukemia: Risk factors, genetic features, survival, and treatment outcome. *American Journal of Hematology* **90** 411–416.

Patnaik MM, Wassie EA, Padron E, Onida F, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP et al. (2015b) Chronic myelomonocytic leukemia in younger patients: molecular and cytogenetic predictors of survival and treatment outcome. *Blood Cancer Journal* **5** e280.

Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N and Tefferi A (2016a) Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer Journal* **6** e385.

Patnaik MM, Zahid MF, Lasho TL, Finke C, Ketterling RL, Gangat N, Robertson KD, Hanson CA and Tefferi A (2016b) Number and type of TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia and their clinical relevance. *Blood Cancer Journal* **6** e472.

Patnaik MM, Barraco D, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N and Tefferi A (2017) DNMT3A mutations are associated with inferior overall and leukemia-free survival in chronic myelomonocytic leukemia. *American Journal of Hematology* **92** 56–61.

Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, Plenker D, Leenders F, Sun R, Zander T et al. (2012) Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature Genetics* **44** 1104–1110.

Peker D, Padron E, Bennett JM, Zhang X, Horna P, Epling-Burnette PK, Lancet JE, Pinilla-Ibarz J, Moscinski L, List AF et al. (2015) A close association of autoimmune-mediated processes and autoimmune disorders with chronic myelomonocytic leukemia: observation from a single institution. *Acta Haematologica* **133** 249–256.

Pérez C, Martínez-Calle N, Martín-Subero JI, Segura V, Delabesse E, Fernandez-Mercado M, Garate L, Alvarez S, Rifon J, Varea S et al. (2012) TET2 mutations are associated with specific 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine profiles in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *PloS One* **7** e31605.

Phekoo KJ, Richards MA, Møller H, Schey SA and South Thames Haematology Specialist Committee (2006) The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica* **91** 1400–1404.

Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A, Antolini L, Mologni L, Donadoni C, Papaemmanuil E et al. (2013) Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nature Genetics* **45** 18–24.

Pich A, Riera L, Sismondi F, Godio L, Davico Bonino L, Marmont F and Francia di Celle P (2009) JAK2V617F activating mutation is associated with the myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukaemia. *Journal of Clinical Pathology* **62** 798–801.

Pierre RV and Hoagland HC (1972) Age-associated aneuploidy: loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging. *Cancer* **30** 889–894.

Platzbecker U, Wong RSM, Verma A, Abboud C, Araujo S, Chiou T-J, Feigert J, Yeh S-P, Götze K, Gorin N-C et al. (2015) Safety and tolerability of eltrombopag versus placebo for treatment of thrombocytopenia in patients with advanced myelodysplastic syndromes or acute

myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 1/2 trial. *The Lancet. Haematology* **2** e417–426.

Potapova A, Hasemeier B, Römermann D, Metzigg K, Göhring G, Schlegelberger B, Länger F, Kreipe H and Lehmann U (2010) Epigenetic inactivation of tumour suppressor gene KLF11 in myelodysplastic syndromes*. *European Journal of Haematology* **84** 298–303.

Qu X, Davison J, Du L, Storer B, Stirewalt DL, Heimfeld S, Estey E, Appelbaum FR and Fang M (2015) Identification of differentially methylated markers among cytogenetic risk groups of acute myeloid leukemia. *Epigenetics* **10** 526–535.

Quintas-Cardama A, Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Giles F, Ravandi F, Faderl S, Pierce S, Shan J, Verstovsek S et al. (2006) Activity of 9-nitro-camptothecin, an oral topoisomerase I inhibitor, in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* **107** 1525–1529.

Raddatz G, Gao Q, Bender S, Jaenisch R and Lyko F (2012) Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. *PLoS Genetics* **8** e1003146.

Ramadan H, Duong VH, Al Ali N, Padron E, Zhang L, Lancet JE, List AF and Komrokji RS (2016) Eltrombopag Use in Patients With Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML): A Cautionary Tale. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* **16** Suppl S64–66.

Rauch N, Rukhlenko OS, Kolch W and Kholodenko BN (2016) MAPK kinase signalling dynamics regulate cell fate decisions and drug resistance. *Current Opinion in Structural Biology* **41** 151–158.

Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* **15** 733–747.

Del Rey M, O'Hagan K, Dellett M, Aibar S, Colyer H a. A, Alonso ME, Díez-Campelo M, Armstrong RN, Sharpe DJ, Gutiérrez NC et al. (2013) Genome-wide profiling of methylation identifies novel targets with aberrant hypermethylation and reduced expression in low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **27** 610–618.

Reya T and Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434** 843–850.

Rheingold JJ, Kaufman R, Adelson E and Lear A (1963) Smoldering acute leukemia. *The New England Journal of Medicine* **268** 812–815.

Rhoads CP (1938) REFRACTORY ANEMIA: ANALYSIS OF ONE HUNDRED CASES. *Journal of the American Medical Association* **110** 794.

Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, Lambertenghi Delilieri G, Beran M and Onida F (2010) RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **16** 2246–2256.

Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, Edwards BK and List AF (2008) Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* **112** 45–52.

Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M and Esteller M (2011) Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* **6** 692–702.

Sanger F and Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **94** 441–448.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** 5463–5467.

Saumell S, Solé F, Arenillas L, Montoro J, Valcárcel D, Pedro C, Sanzo C, Luño E, Giménez T, Arnán M et al. (2015) Trisomy 8, a Cytogenetic Abnormality in Myelodysplastic Syndromes, Is Constitutional or Not? *PloS One* **10** e0129375.

Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K et al. (2012) New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **30** 820–829.

Schnittger S, Bacher U, Alpermann T, Reiter A, Ulke M, Dicker F, Eder C, Kohlmann A, Grossmann V, Kowarsch A et al. (2012) Use of CBL exon 8 and 9 mutations in diagnosis of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative disorders: an analysis of 636 cases. *Haematologica* **97** 1890–1894.

Schuler E, Schroeder M, Neukirchen J, Strupp C, Xicoy B, Kündgen A, Hildebrandt B, Haas R, Gattermann N and Germing U (2014) Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leukemia Research* **38** 1413–1419.

Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, Morabito M, Met E, Debord C, Benayoun E et al. (2015) Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **125** 3618–3626.

Sexauer J, Kass L and Schnitzer B (1974) Subacute myelomonocytic leukemia. Clinical, morphologic and ultrastructural studies of 10 cases. *The American Journal of Medicine* **57** 853–861.

Shaffer LG, McGowan-Jordan J and Schmid M (2013) *ISCN2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: Karger.

Shen L and Waterland RA (2007) Methods of DNA methylation analysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **10** 576–581.

Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, Berry D, Ahmed S, Zhu W, Pierce S et al. (2010) DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **28** 605–613.

Shen P, Wang W, Krishnakumar S, Palm C, Chi A-K, Enns GM, Davis RW, Speed TP, Mindrinos MN and Scharfe C (2011) High-quality DNA sequence capture of 524 disease candidate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** 6549–6554.

Siitonen T, Timonen T, Juvonen E, Terävä V, Kutila A, Honkanen T, Mikkola M, Hallman H, Kauppila M, Nyländén P et al. (2007) Valproic acid combined with 13-cis retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **92** 1119–1122.

Da Silva FB, Machado-Neto JA, Bertini VHLL, Velloso EDRP, Ratis CA, Calado RT, Simões BP, Rego EM and Traina F (2017) Single-nucleotide polymorphism array (SNP-A) improves

the identification of chromosomal abnormalities by metaphase cytogenetics in myelodysplastic syndrome. *Journal of Clinical Pathology* **70** 435–442.

Silvennoinen O and Hubbard SR (2015) Molecular insights into regulation of JAK2 in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **125** 3388–3392.

Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM et al. (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **20** 2429–2440.

Simon JA and Lange CA (2008) Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research* **647** 21–29.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB and Hood LE (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321** 674–679.

Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C et al. (2010) Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* **116** 3923–3932.

Solary E and Itzykson R (2017) How I treat chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*.

Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luño E, Prieto F, Granada I, Hernández JM, Cigudosa JC et al. (2000) Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. *British Journal of Haematology* **108** 346–356.

Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Millà F, Ribera JM et al. (2005) Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **90** 1168–1178.

Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Helton NM, Fulton R, O’Laughlin M, Fronick C, Magrini V, Demeter RT, Miller CA et al. (2015) Epigenomic analysis of the HOX gene loci reveals mechanisms that may control canonical expression patterns in AML and normal hematopoietic cells. *Leukemia* **29** 1279–1289.

Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP and Ebert BL (2015) Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126** 9–16.

Stirzaker C, Zotenko E, Song JZ, Qu W, Nair SS, Locke WJ, Stone A, Armstong NJ, Robinson MD, Dobrovic A et al. (2015) Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nature Communications* **6** 5899.

Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, Meyer S, Eden T, Dickinson AM, Mountford JC et al. (2007) Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **13** 5048–5055.

Subari S, Patnaik M, Alfakara D, Gangat N, Elliott M, Hogan W, Litzow M and Al-Kali A (2015) Patients With Therapy-Related CMML Have Shorter Median Overall Survival Than Those

With De Novo CMML: Mayo Clinic Long-Term Follow-Up Experience. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* **15** 546–549.

Subirá D, Font P, Villalón L, Serrano C, Askari E, Góngora E, Castañón S, Gonzalo R, Mata R, Román A et al. (2008) Immunophenotype in chronic myelomonocytic leukemia: is it closer to myelodysplastic syndromes or to myeloproliferative disorders? *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **151** 240–245.

Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespí T, Luño E, Collado R, Calasanz MJ, Hernández-Rivas JM, Cigudosa JC et al. (2011) Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **96** 375–383.

Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, Nomdedeu B, Arenillas L, Luño E, Xicoy B et al. (2013) Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **121** 3005–3015.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW (2008) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC.

Symeonidis A, van Biezen A, de Wreede L, Piciocchi A, Finke J, Beelen D, Bornhäuser M, Cornelissen J, Volin L, Mufti G et al. (2015) Achievement of complete remission predicts outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukaemia. A study of the Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *British Journal of Haematology*.

Syvänen A-C (2005) Toward genome-wide SNP genotyping. *Nature Genetics* **37** Suppl S5–10.

Takahashi K, Pemmaraju N, Strati P, Noguera-Gonzalez G, Ning J, Bueso-Ramos C, Luthra R, Pierce S, Cortes J, Kantarjian H et al. (2013) Clinical characteristics and outcomes of therapy-related chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **122** 2807–2811; quiz 2920.

Tang G, Zhang L, Fu B, Hu J, Lu X, Hu S, Patel A, Goswami M, Khoury JD, Garcia-Manero G et al. (2014) Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *American Journal of Hematology* **89** 813–818.

Tang G, Fu B, Hu S, Lu X, Tang Z, Li S, Jabbar K, Khoury JD, Medeiros LJ and Wang SA (2015) Prognostic impact of acquisition of cytogenetic abnormalities during the course of chronic myelomonocytic leukemia. *American Journal of Hematology* **90** 882–887.

Tefferi A, Lim K-H, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM, Hanson CA, Pardanani A, Gilliland DG and Levine RL (2009) Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* **23** 1343–1345.

Tessema M, Länger F, Dingemans J, Ganser A, Kreipe H and Lehmann U (2003) Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia* **17** 910–918.

Thorpe M, Montalvão A, Pierdomenico F, Moita F and Almeida A (2012) Treatment of chronic myelomonocytic leukemia with 5-Azacytidine: a case series and literature review. *Leukemia Research* **36** 1071–1073.

Thurn KT, Thomas S, Moore A and Munster PN (2011) Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncology (London, England)* **7** 263–283.

Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, Kulasekararaj A, Advani AS, Paquette R, List AF et al. (2011) Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* **117** 4552–4560.

Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, Yokoyama M, Terui Y, Hatake K, Kitagawa M et al. (2017) BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood*.

Vainchenker W and Kralovics R (2017) Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* **129** 667–679.

Valencia-Martinez A, Sanna A, Masala E, Contini E, Brogi A, Gozzini A and Santini V (2017) Mutated ASXL1 and number of somatic mutations as possible indicators of progression to chronic myelomonocytic leukemia of myelodysplastic syndromes with single or multilineage dysplasia. *Haematologica*.

Venditti A, Tamburini A, Buccisano F, Scimò MT, Del Poeta G, Maurillo L, Cox MC, Abruzzese E, Tribalto M, Masi M et al. (2000) A phase-II trial of all trans retinoic acid and low-dose cytosine arabinoside for the treatment of high-risk myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology* **79** 138–142.

Vetro C, Haferlach C, Haferlach T, Zenger M, Nadarajah N, Kern W and Meggendorfer M (2016) Aberrations identified by genomic arrays in normal karyotype CMML can be detected in 40% of patients, but do not add prognostic information to molecular mutations. *Leukemia* **30** 2235–2238.

Viguié F, Aboura A, Bouscary D, Ramond S, Delmer A, Tachdjian G, Marie JP and Casadevall N (2005) Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? *Leukemia* **19** 1411–1415.

VinSheth FJ, Sheth JJ, Patel AI, Shah AD and Verhest A (2002) Usefulness of cytogenetics in leukemias. *Indian Journal of Cancer* **39** 139–142.

Voglová J, Chrobák L, Neuwirtová R, Malasková V and Straka L (2001) Myelodysplastic and myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukemia--distinct subgroups or two stages of the same disease? *Leukemia Research* **25** 493–499.

Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Weizer J, O'Laughlin M et al. (2011) Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25** 1153–1158.

Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, Larson DE, McLellan MD, Dooling D, Abbott R et al. (2012) Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* **366** 1090–1098.

Wang SA, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, Weinzierl E, Hatem J, Jaso J, Kanagal-Shamanna R et al. (2014) Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **123** 2645–2651.

Wang K-H, Lin C-J, Liu C-J, Liu D-W, Huang R-L, Ding D-C, Weng C-F and Chu T-Y (2015) Global methylation silencing of clustered proto-cadherin genes in cervical cancer: serving as diagnostic markers comparable to HPV. *Cancer Medicine* **4** 43–55.

Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE et al. (2010) The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **17** 225–234.

Wassie EA, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Solary E, Tefferi A and Patnaik MM (2014) Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *American Journal of Hematology* **89** 1111–1115.

Wattel E, Guerci A, Hecquet B, Economopoulos T, Copplestone A, Mahé B, Couteaux ME, Resegotti L, Voglova V, Foussard C et al. (1996) A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Français des Myélodysplasies and European CMML Group. *Blood* **88** 2480–2487.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M and Schübeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics* **39** 457–466.

Wijermans PW, Rüter B, Baer MR, Slack JL, Saba HI and Lübbert M (2008) Efficacy of decitabine in the treatment of patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia Research* **32** 587–591.

Wilhelm-Benartzi CS, Koestler DC, Karagas MR, Flanagan JM, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ, Houseman EA and Brown R (2013) Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data. *British Journal of Cancer* **109** 1394–1402.

Woessner and Florensa (2006) *La Citología Óptica En El Diagnóstico Hematológico*. Madrid: Acción Médica.

Wong E, Seymour JF, Kenealy M, Westerman D, Herbert K and Dickinson M (2013) Treatment of chronic myelomonocytic leukemia with azacitidine. *Leukemia & Lymphoma* **54** 878–880.

Woodlock TJ, Seshi B, Sham RL, Cyran EM and Bennett JM (1994) Use of cell surface antigen phenotype in guiding therapeutic decisions in chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia Research* **18** 173–181.

Worsley A, Oscier DG, Stevens J, Darlow S, Figes A, Mufti GJ and Hamblin TJ (1988) Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. *British Journal of Haematology* **68** 17–21.

Wu Q and Maniatis T (1999) A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* **97** 779–790.

Xicoy, Such E, Zamora L, Ballesteros M, Pérez-Rus, G, Bonanad, S, Cervera, J, Díez-Campelo, M, Florensa, L, Valcárcel, D et al. (2012) Guías Españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica: Leucemia mielomonocítica crónica. *Haematologica* **97 (Supl.5)** 40.

Xicoy B, Germing U, Jimenez M-J, Garcia O, Garcia R, Schemenau J, Pedro C, Luño E, Bernal T, González B et al. (2016) Response to erythropoietic-stimulating agents in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *European Journal of Haematology* **97** 33–38.

Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA et al. (2014) Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature Medicine* **20** 1472–1478.

Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ and Kroft SH (2005) Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *American Journal of Clinical Pathology* **124** 799–806.

Yamazaki J, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Shen L, Kantarjian HM, Estecio MR, Jelinek J, Godley LA et al. (2012) Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics* **7** 201–207.

Yamazaki J, Jelinek J, Lu Y, Cesaroni M, Madzo J, Neumann F, He R, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T et al. (2015) TET2 Mutations Affect Non-CpG Island DNA Methylation at Enhancers and Transcription Factor-Binding Sites in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Cancer Research* **75** 2833–2843.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine* **360** 765–773.

Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Saurez Saiz F and Minden MD (2007) A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* **21** 868–876.

Yi JH, Huh J, Kim H-J, Kim S-H, Kim SH, Kim KH, Do YR, Mun Y-C, Kim H, Kim MK et al. (2013) Genome-wide single-nucleotide polymorphism array-based karyotyping in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia and its impact on treatment outcomes following decitabine treatment. *Annals of Hematology* **92** 459–469.

Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M et al. (2011a) Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478** 64–69.

Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih L-Y, Mori H, Koeffler HP and Ogawa S (2011b) A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia* **25** 184–186.

Yu J, Tao Q, Cheng YY, Lee KY, Ng SSM, Cheung KF, Tian L, Rha SY, Neumann U, Röcken C et al. (2009) Promoter methylation of the Wnt/beta-catenin signaling antagonist Dkk-3 is associated with poor survival in gastric cancer. *Cancer* **115** 49–60.

Zahid MF, Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Gangat N, Hanson CA, Tefferi A and Patnaik MM (2016) Spectrum of autoimmune diseases and systemic inflammatory syndromes in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 1–6.

Zhang L, Shin ES, Yu Z and Li S (2007) Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders. *Chinese Medical Journal* **120** 2002–2005.

Zhao X, Yang F, Li S, Liu M, Ying S, Jia X and Wang X (2014) CpG island methylator phenotype of myelodysplastic syndrome identified through genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression. *British Journal of Haematology* **165** 649–658.

ANEXOS

ANEXO 1. TRABAJO III: El perfil de metilación en la LMMC se asocia a características clínicas, biológicas y genéticas

Las anomalías epigenéticas son frecuentes en la LMMC. Se han descrito mutaciones en numerosos reguladores epigenéticos, incluyendo enzimas involucrados en la metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*) y en la modificación de las histonas (*ASXL1*, *EZH2*). En global, estas mutaciones afectan a >60% de los pacientes con LMMC (Gelsi-Boyer *et al.*, 2009; Kosmider *et al.*, 2009; Itzykson *et al.*, 2013b; Elena *et al.*, 2016). Los estudios de la metilación del ADN publicados en la LMMC se centran principalmente en analizar las diferencias entre los pacientes con y sin mutaciones de *TET2* (Ko *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2012; Yamazaki *et al.*, 2012, 2015) o en encontrar marcadores epigenéticos de respuesta al tratamiento con agentes hipometilantes (Braun *et al.*, 2011; Meldi *et al.*, 2015). Todos estos trabajos son, en general, poco concluyentes. En cambio, diversos estudios de metilación en otras neoplasias mieloides, como los SMD, la LMA o la LMC, han demostrado que la metilación del ADN se correlaciona con la presencia de anomalías citogenéticas específicas y con la severidad de la enfermedad (Figuroa *et al.*, 2009, 2010; Jiang *et al.*, 2009; Heller *et al.*, 2016). Además, la hipermetilación de determinados genes se ha asociado con el pronóstico de pacientes con SMD y LMA (Bullinger *et al.*, 2010; Figuroa *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010).

En este trabajo se ha analizado el perfil de metilación del ADN, mediante la técnica de los *microarrays*, de una serie de 64 pacientes con LMMC y de 10 controles sanos (progenitores hematopoyéticos en sangre periférica de donantes emparentados). Mediante un análisis de metilación diferencial, se han identificado alteraciones en la metilación del ADN en pacientes con LMMC, por comparación con el grupo control. También se ha investigado la presencia de regiones en el genoma con una alteración en la metilación consistente en toda la región. Además, las alteraciones en la metilación del ADN se han correlacionado con las características clínico-biológicas y genéticas de los pacientes. Finalmente, se han analizado las diferencias en la metilación entre los pacientes con LMMC de distinto riesgo citogenético.

Alteraciones en la metilación del ADN y presencia de regiones significativamente alteradas en pacientes con LMMC

Primero se llevó a cabo un análisis no supervisado de los datos de metilación del ADN, que segregó en dos grupos las muestras de los pacientes y los controles. El análisis de metilación diferencial entre los pacientes con LMMC (n=64) y el grupo de controles sanos (n=10) permitió identificar 1844 sondas hipermetiladas y 255 hipometiladas en los pacientes con LMMC. Las regiones hipermetiladas éstas afectaban a 1100 genes distintos y a un total de 636 regiones promotoras o reguladoras de la transcripción. El análisis de *hotspot* permitió identificar 14 regiones de 10 Mb en las cuales la metilación del ADN se encontraba significativamente

alterada, entre pacientes y controles, en comparación con otras regiones genómicas. La región más significativa correspondía a 5q31.3, que incluye el *cluster* de 53 genes protocadherina (*PCDH*), que se encontraba hipermetilado en los pacientes. Otras regiones destacadas incluían 17q24.3-q25.3 y 6p22.1-p12.2. Se detectó también una metilación aberrante en genes de la vía de señalización WNT, en genes involucrados en la inflamación mediada por vías de señalización de citocinas y quimiocinas, en la vía de señalización PDGF y en la apoptosis.

Correlación entre las alteraciones en la metilación del ADN y las características clínico-biológicas y genéticas de los pacientes

Se llevó a cabo un análisis de *clusters* jerárquico en los pacientes con LMMC, considerando aquellas sondas más variables entre pacientes y controles. Este análisis identificó dos grupos de pacientes con un perfil de metilación distinto, formados por 25 y 40 pacientes, respectivamente. Estos dos grupos se asociaban con las características clínico-biológicas y genéticas de los pacientes. El Grupo 1 estaba enriquecido en pacientes con características de riesgo adverso, como el subgrupo LMMC-2, la presencia de anemia o trombocitopenia, cariotipos de riesgo intermedio y adverso, y grupos de mayor riesgo según el CPSS. Estos dos grupos también se asociaban con características genéticas concretas, como la presencia de mutaciones en *ZRSR2* (Grupo 1) o las mutaciones en *TET2* y *SRSF2* (Grupo 2). Finalmente, el análisis de supervivencia reveló que el Grupo 1 presentaba una SG y una SLP significativamente inferior al Grupo 2. También se analizó la correlación entre la metilación específica de un grupo de genes y la supervivencia de los pacientes y se observó que la hipometilación del promotor del gen *BCL2* se asociaba con una SG y una SLP inferiores.

Diferencias en la metilación entre pacientes con diferente riesgo citogenético

Finalmente, se realizó un análisis de metilación diferencial entre los grupos de pacientes que presentaban distintas características moleculares y citogenéticas, y se detectaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes de bajo riesgo citogenético (n=50) y el resto de los pacientes (n=14, 7 con citogenética de riesgo intermedio y 7 de alto riesgo). El grupo de riesgo intermedio/alto se caracterizaba por presentar niveles superiores de metilación. Se detectaron 240 sondas hipermetiladas en estos pacientes que correspondían a 122 genes. El 70% de las regiones hipermetiladas correspondía a regiones promotoras o reguladoras de la transcripción. De forma más concreta, se detectó la hipermetilación de numerosos factores de transcripción, incluido el gen *WT1* y su antisentido *WT1-AS*, así como el *cluster* de genes *homeobox HOXB*.

Este estudio ha permitido identificar vías de señalización, así como genes concretos, que podrían jugar un papel en la patogénesis de la LMMC, algunos de los cuales se han descrito en otras neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Mediante este trabajo hemos podido observar que el perfil de metilación del ADN se asocia con las características clínico-biológicas de los pacientes y con la supervivencia. Por tanto, creemos que el estudio de los mecanismos epigenéticos subyacentes a un proceso neoplásico, como la metilación del ADN, puede contribuir al conocimiento de la patogénesis de la enfermedad.

Trabajo III

Palomo L, Malinverni R, Cabezón M, Xicoy B, Arnan M, Coll R, Pomares H, Grau J, Navarro T, Feliu E, Solé F, Buschbeck M, Zamora L. DNA methylation profile in CMML associates with distinct clinical, biological and genetic features. 2017. [Submitted].

El trabajo III se incluye en el **Anexo I**.

ANEXO 2. Presentación en congresos de los trabajos de esta tesis

Trabajo I

- **Palomo L**, Mallo M, Xicoy B, Ademà V, Garcia O, Marcé S, Grau J, Jiménez M.J, Alonso E, Pomares H, Arnan M, Arenillas L, Florensa L, Ayats J, Lemes A, Millá F, Feliu E, Solé F, Zamora L. Contribution of SNP-arrays and mutational studies to diagnosis and prognosis of CMML with low risk cytogenetic features or no metaphases. [Poster]
Congreso: The 12th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. 8-11 de Mayo 2013, Berlin.
- **Palomo L**, Mallo M, Xicoy B, Ademà V, Garcia O, Marcé S, Grau J, Jiménez M.J, Alonso E, Pomares H, Arnan M, Arenillas L, Florensa L, Ayats J, Lemes A, Millá F, Feliu F, Solé F, Zamora L. Contribution of SNP arrays to the diagnosis and prognosis of CMML. A study of patients with low risk cytogenetic features and cases with absence of metaphases. [Poster]
Congreso: 18th Congress of the EHA 2013. 13-16 de Junio 2013, Estocolmo.
- **Palomo L**, Xicoy B, Garcia O, Mallo M, Ademà V, Marcé S, Arnan M, Pomares H, Larrayoz MJ, Calasanz MJ, Ardanaz MT, Maciejewski JP, Huang D, Shih LY, Ogawa S, Sanada M, Lin TL, Lopez-Pavia M, Cervera J, Such E, Coll R, Arenillas L, Grau J, Jiménez MJ, Millá F, Feliu E, Solé F, Zamora L. Utility of SNP Arrays in Chronic Myelomonocytic Leukemia with Low Risk Cytogenetic Features or no Metaphases. [Poster]
Congreso: 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 6-9 de Diciembre 2014, San Diego.

Trabajo II

- **Palomo L**, Xicoy B, Arnan M, Cabezón M, Coll R, Ademà V, Fuster F, Grau J, Jiménez MJ, Pomares H, Marcé S, Armengol MP, Mallo M, Millá F, Feliu E, Solé F, Zamora L. Molecular genetic profiling in chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features. [Poster]
Congreso: 57th ASH Annual Meeting and Exposition. 5-8 de Diciembre 2015, Orlando.

Trabajo III

- **Palomo L**, Malinverni R, Cabezón M, Xicoy B, Arnan M, Coll R, Pomares H, Grau J, Navarro T, Feliu E, Solé F, Buschbeck M, Zamora L. DNA methylation profiling in patients with CMML differs between normal and altered karyotype. [Poster]
Congreso: The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. 4-6 de Mayo 2017, Valencia.

ANEXO 3. Otras publicaciones elaboradas durante la realización de la tesis doctoral

Publicadas como autora

- **Palomo L**, Zamora L, Xicoy B, Cortés M, Cabezón M, Torrent, Feliu E, Millá F, Ribera JM. Chronic myelomonocytic leukaemia diagnosed by means of mutations analysis in a patient with persistent monocytosis and tuberculosis. *Leukemia & Lymphoma*. 2013 Oct;54(10):2297-8. PMID: 23327289. Factor de impacto: 2.605.
- **Palomo L**, Fuster-Tormo F, Alvira D, Ademà V, Armengol MP, Gómez-Marzo P, de Haro N, Mallo M, Xicoy B, Zamora L, Solé F. Inspecting targeted deep sequencing of whole genome amplified DNA versus fresh DNA for somatic mutation detection: A genetic study in myelodysplastic syndrome patients. *Biopreservation and Biobanking*. 2017 Jun 6. doi: 10.1089/bio.2016.0094. [Epub ahead of print]. PMID: 28586236. Factor de impacto (2015): 1.804.

Publicadas como colaboradora

- Zamora L, Germing U, Cabezón M, Schuler E, Arnan M, Marcé S, Coll R, Pomares H, Brings C, **Palomo L**, Schmeneau J, Gallardo D, Millá F, Feliu E, Xicoy B. Calreticulin mutations are not present in patients with myeloproliferative chronic myelomonocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2015 May;94(5):869-71. PMID: 25413337. Factor de impacto: 3.022.
- Adema V, Larráyoz MJ, Calasanz MJ, **Palomo L**, Patiño-García A, Agirre X, Hernández-Rivas JM, Lumbreras E, Buño I, Martínez-Laperche C, Mallo M, García O, Álvarez S, Blazquez B, Cervera J, Luño E, Valiente A, Vallespi MT, Arenillas L, Collado R, Pérez-Oteyza J, Solé F. Correlation of myelodysplastic syndromes with i(17)(q10) and TP53 and SETBP1 mutations. *Br J Haematol*. 2015 Oct;171(1):137-41. PMID: 25716545. Factor de impacto: 5.812.
- Palau A, Mallo M, **Palomo L**, Rodriguez-Hernandez I, Diesch J, Campos D, Granada I, Junca J, Drexler HG, Sole F and Buschbeck M. Immunophenotypic, cytogenetic and mutational characterization of cell lines derived from myelodysplastic syndrome patients after progression to acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2017 Mar;56(3):243-252. PMID: 27750403. Factor de impacto (2015): 3.960.
- Díaz de la Guardia R, Lopez-Millán B, Bueno C, Castaño J, Gómez-Casares M, Vives S, **Palomo L**, Ballerini P, Juan M, Blanco L, Nomdedeu J, Fuster JL, Rosu-Myles M,

- Lavoie J, Anguita E, Menéndez P. Functional, genetic and immunological characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from Acute Myeloid Leukemia patients. *Stem Cell Reports*. 2017 May 18. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.019. [Epub ahead of print]. PMID: 28528702. Factor de impacto (2015): 7.023.
- Ademà V, **Palomo L**, Przychodzen BP, Hosono N, Díez-Campelo M, Mallo M, Xicoy B, Luño E, Hirsch CM, Zamora L, LaFramboise T, Jerez A, Arenillas L, Perez-Ladaga A, Pedro C, Pellagatti A, Boulwood J, Santini A, Patel BJ, Clemente M, Bargay J, Montoro J, Caballero JC, Merchan B, Noriega V, Marcos-Betes V, del Cañizo C, Raya JM, Sanchez-Garcia J, Rios E, Arnan M, Florensa L, de Paz R, Lemes A, Garcia O, Gomez-Marzo P, de Haro N, Fuster-Tormo F, Gut I, Makishima H, Sekeres MA, Bejar R, Maciejewski JP and Solé F. The mutational spectrum and clonal hierarchy of del(5q). [Enviado].
 - Hurtado AM, Luengo-Gil G, Chen-Liang TH, **Palomo L**, Lumbreras E, Caparrós E, Przychodzen B, Amigo ML, Díez-Campelo M, Zamora L, Salido E, Ortuño F, Vicente V, Maciejewski J, del Cañizo C, Solé F, Ferrer-Marin F, Jerez A. Transcriptome of DNA Repair Genes in Chronic Myelomonocytic Leukemia: Identification, Genomic Framework and Validation of Synthetic Lethality Targets. [Enviado].