

*PAPEL DE LA METILACIÓN
DEL DNA EN EL PRONÓSTICO
DE LOS PACIENTES CON
LEUCEMIA
MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA*



Universidad de Navarra

*Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. Facultad de Medicina.
Sara Varea Díaz. Pamplona. Septiembre 2017*

Sólo aquel que se dedica a una causa con todas sus fuerzas y alma puede ser un verdadero maestro. Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Departamento de Hematología darme la oportunidad de formarme con ellos y formar parte de ellos. En especial a Carlota, Ana y Paula, por la cantidad de sabiduría que adquirí en la sala de residentes y a Jose, porque sí. A Felipe Prósper por presentarme a Xabi Agirre y dejarme en sus manos para hacer este proyecto. A Xabi, agradecerle la paciencia, el tiempo y la lucha para poder conseguirlo.

Desde que iniciamos este camino han pasado más de 5 años, 3 ciudades y 5 puestos de trabajo diferentes. A todos, tantos... que me habéis acompañado y mantenido en pie, en diferentes momentos pero parecidas circunstancias, porque confiasteis y me convencisteis de que este momento llegaría. ¡GRACIAS!

A mi FAMILIA, a mis padres porque me han enseñado a vivir, a valorar las cosas importantes, a luchar, a no abandonar, a perseguir sueños, porque son mis verdaderos maestros y por crear el hogar más seguro y feliz del universo. A mi hermanito querido del alma, a mi cuñada, a mis primos, a Paula y Maite, y a mis hermanas Marta Marín, Marta Moreno, Noelia, Virginia, María y Emi Ferrer y Marta Escuder por las incesantes palabras de apoyo, por compartir los momentos más felices, confianzas, experiencias y todo lo que da sentido a la vida. Por aportar los matices más variados a mi persona y conseguir que sea enorme. Me hacéis grande.

Y por último, dedicarle este trabajo a Javier, mi sobrino, para que mi esfuerzo le sirva de inspiración. Espero que su mirada curiosa no desaparezca y nos obligue a estar siempre atentos y a seguir buscando respuestas. Agradecerle su sonrisilla diaria, ¡qué ni se imagina la fuerza que da!

D. Felipe Prósper Cardoso, Profesor del Departamento de Hematología y Hemoterapia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra,

D. Xabier Agirre Ena, Colaborador de la Fundación para la Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra,

CERTIFICAN:

Que **Dña. Sara Varea Díaz** ha realizado el trabajo “Papel de la alteración de la metilación del DNA en el pronóstico de la leucemia mielomonocítica crónica”, bajo mi dirección.

Que considera que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante Tribunal, con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, a efectos oportunos, firmo el presente certificado, a 4 de julio de dos mil diecisiete.



Felipe Prósper Cardoso



Xabier Agirre Ena

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

Leucemia mielomonocítica crónica

1. <i>Epidemiología</i>	15
2. <i>Signos y síntomas- Manifestaciones clínicas</i>	15
3. <i>Diagnóstico</i>	16
4. <i>Factores de riesgo</i>	18
5. <i>Tratamiento y manejo de la LMMC</i>	23
Tratamiento convencional	24
Agentes desmetilantes	25
Azacitidina (AZA)	25
Decitabina (DAC)	26
Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) . 28	
6. <i>Patogénesis molecular de la LMMC</i>	29
6.1 <i>Mutaciones en genes implicados en el control de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis</i>	30
Mutaciones en los genes de la familia RAS	30
Mutaciones en RUNX1	30
Mutaciones en CBL	30
JAK2 V617F	31
6.2 <i>Maquinaria del espliceosoma</i>	31
SRSF2	31
SF3B1	32
U2AF35	32
6.3 <i>Otras alteraciones y consideraciones</i>	32
6.4 <i>Mutaciones en genes que participan en la regulación de mecanismos epigenéticos</i>	33

7. Epigenética	34
7.1 Epigenética y LMMC	38
TET2	39
IDH1 e IDH2	40
DNMT3	41
ASXL1	41
2. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	43
3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	
1. Selección de muestras de pacientes	46
2. Extracción de DNA	50
3. Estudios de biología molecular para el análisis de mutaciones	50
4. Tratamiento con bisulfito sódico	51
5. Amplificación de las regiones genómicas de interés mediante PCR	54
6. Pirosecuenciación	58
7. Estudios de arrays de metilación del DNA. Identificación de CpGs diferencialmente metiladas	62
8. Estudio de los niveles de 5hmC en las muestras de LMMC	66
9. Identificación de una huella de metilación asociada	67
4. <u>RESULTADOS</u>	
1. Análisis mutacional en pacientes con LMMC	72
2. Estudio global de los patrones de metilación. Relación de estos patrones con las mutaciones en genes que regulan los mecanismos epigenéticos	74
2.1. Patrones de metilación del DNA	74
2.2 Vías biológicas en las que se implican los genes diferencialmente metilados en LMMC	78
2.3 Relación de la metilación del DNA en la LMMC con las mutaciones en genes que regulan los mecanismos epigenético	80
2.4 Papel del gen TET2 en la LMMC	86

3. Diferencias en el comportamiento de las muestras de pacientes transformados con los no transformados a leucemia aguda	88
3.1 Validación de los resultados del array de metilación	90
3.2 Estudio de la metilación de los CpGs de interés	95
4. Validación externa de los resultados con una serie alemana	97
5. Validación externa de la tercera serie de pacientes con LMMC	101
5. <u>DISCUSIÓN</u>	105
6. <u>CONCLUSIONES</u>	119
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	121
8. <u>ANEXOS</u>	
ANEXO 1: Tabla 8 material y métodos	138
ANEXO 2: Tabla 18 resultados	139
ANEXO 3: Figura 16 resultados	145
ANEXO 4: Figura 21 resultados	147
ANEXO 5: Artículo	148

1. INTRODUCCIÓN

LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) es una enfermedad clonal de la célula madre hematopoyética caracterizada por la presencia de monocitosis ($>1 \times 10^9/L$) en sangre periférica (SP). Además de esta característica, la LMMC se define por presentar rasgos displásicos en una o más líneas mieloides, menos de un 20% de blastos tanto en SP como en médula ósea (MO) y una ausencia en estos blastos del cromosoma Philadelphia o el reordenamiento *BCR-ABL1*. En el 80% de los casos, la LMMC surge *de novo*, y en el 20% restante se detecta tras la evolución de un síndrome mielodisplásico (SMD) que debuta con monocitosis.

En la revisión de la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001, la LMMC se engloba, dentro del grupo diagnóstico denominado Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas o síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/NMPs). Junto a la LMMC en este grupo se incluyen las siguientes entidades (1,2):

- **Leucemia mieloide crónica atípica**
- **Leucemia mielomonocítica juvenil (3,4),**
- **Anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis**
- **SMD/NMPs inclasificables**

En la revisión de la OMS realizada en el año 2008 la LMMC fue reclasificada de nuevo dentro del grupo de los SMD/NMPs. En esta nueva clasificación, a su vez, la LMMC se dividió en dos subtipos (5):

- **LMMC-1:** $<5\%$ de blastos en SP y $<10\%$ de blastos en MO.
- **LMMC-2:** 5-19% de blastos en SP o la presencia de bastones de Auer, y entre un 10-19% de blastos en MO.

En la última revisión de la OMS en 2016 se establece que es más preciso clasificar el pronóstico de esta enfermedad basado en los blastos cuando se subdivide en tres grupos (6).

- **LMMC-0:** $<2\%$ de blastos en SP y $<5\%$ de blastos en MO.
- **LMMC-1:** 2-4% de blastos en SP y 5-9% de blastos en MO.
- **LMMC-2:** 5-19% de blastos en SP o la presencia de bastones de Auer, y entre un 10-19% de blastos en MO.

Otras clasificaciones más antiguas pero utilizadas en la práctica clínica, como es la clasificación French-American-British (FAB), consideran a la LMMC como un subtipo de SMD. En esta clasificación la LMMC también está dividida en dos subtipos, la LMMC tipo mieloproliferativo (LMMC-MP; con un conteo mayor de 13.000 Leucocitos/ μ L) y la del subtipo LMMC tipo mielodisplásico (LMMC-MD; con menos de 13.000 Leucocitos/ μ L en SP) (7).

1. EPIDEMIOLOGÍA

En trabajos iniciales, antes de la revisión de la OMS, la incidencia y prevalencia de la LMMC se estimaba en torno al 10% de todos los casos de SMD (6). Tras la definición de la LMMC dentro de los SMD/MPNs pasó a ser la entidad más frecuente de este grupo. La mediana de edad al diagnóstico se encuentra entre los 65 y 75 años, con un mayor predominio en los varones (3:1). La etiología de la LMMC es desconocida pudiendo ser los carcinógenos ambientales y radiaciones ionizantes la causa en algunos casos (8).

2. SIGNOS Y SÍNTOMAS – MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los hallazgos clínicos, hematológicos y morfológicos de la LMMC son muy heterogéneos. Los pacientes pueden presentar una sintomatología más propia de un SMD, de NPM o compartir ambas sintomatologías sin predominio de ninguna en concreto. El signo principal entre estos pacientes, tanto en frecuencia como por la morbilidad que provoca, es la esplenomegalia (30-50%) (8,9).

Hay que destacar que la esplenomegalia puede ser el signo de una transformación extramedular, caracterizando una transformación a leucemia aguda de manera precoz. Sin embargo, es muy complicado demostrar la infiltración del bazo por blastos (10). En el 20% de los pacientes con LMMC que presentan esplenomegalia, esta puede ir acompañada además de hepatomegalia.

Otros síntomas que acompañan a esta entidad son la astenia, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna, junto a los síntomas derivados de las citopenias, siendo su incidencia similar en los diferentes subgrupos de pacientes. Además, en estos pacientes existe una tendencia a infiltrar diferentes tejidos como encías o piel y asociarse con fenómenos autoinmunes (8).

3. DIAGNÓSTICO

Ante unos síntomas como los descritos anteriormente y una monocitosis en un paciente, el clínico deberá descartar primeramente entidades como infecciones crónicas o subagudas (tuberculosis, endocarditis, leishmaniasis, citomegalovirus,...), enfermedades del tejido conectivo o situaciones de regeneración de la MO (agranulocitosis, quimioterapia, neutropenias cíclicas,...). Algunas otras enfermedades neoplásicas también pueden cursar con monocitosis, como los linfomas y sobre todo la LMA de estirpe monocítica.

Una vez excluidas estas opciones, la revisión de la clasificación de la OMS realizada en 2008, establece los siguientes criterios diagnósticos para el correcto diagnóstico de una LMMC en un paciente (1):

- Monocitosis persistente en SP ($>1 \times 10^9/L$)
- Ausencia del cromosoma Philadelphia o del gen de fusión *BCR-ABL1*
- Descartar el reordenamiento de los genes *PDGFR α* o *PDGFR β* (estos reordenamientos deben ser analizados específicamente en los casos que presentan eosinofilia).
- Menos de un 20% de blastos en SP y MO (el porcentaje de blastos incluye mieloblastos, monoblastos y promonocitos)
- Al menos uno de las siguientes características:
 - o Displasia de una o más líneas celulares mieloides
 - o Anomalía citogenética clonal adquirida o alteración molecular presente en células hematopoyéticas.
 - o Persistencia de monocitosis durante tres meses sin evidencia de otras causas (como infección, inflamación o malignidad).

En la actualidad, para alcanzar el correcto diagnóstico de la LMMC, es necesario examinar una extensión de SP y un aspirado de MO y un análisis citogenético. En ocasiones, la morfología de las células detectadas en las extensiones de SP y MO (**Tabla 1**) no es muy concluyente y puede dar a confusiones de diagnóstico pudiendo definirse el caso como una LMC o una LMC atípica (10-13). En estos casos, además de las técnicas citadas anteriormente, existen otro tipo de análisis que pueden ayudar en el

correcto diagnóstico de la LMMC como pueden ser las técnicas inmunohistoquímicas y el inmunofenotipo. En el caso de las técnicas de inmunohistoquímica, estas se realizan sobre los cortes del cilindro óseo extraído en la biopsia ósea y permiten marcar las células con diferentes receptores de membrana (**Tabla 2**) que nos pueden orientar mejor hacia el diagnóstico de una LMMC. En el caso del inmunofenotipo, este análisis se realiza mediante citometría de flujo, y al igual que en el caso de las técnicas inmunohistoquímicas permite detectar la expresión de marcadores de membrana celular tanto esperados como aberrantes de un monocito (**Tabla 3**), pudiendo discernir mejor los casos de LMMC de las otras entidades que pueden dar a confusión diagnóstica.

Tabla 1. Resumen de los hallazgos propios de la morfología en sangre periférica y el diagnóstico citomorfológico en médula ósea de la LMMC.

HISTOPATOLOGÍA	
SANGRE PERIFÉRICA	MÉDULA ÓSEA
* monocitos en todos los estadios madurativos	* Hipercelularidad
* rasgos de disgranulopoyesis	* Rasgos de disgranulopoyesis
* +/- eosinofilia	* +/- displasia en el resto de líneas
	<u>serie roja</u> (contornos nucleares anormales, sideroblastos en anillo, cambios megaloblastoides en precursores eritroides)
	<u>serie plaquetar</u> (megacariocitos pequeños e hipolobulados)
	* +/- fibrosis reticulínica (20% pacientes)
	* Eosinofilia
	descartar PDGFR α y β y FGFR1
	* Histiocitos +/- cuerpos apoptóticos

Tabla 2. Marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico de la LMMC.

INMUNOHISTOQUÍMICA	
* Marcadores de serie monocítica	CD14 +
	CD68 +
* Monocitos plasmocitoides	CD123 +
	CD56 aberrante

Tabla 3. Marcadores inmunofenotípicos para el diagnóstico de la LMMC (10,13-17).

INMUNOFENOTIPO	
* Serie monocítica normal	CD33+ y CD13+
* Expresión variable (+/-)	CD14, CD68 y CD64
* Sobreexpresados	CD56 y CD2
* Expresión disminuida	CD14, HLA-DR, CD13, CD15, CD64 y CD36

Junto con el análisis de la morfología celular, los análisis inmunohistoquímicos e inmunofenotípicos, el análisis de las alteraciones citogenéticas mediante cariotipo convencional juegan un papel muy importante en el diagnóstico de los pacientes con LMMC. Las anomalías citogenéticas mediante cariotipo convencional se detectan en un 20-40% de los casos de LMMC (34.1% Onida y col, 25% Such E y col) detectándose trisomías del cromosoma 8, monosomía del cromosoma 7, la delección 7q (del7q), la pérdida del cromosoma Y o las anomalías en el brazo corto del cromosoma 12. De todas ellas, las alteraciones citogenéticas más frecuentes en la LMMC son la monosomía del cromosoma 7, la trisomía del cromosoma 8 y los cariotipos complejos (alteraciones en 3 cromosomas o más). Por último, si el análisis citogenético no es concluyente, es imprescindible la exclusión de los reordenamientos de los genes *PDGFR α* y *PDGFR β* mediante FISH (hibridación in situ con fluorescencia) o PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

4. FACTORES PRONÓSTICOS Y ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO

El curso natural de la LMMC es muy variable, con una esperanza de vida que abarca desde varias semanas a varios años según los distintos grupos de estudio de esta enfermedad (17,18). Los estudios publicados al respecto muestran variables (20) tanto clínicas como analíticas muy heterogéneas y esto puede ser la causa de la variabilidad en la mediana de supervivencia de los pacientes con LMMC (14,21,22,23). Por tanto, a pesar de su denominación como entidad “crónica”, el curso de esta enfermedad es progresivo hacia la malignización leucémica (24). La LMMC progresa a una LMA en más de 1/3 de los casos (5) y el tiempo de transformación es de unos 12 meses (25-28). Al ser una enfermedad tan heterogénea se ha considerado muy importante establecer clasificaciones con valor pronóstico que permitan distinguir aquellos pacientes que tendrán un curso largo y más indolente de la enfermedad, de aquellos pacientes que

tendrán una enfermedad más agresiva y una supervivencia menor. En este sentido, derivado de diversos estudios que pretenden identificar los diferentes factores de riesgo para los pacientes con LMMC, se propuso la clasificación **IPSS** (International Prognosis Scoring System) (**Tabla 4**), confirmando como factores de riesgo independiente para esta enfermedad los siguientes (18,19,20,29,30):

- Datos demográficos básicos como la edad y el sexo
- Parámetros hematológicos (niveles de hemoglobina, número de plaquetas, número de leucocitos, neutrófilos y monocitos y la presencia de blastos en SP)
- Porcentaje de blastos en MO
- Niveles de LDH y Ferritina en suero
- Dependencia transfusional
- Hallazgos citogenéticos

El IPSS (International Prognosis Scoring System) fue propuesto y validado en 1997 siendo el score utilizado para la estratificación del riesgo en la LMMC (a falta de un score propio) hasta la aparición del IPSS-R (revisado). Este ha sido validado recientemente e incorpora mayor número de anomalías, lo que permite al clínico una mejor predicción del riesgo de los pacientes al diagnóstico de LMMC (**Tabla 4**) (12):

Tabla 4. IPSS revisado.

SCORE PRONÓSTICO IPSS-R										
% BLASTOS EN MO		CARIOTIPO			HEMOGLOBINA (g/dl)		PLAQUETAS		NEUTROFILOS	
</=2	0 puntos	MUY BUENO	0 puntos	-Y o del(11q)	> 10	0 puntos	> 100000	0 puntos	> o = 800	0 puntos
(2-5)	1 punto	BUENO	1 punto	cariotipo normal, del(5q), del (20q), del(12p) o doble anomalía que incluya del (5q)	<10 - 8	1 puntos	> 50000 - 100000	1 punto	< 800	0,5 puntos
>5 <10	2 puntos	INTERMEDIO	2 puntos	del(7q), +8, +19, i(17q), otras alteraciones no incluidas en los otros grupos	< 8	2 puntos	< 50000	2 puntos		
> 10	3 puntos	MALO	3 puntos	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dobles anomalías incluyen -7/del (7q), 3 alteraciones						
		MUY MALO	4 puntos	> 3 anomalías						

Aunque el IPSS es la clasificación más utilizada en la clínica, distintos grupos están realizando estudios interesantes con la finalidad de mejorar esta clasificación. En este sentido, recientemente el Grupo Español de SMD (GESMD) ha realizado un estudio en 414 pacientes analizando más exhaustivamente las alteraciones cromosómicas detectadas en estos pacientes mediante cariotipo convencional. Los resultados obtenidos en este estudio han llevado a la propuesta de una nueva clasificación de riesgo para los pacientes con LMMC, que subdivide a los pacientes en tres grupos de riesgo (**Figura 1**) basándose exclusivamente en el análisis citogenético (18):

- **Grupo de Bajo riesgo:** cariotipo normal o pérdida del cromosoma Y de manera aislada. Con una supervivencia del 35% a los 5 años y una probabilidad de transformación a LMA a los dos años del 12%.
- **Grupo de Alto riesgo:** trisomía del cromosoma 8 como única alteración o acompañada de alguna otra alteración o anomalías en el cromosoma 7 como única alteración o con alguna otra alteración y cariotipo complejo. Con una supervivencia a los 5 años del 4% y 40% de probabilidad de transformación a LMA a los dos años.
- **Grupo de Riesgo intermedio:** cualquier otra alteración citogenética única o doble. Con una probabilidad de supervivencia del 26% a los 5 años y de transformación a LMA del 20% a los dos años.

Esta clasificación en comparación con la clasificación IPSS, muestra dos grandes diferencias: mientras que la trisomía 8 era considerada de riesgo intermedio en el IPSS, en esta nueva clasificación se agrupa en la de alto riesgo. Además, la delección 5q [del(5q)] aislada así como la delección 20q [del(20q)], que estaban incluidas en el subgrupo de bajo riesgo en el IPSS, pasan a ser de riesgo intermedio.

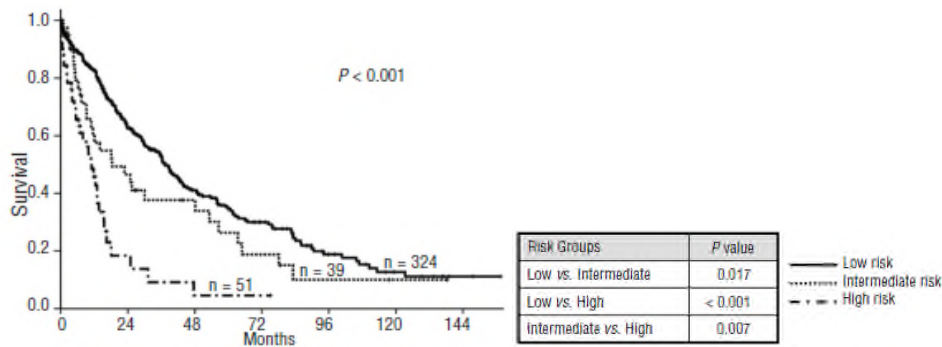


Figura 1. Curvas Kaplan-Meier de la supervivencia estimada según el CPSS propuesto por el GESMD. Extraída y modificada del artículo “Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia” al. Hematológica 2011.(18)

Un año después se pudo validar esta clasificación citogenética gracias a la colaboración de los grupos alemán e italiano. Este nuevo estudio además ha permitido definir algunos predictores de riesgo de transformación a LMA (19), hecho que no era factible anteriormente. Teniendo en cuenta estos resultados, se ha definido un nuevo índice pronóstico específico, denominado CPSS, para los pacientes con LMMC, que subdivide el riesgo en cuatro categorías como se puede observar en la **Tabla 5 y 6**.

Tabla 5. CPSS para cálculo de riesgo de muerte y probabilidad de evolución a LMA individual: (Tabla modificada del artículo “Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia”)(19).

Cálculo del índice CPSS			
Variable	Puntuación		
	0	1	2
Subtipo según OMS	LMMC1 <5% blastos en SP y <10% blastos en MO	LMMC2 5-19% Blastos en SP y 10-19% blastos en MO o presencia de bastones de Auer	-
Subtipo según FAB	LMMC-MD	LMMC-MP	-
Subgrupo según citogenética*	Bajo	Intermedio	Alto
Dependencia transfusional	No	Si	-

* definición del subgrupo según la citogenética en la Tabla 6.

Tabla 6. Definición del grupo pronóstico según el CPSS (19).

Definición del grupo pronóstico según el riesgo individual		SG a 5 años	Probabilidad de LMA a 5 años
Grupo de riesgo	Puntuación	%	%
Bajo	0	55	13
Intermedio-1	1	25	29
Intermedio-2	2 - 3	10	60
Alto	4 - 5	0	73

Por último, debido a que en la actualidad asistimos a la era de la biología molecular y la secuenciación masiva, se han realizado varios estudios con la finalidad de analizar el papel que pueden jugar las mutaciones puntuales detectadas en distintos genes en la estratificación del pronóstico de los pacientes con LMMC. Recientemente se ha publicado un estudio de Itzykson y colaboradores basado en el análisis de 312 pacientes diagnosticados de LMMC por el grupo francés de SMD y en el que demuestran que de los 18 genes mutados que detectan con una mayor frecuencia (*ASXL1*, *TET2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSF2*, *U2AF1*, *RUNX1*, *NPM1*, *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *JAK2*, *FLT3*) en los pacientes con LMMC sólo las mutaciones en el gen *ASXL1* (detectadas en el 40% de los pacientes con LMMC) presentan una potencia estadísticamente significativa como factor de mal pronóstico independiente. Tras este estudio se ha propuesto un nuevo índice pronóstico basado en 5 factores pronósticos: leucocitosis $>15.000/\text{mm}^3$, anemia, trombopenia, edad por encima de 65 años y el estado mutacional de *ASXL1*. Este índice divide a los pacientes con LMMC en tres grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) tal y como se muestra en la siguiente tabla (31).

Tabla 7: Índice pronóstico propuesto por el grupo francés incluyendo el estado mutacional del gen *ASXL1* junto con la leucocitosis, anemia, trombopenia y edad que presentan los pacientes con LMMC. SG: Supervivencia global; NA: No alcanzada.

Variable		Puntuación					
Edad >65		2					
>15.000 leucocitos		3					
Anemia		2					
Contaje de plaquetas		2					
ASXL1 MUTADO		2					
Grupos de riesgo según puntuación y SG en cada uno de los grupos							
Grupo de riesgo		Bajo		Intermedio		Alto	
Puntuación	SG	0-4	NA	5-7	38,5ms	8 –12	14,4 ms

Además de clasificar a los pacientes de LMMC en grupos de riesgo, se ha observado que este nuevo índice pronóstico también se puede aplicar al análisis de la supervivencia libre de LMA que pueden tener los pacientes con LMMC. De esta manera, este nuevo índice demuestra una supervivencia libre de LMA de 56 meses para el grupo de bajo riesgo, 27.4 meses para el grupo intermedio y, por último, 9.2 meses para el grupo de alto riesgo (31). Pero a pesar de demostrar que la incorporación de las alteraciones moleculares a los datos analíticos conocidos puede mejorar el poder pronóstico para los pacientes con LMMC, no parece que estos análisis moleculares puedan ser utilizados como gold standard, ya que son pocos los centros que poseen la infraestructura necesaria para llevar a cabo el estudio del estatus mutacional del gen *ASXL1* u otros genes importantes en un tiempo razonable (31). Debido a ello, el índice más utilizado en la actualidad en la clínica sigue siendo el IPSS.

5. TRATAMIENTO Y MANEJO DE LA LMMC

La LMMC, sigue sin tener un tratamiento específico y dirigido en la actualidad. La terapia en la LMMC está basada en el mejor tratamiento de soporte posible (transfusiones de hematíes y plaquetas, corticoides, antimicrobianos, estimuladores de colonias) o simplemente una estrecha vigilancia hasta la transformación hacia una LMA. En el caso de detectar 1) un empeoramiento o aparición de los signos y síntomas

de la enfermedad como la fiebre, pérdida de peso, esplenomegalia sintomática o hiperleucocitosis; 2) empeoramiento de las citopenias (aumento de la necesidad transfusional o trombopenia); 3) afectación de algún órgano como piel, disfunción renal o síntomas pulmonares o 4) un aumento en el porcentaje de blastos (32), generalmente los clínicos inician distintos tipos de tratamiento en los pacientes con LMMC. Aunque no esté claro ni definido adecuadamente el criterio para iniciar un tipo u otro de tratamiento, en caso de precisar el inicio de un tratamiento, en la LMMC se ha optado por las diferentes estrategias que se muestran a continuación:

- **Hidroxiurea** (Hydrea®): es un fármaco citorreductor ampliamente usado en las NMP, especialmente en aquellos pacientes que debutan con un conteo de leucocitos mayor de $13.000/\text{mm}^3$. La hidroxiurea ha demostrado una superioridad frente al etopósido en la LMMC e incluso en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (29,33).
- **Citarabina** (Ara-C): Bajas dosis de citarabina inducen una respuesta completa (RC) en el 15-20% de los pacientes con LMMC y respuestas globales hasta en el 39% de los casos con esta enfermedad (34,35).
- **Topotecan**: Es un inhibidor de la topoisomerasa I. En el estudio de Beran y colaboradores, observaron una RC en el 31% de los pacientes. Estas RC fueron mucho más llamativas en aquellos pacientes que presentaban rasgos de mal pronóstico, incluyendo pacientes con alteraciones cromosómicas de alto riesgo (34,36). Además, se ha observado, que estos datos mejoran cuando la terapia con Topotecan se asocia con la terapia con citarabina (RC del 31% al 56% y RG del 27% al 44%), a pesar de esta tasa de respuestas la supervivencia libre de progresión tiene una mediana de 33 semanas y la mediana de supervivencia global fue de 41 semanas (37,38).

El crecimiento del interés por esta entidad en los diferentes grupos de trabajo, ha llevado a una definición más clara de la entidad, así como a un mejor conocimiento de la biología, a un diagnóstico más preciso y en consecuencia al establecimiento de grupos pronósticos más definidos de la enfermedad. La mejor definición de la enfermedad y la realización de ensayos dirigidos o que incluyan un mayor número de pacientes con LMMC podrían permitir, por tanto, conocer mucho mejor qué pacientes van a necesitar de los tratamientos activos indicados anteriormente para intentar

cambiar el curso de la enfermedad y qué pacientes pueden ser manejados de manera conservadora por tener un menor riesgo de progresión.

Además de los tratamientos indicados anteriormente, también se están presentando como firmes candidatos para el tratamiento de la LMMC los **agentes desmetilantes**. Entre estos, existen dos nuevas drogas, ambas análogas de las pirimidinas, que son la azacitidina y la decitabina. Los datos de efectividad y tasa de respuesta de los que disponemos hasta la fecha están extrapolados de los estudios de SMD. Esto es debido al menor número de pacientes con LMMC incluidos. Pero la tendencia es demostrar qué papel juegan estas drogas para el cambio en la historia natural de la biología de la LMMC, como ya se ha demostrado en los SMD de alto riesgo (40). Aunque ambas drogas, inhiben la actividad de las DNA metiltransferasas, hay algunas diferencias entre los dos agentes. La azacitidina es incorporada tanto en el RNA como en el DNA, mientras que la decitabina es primariamente incorporada al DNA, por lo que muestran diferentes patrones de inducción y represión génica. Esto podría ser una ventaja para los pacientes que son refractarios a azacitidina, porque podrían responder a la decitabina y viceversa.

Azacitidina (5-AZA): Esta droga fue aprobada en el tratamiento de la LMMC en diciembre del año 2008. La evidencia disponible sugiere que este fármaco podría ser efectivo en pacientes con LMMC pero sobre todo en aquellos pacientes con más de un 10% de blastos en MO (10-29%) y <13.000 Leucocitos/ μ l (no LMMC-MP). La azacitidina podría ser útil en el tratamiento de los pacientes con LMMC que no son candidatos a trasplante alogénico y en los pacientes excluidos de otros ensayos clínicos (por edad avanzada, por pertenecer al grupo de pacientes con LMMC-2 o por presentar una citogenética desfavorable) (29). El mayor y más importante ensayo clínico desarrollado hasta la actualidad, denominado AZA-001, describe que aquellos pacientes con LMMC (sólo incluye un 3% de pacientes con LMMC por lo que no se pueden extraer conclusiones específicas) que habían recibido azacitidina, se prolongaba su mediana de supervivencia, se postponía hasta 9 meses su progresión a una LMA, reducían la dependencia de transfusiones y mejoraban sutilmente la tasa de RC (17% frente al 8% de los pacientes que no recibían AZA) (39). Este agente desmetilante mostró una actividad superior al combinarlo con bajas dosis de citarabina (40) y los resultados eran visibles después de 2-4 ciclos de tratamiento. Este hecho podría ser

explicado por mecanismo de acción dual entre los dos agentes. La incorporación de azacitidina en el DNA hace su efecto en la fase S del ciclo celular y requiere dos o más ciclos de síntesis de DNA para alterar la transcripción y la expresión génica. En segundo lugar, la azacitidina además actúa como modificador de la respuesta biológica actuando como citotóxico de las células reguladoras T o cualquier otra célula moduladora que inhiba la hematopoyesis en SMD (41,42). Las conclusiones extraídas del ensayo clínico fase III AZA-001, se han obtenido utilizando para ello pacientes elegidos por lo que siguen apareciendo nuevos trabajos en los que se incluyen pacientes con peores condiciones a priori (43-45). Todos ellos demuestran un perfil de seguridad y efectos adversos muy tolerables al tratamiento con azacitidina en los que los pacientes alcanzan respuestas globales (mejoría hematológica, respuestas completas o respuestas morfológicas) en torno al 40-55% (hasta el 26% de respuestas completas en alguna serie), aumentando la supervivencia global mediana hasta 29 meses en el estudio del grupo belga (43).

Decitabina: La decitabina (DAC) también aprobada por la FDA, ha demostrado en diferentes ensayos clínicos una tasa de respuestas globales del 25% en pacientes con LMMC, incluso en pacientes con mal pronóstico. Arribi y colaboradores, realizaron un estudio con 19 pacientes del MD Anderson Cancer Center (32), usando la decitabina a dosis de 100 mg/m² por ciclo cada 4 semanas. En este estudio, observaron una tasa de respuesta global del 68% (58% RC, 1% MH). En este estudio, se observó que la administración endovenosa diaria durante 5 días de Decitabina se asociaba a una mayor tasa de RC. El perfil de toxicidad fue tolerable, solo el 17% de los pacientes requirieron reducción de la dosis, y no se observó mortalidad relacionada con la terapia (MRT). Una vez demostrado su papel en la respuesta de los pacientes con LMMC, este mismo grupo estudió el efecto biológico de la DAC en las células tumorales. Oki y colaboradores, observaron en tres pacientes que participaron en el estudio fase II con decitabina, una hipometilación global del DNA antes de la desaparición del clon maligno, junto con un efecto citotóxico de la decitabina (26,46). Con la experiencia adquirida desde su aprobación son pocos grupos los que consiguen una tasa de respuestas como las observadas en este citado trabajo. La verdad, es que la tasa de respuestas global, aquella que incluye RC, RP y/o MH es de aproximadamente el 40% (47) y la dosis que se ha establecido estándar se corresponde con 20 mg/m²/día x5 días, siendo la mediana de 6 ciclos hasta alcanzar respuesta.

Meldi y colaboradores, a su vez iniciaron un estudio que pretendía estimar desde el diagnóstico del paciente con LMMC, los factores que predisponen a la resistencia y respuesta a DAC de estos pacientes. Los resultados expuestos, aunque difíciles de llevar a la práctica rutinaria arrojan la evidencia del comportamiento epigenético de la LMMC:

- Las mutaciones somáticas en los genes más recurrentes en la LMMC como son *TET2*, *DNMT3A* y *SRSF2* no se correlacionan con la respuesta a DAC.
- Un perfil específico de 167 regiones del genoma distales a los promotores y con una metilación del DNA diferencial distingue a los pacientes que presentan una resistencia al tratamiento con DAC.
- La sensibilidad a DAC puede ir asociada a programas de transcripción génica específicos.

En general el tratamiento hipometilante en la LMMC sigue siendo objeto de discusión. Desde su aprobación tanto de la 5-AZA como de la DAC su efecto se ha estudiado en ensayos clínicos en fase II y ninguno en fase III en la LMMC por lo que no es fácil extraer conclusiones concretas (48). Además, a pesar de haber demostrado la actividad de ambos fármacos, no se puede concluir si uno ofrece superioridad sobre el otro ya que no hay estudios que comparen ambos agentes

En 2015, se publicó un trabajo del grupo de la clínica Mayo en colaboración con el grupo francés (48) sobre el tratamiento hipometilante en pacientes jóvenes con LMMC (≤ 65 años), grupo minoritario de pacientes pero que optan a otras terapias. En él se describe la respuesta a 5-AZA y DAC por separado con el esquema y dosis presentada en el apartado anterior, y validado hasta el momento.

- Para el grupo de pacientes tratados con Azacitidina la media de ciclos que se precisan para conseguir respuesta es de 5 (rango de 1-44 ciclos). El tratamiento se utilizó como puente al trasplante alogénico en el 39% de los pacientes y la tasa de respuestas globales fue del 40%, de las cuales el 7% fueron RC.

Por otro lado, el grupo tratado con Decitabina, presentaba una media de 6 ciclos (rango 1-30 ciclos) para alcanzar respuesta. El 31% de los pacientes recibieron este tratamiento como puente al trasplante alogénico. En este caso, la respuesta global fue del 30%.

Estos resultados se superponen a los observados en los grupos de mayor edad e índices de riesgo alto o intermedio-alto. En general, ambos agentes hipometilantes necesitan un mínimo de 3 ciclos de tratamiento, pero una vez conseguida la mejor respuesta, la siguiente pregunta es: ¿cuándo debemos parar el tratamiento? A pesar de que la respuesta se alcanza a los 6-9 ciclos de manera general, en la actualidad la práctica clínica habitual trata a los pacientes con ciclos repetidos hasta la progresión de la enfermedad o pérdida de respuesta. Además, se ha demostrado que, tras finalizar la terapia, los pacientes recaen en el 100% de los casos.

Además de los tratamientos descritos anteriormente, se ha estudiado el efecto de distintas drogas como puede ser el Sorafenib o el Dasatinib (49,50). A su vez el conocimiento de nuevos genes mutados en la LMMC, ha llevado al descubrimiento de nuevas posibles dianas terapéuticas para la LMMC. Entre estas, las mutaciones en genes del espliceosoma parecen ser las más atractivas. En este sentido, se han descrito moléculas y compuestos como el FR901464 o el pladienolide (51).

A pesar de estos estudios y el descubrimiento de nuevas moléculas eficaces en la LMMC, el trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico (alo-TPH) sigue teniendo un papel muy importante en el tratamiento de la LMMC (28).

Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (ALO-TPH): El alo-TPH es una opción en el tratamiento de los SMD y en las NMP, lo que sugiere que debiera ser una buena alternativa en los pacientes con LMMC (23). De hecho, es el único tratamiento curativo en esta enfermedad, ofreciendo largas supervivencias en los pacientes con LMMC (52). Es difícil concretar los resultados de respuesta y factores predictores de respuesta/recaída tras este tratamiento ya que los estudios publicados son todos retrospectivos y mezclan distintos tipos de paciente, regímenes de acondicionamiento (mieloablativo vs de intensidad reducida), fuente de progenitores hematopoyéticos, ... obteniendo resultados poco aplicables entre distintos estudios. No obstante, de los diferentes estudios publicados, se observan altas tasas de injerto que se

encuentran entre el 95 y el 100%, con una probabilidad de recaída o progresión estimada de aproximadamente un 25-40% de los pacientes. Uno de los principales hándicaps de esta técnica es la mortalidad asociada al tratamiento, con unas tasas de mortalidad no relacionada con la recaída de entre el 12 y 40% según los grupos (23,48,53). Para resumir, el éxito de un trasplante dependerá del estado de la enfermedad en el momento del TPH, la citogenética, la edad y comorbilidades del paciente. Estos factores deberán ser tomados en cuenta a la hora de elegir el mejor régimen de acondicionamiento, el tipo de donante y la fuente de progenitores. Gracias a esta adecuación en el plan de trasplante, en los estudios más recientes, se observa que las tasas de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y las recaídas han disminuido y la supervivencia global ha mejorado hasta el 40% a 5 años (53,54).

A pesar de los distintos tipos de tratamientos descritos anteriormente, no existe una aproximación terapéutica estandarizada para los pacientes con esta enfermedad, ni tampoco se ha probado una efectividad en ninguno de los tratamientos que haga modificar el curso natural de la LMMC. En este sentido, posiblemente un conocimiento mayor de la biología celular y molecular de la célula tumoral de esta enfermedad pueda ofrecer a los clínicos nuevas posibilidades de tratamiento, siendo estos mucho más específicos y dirigidos para cada uno de los pacientes con LMMC.

6. PATOGÉNESIS MOLECULAR DE LA LMMC

Las nuevas metodologías como son el *single-nucleotide polymorphism arrays (SNP-Array)* y la *comparative genomic hybridization (CGH)* han sido capaces de revelar alteraciones cromosómicas que resultaban ser invisibles para la citogenética convencional, como pueden ser las microdeleciones o las microduplicaciones. En el caso de la LMMC estas alteraciones se han detectado hasta en un 49% de los pacientes (55). Además, gracias a estas técnicas es posible detectar zonas de pérdida de heterocigosidad (del inglés LOH) debidas a disomías uniparentales adquiridas (uniparental disomy, UPD) y que son alteraciones comúnmente observadas en neoplasias mieloides incluidos los SMD/NMPs. Concretamente en la LMMC, estas alteraciones de pérdida de heterocigosidad debido a una disomía uniparental pueden detectarse hasta en el 50% (16) de los casos, siendo más frecuentes en los cromosomas 1p, 4q, 7q y 11q (56). Además de las alteraciones cromosómicas, en estos últimos años

las nuevas técnicas de biología molecular, como es la secuenciación masiva, han permitido detectar nuevas alteraciones moleculares en genes concretos que pueden jugar un papel importante en la biología de la LMMC, así como en el pronóstico y la supervivencia de estos pacientes. Los primeros estudios basados en la patogénesis molecular de la LMMC aparecieron en el año 1987 tras encontrar una mutación activa en el gen *NRAS* (57), y después en *KRAS* (57), observándose en el 30% de los pacientes con LMMC. Más recientemente, las nuevas tecnologías han permitido la identificación de mutaciones en nuevos oncogenes y genes supresores de tumores que participan en distintos mecanismos y procesos biológicos de la célula tumoral (29).

6.1 *MUTACIONES EN GENES IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR E INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS*

Genes de la familia *RAS*: Fueron las primeras mutaciones descritas y se estima que ocurren entre el 25-30% de los casos de LMMC (57). Se describieron inicialmente en el gen *NRAS* localizado en el cromosoma 1p13.2 y posteriormente en el gen *KRAS* localizado en el cromosoma 12p12.1. Estas mutaciones contribuyen a la evolución de la LMMC a una LMA o a una LMMC-MP ya que producen un aumento de la proliferación celular y la reducción de la apoptosis en las células tumorales (12), dando lugar a una ventaja proliferativa y como consecuencia a una expansión del clon aberrante (7).

***RUNXI*:** Se trata del gen Runt-related factor 1, localizado en el cromosoma 21q22.3. Tiene una función fundamental en la hematopoyesis mediante la regulación de CBF (*core binding factor*). Las mutaciones en este gen se detectan en un 30-40% de los pacientes con LMMC (57,58). Se ha intentado relacionar esta alteración molecular con los diferentes subtipos de LMMC según la clasificación FAB, debido a que *RUNXI* podría estar implicado en los cambios mielodisplásicos (59), pero las mutaciones en este gen se han detectado tanto en pacientes que presentan la variante mieloproliferativa como la mielodisplásica (57,59), indicando que tienen que existir otros factores relacionados con los subtipos de esta enfermedad.

***CBL*:** Se trata del gen Casitas B-cell lymphoma localizado en el cromosoma 11q23.3. La mayoría de las mutaciones en este gen se localizan en el dominio cuya función es la de unión del dominio tirosin kinasa (TKB, del inglés *tyrosin kinase binding*) al dominio

de dedos de RING. Esta secuencia de unión garantiza la regulación negativa del propio CBL (12,60). Este gen aparece mutado de manera muy variable, entre el 5 y el 22% de los casos (30,55,61) y en la actualidad se desconoce su impacto en la enfermedad y en el pronóstico de la misma (55,62).

JAK2: Janus kinasa 2, localizado en el cromosoma 9p24. Desde el descubrimiento en el año 2005 de las mutaciones en el gen *JAK2*, en especial la mutación V617F, esta mutación ha sido ampliamente estudiada en las distintas neoplasias mieloproliferativas crónicas Philadelphia negativas. Las mutaciones en *JAK2*, conllevan la activación de la vía STAT de manera constitutiva, provocando el crecimiento descontrolado del clon maligno (1,63). En el caso de los SMD/NMPs, las mutaciones en *JAK2* acontecen con una frecuencia menor que en las NMPs Philadelphia negativas, y en el caso concreto de la LMMC, esta mutación ha sido detectada aproximadamente en un 10-20% de los casos (30,55,63-67).

6.2 MAQUINARIA DEL ESPLICEOSOMA

El splicing constitutivo y alternativo del RNA se trata de un mecanismo para la regulación génica que aporta diversidad proteica y ocurre en todos los tipos celulares humanos. Varios genes que participan en la regulación de este mecanismo se han detectado mutados en el caso de la LMMC:

SRSF2: Serine/arginine-rich splicing factor 2, también conocido como SC35, es un miembro de la familia de las serina-proteínas (SR protein). Este gen está localizado en el cromosoma 17q25.1. En la LMMC, *SRSF2* es el gen del espliceosoma más comúnmente mutado (28-47%) y se ha asociado a pacientes con mayor edad, anemia leve y alteraciones del cariotipo (cariotipo diploide, trisomía del cromosoma 8, monosomía/delección del cromosoma 7, delección 20q o cariotipo complejo). La media de supervivencia de los pacientes con LMMC que presentaba mutación en el gen *SRSF2* es de 16 meses, y observaron una tasa de transformación leucémica del 13% (51), mientras que los pacientes que no presentaban la mutación en este estudio era de 17 meses con una tasa de transformación leucémica del 17%. Pero habría que añadir, que en la LMMC, las mutaciones en *SRSF2* no han sido capaces de demostrar su impacto pronóstico independientemente de otros factores pronósticos ya conocidos.

SF3B1: Gen localizado en el cromosoma 2q33.1. Gracias al estudio de Patnaik y colaboradores, sabemos que la frecuencia de mutaciones en este gen es del 6% en los pacientes con LMMC (51). Entre los pacientes con LMMC que presentaban mutaciones en el gen *SF3B1*, en el 54% se observaron a su vez alteraciones en el cariotipo. A pesar de que las mutaciones en *SF3B1* se han asociado a fenotipos menos agresivos de la LMMC, estas mutaciones no implican una mejor evolución de la enfermedad. Del estudio mencionado podemos extraer una mediana de supervivencia de 17 meses, igual que los pacientes que no presentaban mutaciones en *SF3B1* y una tasa de transformación a LMA del 15%, mientras que en el grupo de pacientes sin la mutación era del 17%.

U2AF35 (o ZRSR2): Se localiza en el cromosoma Xp22.1. Las mutaciones en este gen se han encontrado en un 9% de los pacientes con LMMC, de los cuales el 85% presentaban también alteraciones en el cariotipo. La mediana de supervivencia fue de 20 meses y la tasa de transformación leucémica del 5% (51). Tasa sorprendentemente mejor que la presentada por los pacientes sin la mutación que alcanzaba el 17% de transformación leucémica. Frecuentemente, las mutaciones en *U2AF35* se han detectado en asociación con las alteraciones en el cromosoma 20 y mutaciones en el gen *ASXLI*, y esta asociación parece estar relacionada con estadios avanzados de la enfermedad y la progresión a una LMA.

Al parecer todas estas mutaciones en genes relacionados con el spliceosoma (*SRSF2*, *SF3B1* y *U2AF35*) son excluyentes entre sí pero tomadas en conjunto, no está claro el papel que desempeñan en la LMMC, debido a que en los diferentes análisis estadísticos no presentan un impacto significativo e independiente en el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad. A diferencia de otras neoplasias mieloides donde las mutaciones en estos genes presentan un claro impacto negativo en su pronóstico, su asociación es menos clara en la LMMC, donde el pronóstico parece estar determinado por las diferentes combinaciones que pueden tener las mutaciones de estos genes con mutaciones en otros genes (51).

6.3 OTRAS ALTERACIONES Y CONSIDERACIONES

Con una menor frecuencia que en los genes descritos anteriormente, menos del 10% de los pacientes con LMMC estudiados, se han detectado mutaciones en los genes *SETBP1*

(68), *NPM1* o *FLT3* (5). Estas alteraciones que podrían condicionar la evolución de los pacientes con LMMC se han puesto en evidencia al estudiar pacientes con LMA secundaria a LMMC y/o grupos de pacientes que incluyen LMMCs de novo y SMDs (5, 69). Por este motivo, aunque el porcentaje sea menor, estas mutaciones parecen jugar un papel importante en el pronóstico de la LMMC (69) y/o en el riesgo de transformación a LMA precoz (0.5 meses de tiempo de transformación a LMA en paciente con adquisición de la mutación en *NPM1* en el trabajo de Courville (5)) pero el número de eventos reportados es demasiado pequeño como para encontrar una significancia estadística (5).

Como conclusión conjunta, todas las mutaciones descritas hasta este momento, si las consideramos de acuerdo a la teoría de los dos hitos (del inglés, two-hit theory) podríamos intuir que se tratan de mutaciones que condicionan la progresión y no tanto el inicio, al igual que se ha descrito en otros SMD. De acuerdo con esta teoría harían falta dos tipos de mutaciones diferentes para el desarrollo de la LMMC: las mutaciones de clase I que median la proliferación celular y las de clase II, que son aquellas que provocan un freno en la diferenciación celular (12,13). Aunque la caracterización molecular de las neoplasias mieloides es difícil de relacionar con sus características clínicas, la información proporcionada por los estudios genéticos será crucial para definir la fisiopatología, y posiblemente podrá ayudarnos a establecer una clasificación molecular que nos permita definir mucho mejor el riesgo pronóstico de los SMD/NMP y quizás encontrar tratamientos específicos que modifiquen las consecuencias de estas alteraciones moleculares (67).

6.4 MUTACIONES EN GENES QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS

En los últimos años, en las distintas NMP y SMDs, incluyendo la LMMC, una de las familias de genes en las que se han detectado mutaciones y ha suscitado un gran interés en la comunidad científica, es la familia de genes que participan en la regulación de los mecanismos epigenéticos de la célula, como son los genes *TET2*, *IDH1* e *IDH2*, *ASXL1*, *EZH2* o *UTX* (55,63,67,70-74). Debido a que los objetivos de esta tesis doctoral están directamente relacionados con el análisis de estos mecanismos epigenéticos, a continuación, se detallarán más específicamente estos mecanismos y la implicación de su regulación en la LMMC.

7. EPIGENÉTICA

El término de “epigenética” fue mencionado en primer lugar por Conrad H. Waddington en 1942 (75), definiéndose la “epigenética” como aquellos cambios heredables en la expresión génica que no son debidos a cambios en la secuencia de DNA (76-78). La epigenética involucra múltiples procesos, siendo tres los mecanismos conocidos en la actualidad y que trabajan de manera coordinada para regular la expresión génica: **Metilación del DNA**, **Modificación de las histonas** y **el Remodelado de los nucleosomas**. La relación entre estos tres mecanismos, en la célula normal, está íntimamente ligado al silenciamiento en genes relevantes (**Figura 2**) (76,79,80).

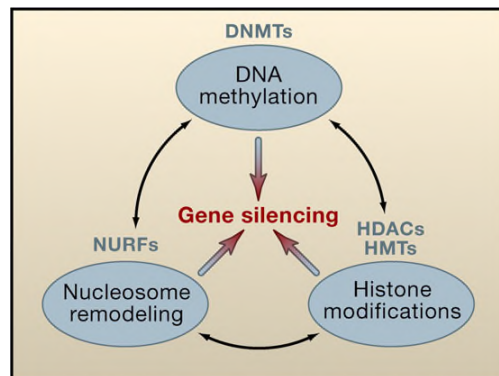


Figura 2. Representación de los mecanismos de silenciamiento génico que se dan de manera fisiológica en las células normales. Extraído del artículo de Jones et al Cell 2007 “The epigenomics of cancer”. (76)

El conocimiento de todos estos mecanismos (tanto los externos como los propios del genoma) nos da la clave para el entendimiento de la actividad del genoma, ya que regulan el transcriptoma que dará lugar finalmente a un fenotipo único de cada célula.

Metilación del DNA

Debido a que el objetivo de esta tesis doctoral se sustenta en el estudio de la metilación del DNA, a continuación, se describe este mecanismo epigenético más ampliamente.

La metilación del DNA es la alteración epigenética mejor caracterizada de los tres mecanismos epigenéticos descritos anteriormente. Consiste en la adición química de un grupo metilo (CH₃) en el carbono 5 de una citosina que precede a una guanina dando lugar a una 5-metilcitosina (5mC). La metilación no altera el emparejamiento de bases,

pero altera las interacciones entre el DNA y las proteínas pudiendo modificar la transcripción de los genes. En mamíferos, esta modificación covalente tiene lugar de forma predominante en las citosinas que preceden a guaninas y que forman los denominados dinucleótidos CpG (citosina-fosfato-guanina) y es catalizada por las enzimas llamadas DNA metiltransferasas (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B). Inicialmente se determinó que la metilación o no metilación de las zonas promotoras determinaba el silenciamiento o expresión de los genes (**Figura 3**), pero en la actualidad se puede comprobar que las islas CpG se pueden asociar con la no metilación de las regiones promotoras de los genes, lo que define la importancia de la metilación del DNA para la expresión génica, y especialmente para el silenciamiento transcripcional. Ejemplos de casos en las que islas completamente metiladas están asociadas a numerosos genes transcripcionalmente silentes en el cromosoma X de las mujeres y los alelos silenciados en algunos “genes impronta” (76-77). A diferencia de lo que ocurre en las células normales, en las células tumorales observamos una hipometilación global del DNA y una anormal hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras de distintos genes supresores de tumores (81,82).

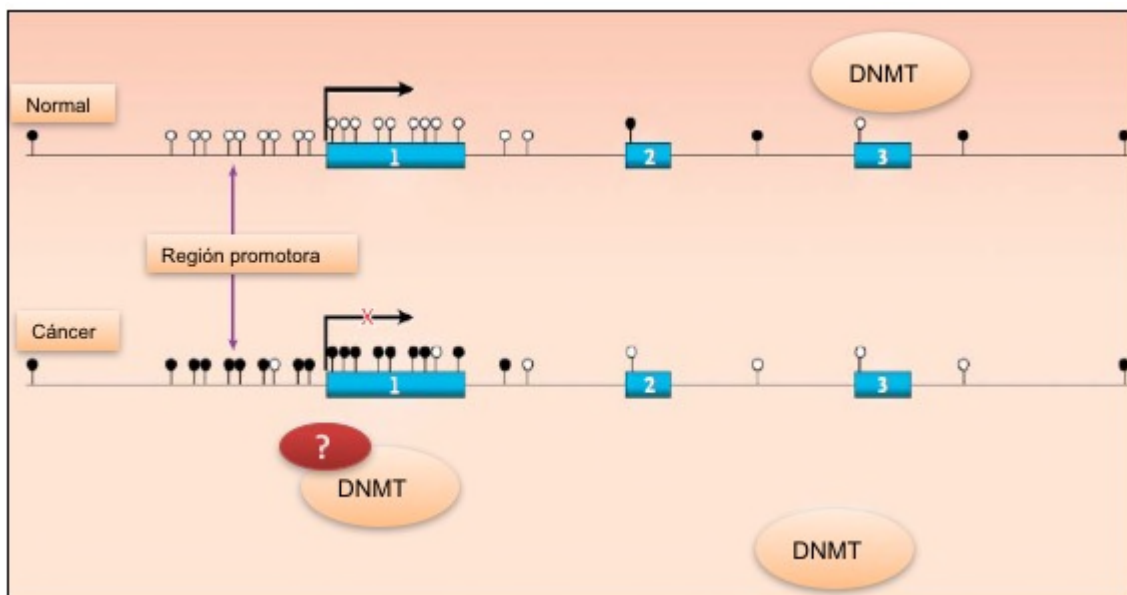


Figura 3. Esquema que muestra las diferencias en la metilación del DNA de las células normales y las células tumorales. Extraído del artículo Herman et al, NEJM 2003 “Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation”(77)

Pero, ¿qué son la hipometilación y la hipermetilación del DNA? y ¿qué papel juegan estos estados en las enfermedades oncológicas?

La **hipometilación** del DNA (o pérdida de metilación del DNA genómico) en los tumores se produce fundamentalmente en las regiones de DNA repetitivo y en los intrones, contribuyendo a la inestabilidad genética y cromosómica, a la activación de retrotransposones, secuencias virales y repetitivas y a la pérdida de los patrones de imprinting (77). Este fenómeno se ha observado, por ejemplo, en un modelo de ratón con pérdida importante de la metilación del DNA, que ya en las primeras semanas de vida desarrollan linfomas tímicos (83). Además, la hipometilación global del genoma puede favorecer a recombinaciones mitóticas con la consiguiente pérdida de heterocigosidad y la promoción de los reordenamientos cromosómicos (81). Junto con todo esto, la hipometilación de las regiones de DNA centromérico contribuye a la aneuploidia de las células tumorales (78). Pero la implicación completa de la demetilación global del DNA observada en la carcinogénesis, sobre todo en los de origen hematológico, debe ser explorada con mucho más detenimiento (78).

Por otro lado, la **hipermetilación del DNA**, se trata de la ganancia anómala de la metilación del DNA en el genoma. Esta ganancia se produce sobre todo en las islas CpG de las regiones promotoras de genes supresores de tumores, constituyendo el evento epigenético más importante en el desarrollo del cáncer y que parece ocurrir de forma temprana en el desarrollo tumoral (78) (**Figura 2**). La hipermetilación del DNA en los promotores de genes con islas CpG puede afectar a genes implicados en el control del ciclo celular, las interacciones célula-célula, la resistencia a drogas, la regulación de los mecanismos de reparación del DNA, la detoxificación, apoptosis y angiogénesis, todos ellos desregulados en los distintos tipos de tumores (81). Aunque hay genes que presentan una hipermetilación del DNA en varios tipos tumorales, se considera que cada perfil de hipermetilación es específico del tipo tumoral, pudiendo asignarse a cada tumor un patrón específico conocido como “metiloma” (76,78,84). Normalmente, la inapropiada metilación del DNA en las islas CpG localizadas en las regiones promotoras de genes supresores de tumores, se asocia con una pérdida o disminución de la expresión de estos. En relación con las neoplasias mieloides, en estos últimos años, en el estudio de las alteraciones moleculares implicadas en la tumorigénesis, nos hemos encontrado, a diferencia de la 5mC, con otro estado de metilación del DNA, y que conocemos como **hidroximetilación**. Este mecanismo consiste en la conversión de la 5 metilcitosina (5mC) en 5 hidroximetil-Citosina

(5hmC), reacción que viene catalizada en parte por la familia de las proteínas TET (85). Las proteínas TET (TET1, TET2 y TET3) catalizan la oxidación consecutiva de la 5mC en 5hmC, 5fC (5-ferroxiCitosina) o 5caC (5-carboxiCitosina) utilizando como cofactores el hierro (Fe(II)) y el alfa-ketoglutarato (α -KG), siendo productos intermedios de la reacción la 5hmC y 5fC y el producto final la 5caC. Estas modificaciones, contribuyen por tanto directamente a la modificación del estatus de la metilación del DNA. Distintos estudios han demostrado que la hidroximetilación de la citosina metilada, puede ser el primer paso para que se produzca una desmetilación de la citosina y como consecuencia, de la región del genoma y por tanto dar lugar a una activación de la transcripción génica (**Figura 4**) (63,85-88).

CICLO DNA METILACIÓN-DESMETILACIÓN

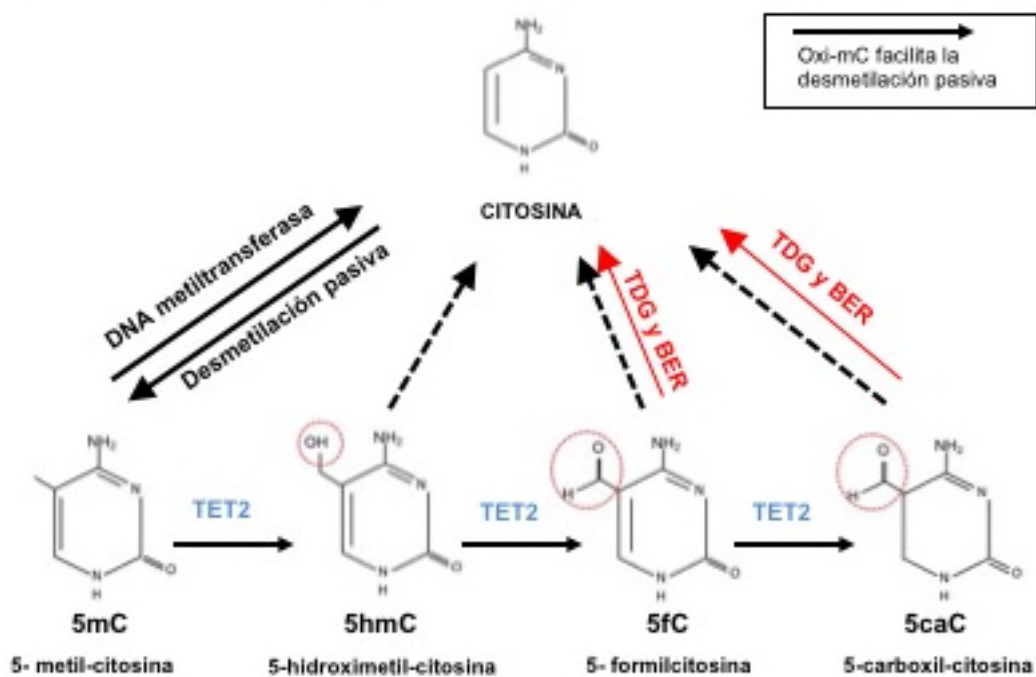


Figura 4. Funciones de las proteínas TET. Las proteínas TET controlan la metilación y desmetilación dinámica. Las DNMTs añaden un grupo metilo a la posición 5 de la citosina en el contexto de dinucleótidos CpG para producir la 5mC. Las proteínas TET son dioxigenasas dependientes de Fe(II)/ α ketoglutarato que oxidan la 5mC de manera sucesiva en 5hmC, 5fC y 5caC. De manera pasiva los productos son diluidos y convertidos en citosinas cuando el mantenimiento de la metilación está bloqueado, durante la replicación del DNA. Además, 5fC y 5caC son directamente escisionadas por la TDG (del inglés, thymine DNA glycosilase), luego son reemplazadas con una citosina desmetilada a través de la vía de reparación VER (del inglés, Base excision repair). **Imagen extraída y modificada de TET proteins and –methylcytosine oxidation in hematological cancers. (99)**

Como hemos avanzado anteriormente y como desarrollaremos en apartados siguientes, *TET2* es un gen que aparece mutado en un alto porcentaje de patologías mieloides (SMD, NMP, LMA y LMA secundaria), incluida la LMMC. Se trata de mutaciones somáticas que provocan una pérdida de la función de la proteína *TET2*, comprometiendo su actividad catalítica. Esto se traduce en niveles menores de 5hmC y en una selección de diferenciación celular hacia monocito. Ko y col demuestran en su trabajo publicado en el año 2010 que la proteína *TET2* es importante para la mielopoyesis y sugiere que una alteración en la actividad normal de *TET2* podría favorecer a la patología tumoral mieloides, posiblemente afectando al metiloma de estas células (85).

7.1 EPIGENETICA Y LMMC

En el caso concreto de la LMMC, los estudios realizados sobre la metilación del DNA y su consecuencia en los cambios de la expresión génica son muy pocos. Al inicio de los estudios sobre la metilación del DNA, el grupo alemán liderado por Lehmann (89) publicó un trabajo sobre la relación entre la metilación del DNA en el gen *p15^{INK4b}* y la LMMC (gen que se había demostrado que estaba silenciado debido a una inapropiada metilación del DNA en la LMA y SMDs). Este grupo demostró una metilación del DNA aberrante de *p15^{INK4b}* en un 58% de las muestras de pacientes con LMMC (33 LMMC). Además, observaron que el grado de metilación aberrante del DNA se correlacionaba con los niveles de mRNA y de la expresión proteica disminuida de este gen. Estos resultados hacían concluir que la metilación aberrante del DNA en *p15^{INK4b}* es una alteración frecuente en la LMMC que podría contribuir directamente a la patogénesis de esta enfermedad. Este trabajo es uno de los pocos trabajos que muestra una clara relación entre la metilación aberrante del DNA y la LMMC. Sin embargo, a raíz de este trabajo y las alteraciones genéticas detectadas en genes que participan en la regulación de los mecanismos epigenéticos, han surgido con mucha mayor fuerza y seguimiento por los diferentes grupos de trabajo, estudios que analizan las alteraciones en estos genes y su implicación en la regulación de los mecanismos epigenéticos. Tal y como hemos mencionado anteriormente, en la LMMC, al igual que en otras neoplasias mieloides, se han detectado mutaciones en varios genes implicados en la regulación de los mecanismos epigenéticos y en especial de la metilación del DNA como son los genes *DNMT3*, *IDH1* e *IDH2*, *EZH2*, *ASXL1* y *TET2* (55,63,67,70-74), cobrando un

gran interés el estudio de este mecanismo epigenético en este tipo de tumores humanos. Se ha demostrado que estas alteraciones moleculares de genes que regulan los mecanismos epigenéticos, están implicados en la génesis, evolución, pronóstico y supervivencia de la LMMC. Entre estos genes, los que mayor interés han suscitado son:

TET2: Tet oncogene family member 2, localizado en el cromosoma 4q24 (55,67). La región del cromosoma 4q24 ha sido la región genómica más estudiada y donde más mutaciones se han encontrado tanto en pacientes con SMD/MPN como en la LMA secundarias a SMD/MPN (55,63,67). Curiosamente, en neoplasias mieloproliferativas se ha observado que estas mutaciones en el gen *TET2* preceden a la adquisición de mutaciones asociadas a la progresión de los SMDs, como son las mutaciones en *JAK2* (V617F) o *MPL* (W515). El gen *TET2* media la hidroxilación de la 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5hmC) en el DNA, lo que parece puede ser un primer paso de la desmetilación del DNA (1) y por ello, distintos estudios sugieren que *TET2* pueda participar como un gen supresor de tumores (67,69,90).

En el caso concreto de la LMMC, se considera que la frecuencia de aparición de mutaciones en el gen *TET2* es de hasta en un 50% de los casos (63,67,91) y se ha postulado que estas mutaciones podrían participar directamente en la patogénesis de esta enfermedad. En estudios realizados en animales se ha visto que una función disminuida de la proteína *TET2* conlleva a una hematopoyesis anormal y estos ratones desarrollan una enfermedad parecida a la LMMC humana (LMMC-like), indicando que la función alterada de *TET2* podría ser necesaria para la patogénesis de la enfermedad (92,93). En el caso de la LMMC humana, la relación del estado mutacional de *TET2* con los niveles de metilación del DNA ha sido evaluada por varios grupos (87,88). En estos estudios se han descrito diferentes niveles de metilación del DNA en función del área estudiada y la presencia o no de la mutación en *TET2*. En esta dirección, en la actualidad sabemos que los pacientes con LMMC y *TET2* no mutado presentan islas CpG hipermetiladas mientras que las zonas fuera de estas islas CpG aparecen hipermetiladas en los pacientes con presencia de *TET2* mutado. En el trabajo realizado por Yamazaki y colaboradores (87) los autores detectaron que los pacientes con *TET2* mutado presentaban mayores niveles totales de 5mC, pero este aumento no se reflejaba en un aumento de la metilación del DNA en promotores con clara definición de isla CpG. Únicamente detectaron cambios en el promotor de los genes *AIM2* y *SPI40* y

ambos promotores no se definían por englobar una isla CpG. Estos resultados indican que las mutaciones en *TET2* afectan a los niveles globales de metilación del DNA en la LMMC, pero la mayoría de estos cambios probablemente ocurran en dinucleótidos CpG que no conforman islas CpGs en regiones promotoras de los genes. Este mismo grupo, en un estudio posterior confirmo estos mismos resultados, indicando que las mutaciones en *TET2* no afectan de una manera significativa a los niveles globales de la metilación del DNA, pero sí de una manera concreta y específica a los niveles de metilación del DNA en dinucleótidos CpG que se localizan fuera de islas CpG, pero sobre todo dinucleótidos CpG localizados en regiones de unión de factores de transcripción en regiones enhancer importantes para la hematopoyesis (88).

A pesar del conocimiento sobre la implicación de las mutaciones en el gen *TET2* en los niveles de la metilación del DNA y posiblemente en la patogénesis de la LMMC, el papel que estos juegan en la evolución y pronóstico de los pacientes diagnosticados de esta enfermedad no está nada claro. Se ha descrito que los pacientes con LMMC de alto riesgo pero con unos niveles más bajos de 5hmC, presentan una mejor supervivencia (55). También que los pacientes con mutaciones en *TET2* se asocian a su vez con cariotipos normales o de bajo riesgo (30,55,70), por lo que ambas observaciones indicaban el papel protector de las mutaciones en *TET2*. Por el contrario, otros grupos han demostrado que la adquisición de las mutaciones en *TET2* podría conllevar a un mayor riesgo de transformación hacia una LMA (67,94) en comparación con los pacientes con LMMC que no presentan mutaciones. Jankowska y colaboradores a su vez mostraron una relación de las características clínicas de la LMMC y las mutaciones en *TET2* (55), describiendo una correlación entre las mutaciones de *TET2* y el conteo elevado de leucocitos y monocitos. Pero a pesar de todos estos estudios, en la actualidad no es posible establecer con certeza que impacto pronóstico real tienen las mutaciones en el gen *TET2* en los pacientes con LMMC (67).

IDH1 e IDH2: Profundizando en el estudio de la epigenética en hematología, las alteraciones en los genes *IDH* surgieron como alteraciones determinantes de la biología de la LMMC. Inicialmente, las mutaciones en *IDH1* (isocitrato dehidrogenasa-1, localizado en el cromosoma 2q34) y su homólogo *IDH2* (localizado en el cromosoma 5q26.1) fueron detectadas en tumores mieloides (71,72), especialmente en la LMA y en la LMA secundaria con una frecuencia de aparición de aproximadamente en el 20% de

los pacientes (55,71,74). Posteriormente se describió que estas mutaciones podrían tener un papel importante en la leucemogénesis debido a que en estos casos se producía una acumulación de un “oncometabolito” (95), el 2-hidroxiglutarato (71,96), que está íntimamente relacionada con los mecanismos oxidativos del DNA (87). Posteriormente, en el 7.9% de los casos de LMMC se detectaron mutaciones en el gen *IDH2* (72). El papel de estas mutaciones en la LMMC no está claramente descrito, pero se postula que podrían participar en la misma regulación que participan las mutaciones de *TET2* (86,97).

DNMT3: es un gen localizado en el cromosoma 2p23 y que presenta una actividad metiltransferasa implicada en la metilación de novo del DNA. Las mutaciones en este gen parece que actúan de una manera dominante negativa reduciendo su actividad metiltransferasa *in vitro* en más del 50%. En el estudio del grupo de Cleveland en el que se ponía de manifiesto el impacto clínico que podrían tener las mutaciones en nuevos genes encontradas en la LMMC, se destaca la mayor presencia de *DNMT3* mutado en pacientes con LMMC-2 o LMA secundaria a LMMC (55). Pero hacen falta muchos más estudios para conocer con certeza la implicación tanto en la patogénesis como el pronóstico de estos pacientes.

ASXLI: (additional sex-comb like 1, localizado en el cromosoma 20q11.21) (55). Este gen, no media en la regulación de la metilación del DNA, pero debido a su implicación en el pronóstico ha cobrado muchísimo interés en el estudio de la LMMC. *ASXLI* es un modificador del grupo polycomb y de la cromatina (mixed lineage leukemia/trithorax). En asociación con *LSD1*, *ASXLI* está implicado en la demetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4), marca de cromatina abierta y asociado con una activación de la transcripción, y en el remodelado de la cromatina. Gelsi-Boyer y col describieron, en el trabajo realizado en el año 2009, que *ASXLI*, y en concreto una mutación que ocurre en el exón 12 de este gen, se detectaba en aproximadamente un 44% de los pacientes con LMMC (98). En 2010, este mismo grupo estudió la relación entre las mutaciones de *ASXLI* y el pronóstico de los pacientes con LMMC, concluyendo que: 1) las mutaciones en *ASXLI* eran más frecuentes en los pacientes con LMMC clasificados dentro del subgrupo mieloproliferativo (según una clasificación de la FAB ahora en desuso), ya que la mutación se asociaba a un número más elevado de leucocitos y monocitos tanto en SP como en MO y niveles más bajos de hemoglobina; 2) las mutaciones de *ASXLI* se

asociaban con mutaciones en *TET2* y *RUNX1* y por último 3) que la supervivencia global de los pacientes con mutaciones en *ASXL1* era mucho peor que la de los pacientes sin mutaciones en este gen (SG 27.6 meses vs no alcanzada a los 29.5 meses) (99). Estudios posteriores, han confirmado el porcentaje de pacientes con LMMC que presentan esta mutación en *ASXL1* (40%) y han postulado que esta mutación en *ASXL1* es un factor pronóstico independiente incluido en el score pronóstico de Itzykson y colaboradores (70). Sin embargo, aunque la mutación en *ASXL1* se ha podido relacionar con la progresión a LMA, no se ha podido confirmar con fiabilidad debido al número pequeño de pacientes con LMMC incluidos en los distintos estudios (99).

Tomadas en conjunto se podría decir, por tanto, que las mutaciones encontradas en genes implicados en la regulación de los mecanismos epigenéticos, y en concreto la metilación del DNA, pueden ser alteraciones que jueguen un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad y que pueden estar directamente asociados con la progresión de la enfermedad de LMMC (29). Debido a todo esto en esta tesis nos planteamos estudiar o profundizar en el estudio de las alteraciones que puede sufrir la metilación del DNA en la LMMC.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Se ha demostrado, que varios genes alterados genética y funcionalmente en las neoplasias mieloproliferativas, como es el caso del gen *TET2*, están implicados en la regulación de los mecanismos epigenéticos. En el caso concreto del gen *TET2*, se ha demostrado que es un gen que está implicado en la modulación de los niveles de metilación del DNA. Teniendo en cuenta estos datos, la hipótesis que nos planteamos para este estudio consistió en que el metiloma del DNA podría estar alterado en los pacientes con LMMC y que este podría ser diferente entre los pacientes con esta neoplasia según la presencia o no de mutaciones en genes que participan en la regulación de los mecanismos epigenéticos, incluso pudiendo ser un marcador para la clasificación y pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.

OBJETIVOS

Para responder a nuestra hipótesis, los objetivos que nos planteamos fueron:

1. Analizar el metiloma del DNA en muestras de pacientes con LMMC.
2. Estudiar la correlación del patrón de metilación del DNA y la presencia o no de mutaciones, en los pacientes con LMMC, en genes que participan en la regulación de los mecanismos epigenéticos.
3. Estudiar si existen diferencias en el metiloma del DNA en pacientes con LMMC que durante el curso de su enfermedad transforman o no a una LMA.
4. Estudiar el valor de la metilación del DNA como marcador pronóstico de la transformación a una LMA en los pacientes diagnosticados con LMMC.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES

Para los análisis que se han realizado en esta tesis doctoral, disponíamos de una primera serie de muestras procedentes de 24 pacientes diagnosticados de LMMC, según los criterios de la última revisión de la Organización mundial de la salud (OMS) de 2008, obtenidos en el momento de su diagnóstico. Todas las muestras procedían del Servicio de Genética de la Universidad de Navarra. Para el estudio inicial del patrón de metilación del DNA en la LMMC, se analizaron estas 24 muestras de pacientes con LMMC (**Tabla 8**, anexo 1) y 8 muestras más que se utilizaron como control (4 muestras provenientes de Médula Ósea (MO) y otras 4 de sangre periférica (SP) de donantes sanos). De estas 24 muestras de pacientes con LMMC, en 17 de ellas además contábamos con la información clínica, y con un seguimiento clínico completo mayor de 5 años. En este sentido, disponíamos de datos clínicos suficientes que nos permitían determinar cuál de los pacientes había transformado a una LMA o si en cambio permanecían en un estado crónico de la enfermedad en los 5 años mínimos de seguimiento. La proporción observada entre pacientes en fase crónica y los transformados a leucemia aguda era similar a la observada en la población general de pacientes con LMMC, que se estima está en torno al 33% (5,100). (**Tabla 9**)

Para la validación de los resultados que obtuvimos en relación a la marca de metilación del DNA en el momento de la transformación a una leucemia aguda (explicado más adelante en este bloque en la página 58) a partir de la primera serie de pacientes con LMMC, conseguimos una segunda serie de 52 nuevos pacientes diagnosticados de LMMC (**Tabla 10**). Esta serie correspondía a una serie de pacientes con LMMC de Alemania.

Tabla 9. Datos de la primera serie de pacientes con LMMC (serie de Pamplona). Se muestra la información del diagnóstico según la OMS y el estado de la enfermedad (transformado o no transformado) en la última visita.

Paciente	Transformado/No Transformado
CMML1	NO TRANSFORMADO
CMML2	NO SEGUIMIENTO
CMML3	NO TRANSFORMADO
CMML4	NO TRANSFORMADO
CMML5	NO TRANSFORMADO
CMML6	NO TRANSFORMADO
CMML7	NO SEGUIMIENTO
CMML8	TRANSFORMADO
CMML9	NO TRANSFORMADO
CMML10	NO SEGUIMIENTO
CMML11	NO SEGUIMIENTO
CMML12	NO SEGUIMIENTO
CMML13	NO SEGUIMIENTO
CMML14	NO TRANSFORMADO
CMML15	NO TRANSFORMADO
CMML16	NO SEGUIMIENTO
CMML17	TRANSFORMADO
CMML18	TRANSFORMADO
CMML19	NO TRANSFORMADO
CMML20	TRANSFORMADO
CMML21	NO TRANSFORMADO
CMML22	NO TRANSFORMADO
CMML23	TRANSFORMADO
CMML24	NO TRANSFORMADO

Tabla 10. Datos clínicos de los pacientes de la serie de pacientes con LMMC de Alemania. Se muestra la información del diagnóstico según la OMS y el estado de la enfermedad en su última visita (transformado si/no a LMA).

Paciente	Diagnóstico	Transformado
PA-1	MDS CMML-1	No
PA-2	MDS CMML-2	Si
PA-3	MDS CMML-1	No
PA-4	MDS CMML-2	No
PA-5	MDS CMML-1	Si
PA-6	MDS CMML-1	No
PA-7	CMML-2	No
PA-8	CMML-2	No
PA-9	CMML-2	No
PA-10	CMML-1	No
PA-11	CMML-2	Si
PA-12	CMML-1	No
PA-13	CMML-1	No
PA-14	CMML-1	No
PA-15	CMML-1	No
PA-16	CMML-2	No
PA-17	CMML-1	No
PA-18	CMML-1	No
PA-19	CMML-1	No
PA-20	CMML-1	No
PA-21	CMML-1	No
PA-22	CMML-2	Si
PA-23	CMML-1	No
PA-24	CMML-1	Si
PA-25	CMML-2	No
PA-26	CMML-1	No
PA-27	CMML-2	Si
PA-28	CMML-1	No
PA-29	CMML-2	No
PA-30	CMML-2	No
PA-31	CMML-1	No
PA-32	CMML-1	No
PA-33	CMML-1	No
PA-34	CMML-2	No
PA-35	CMML-1	No
PA-36	CMML-2	No
PA-37	CMML-1	No

PA-38	CMML-1	No
PA-39	CMML-1	No
PA-40	CMML-1	No
PA-41	CMML-2	No
PA-42	CMML-1	No
PA-43	CMML-1	No
PA-44	CMML-1	No
PA-45	CMML-1	No
PA-46	CMML-1	No
PA-47	CMML-1	No
PA-48	CMML-1	No
PA-49	CMML-2	No
PA-50	CMML-1	No
PA-51	CMML-1	No
PA-52	CMML-1	No
PA-53	CMML-1	Si

Por último, se dispuso de una tercera pequeña serie de muestras procedentes de 11 pacientes con LMMC de la Universidad de Navarra. Para esta tercera serie se solicitaron muestras de pacientes diagnosticados de LMMC según los criterios de la OMS, con las condiciones de que fueran muestras tomadas al diagnóstico y los pacientes tuvieran un seguimiento mayor que dos años. Con estas características, obtuvimos DNA de 11 nuevos pacientes con LMMC (**Tabla 11**).

Tabla 11. Tabla resumen de las muestras de pacientes con LMMC de la tercera serie en estudio. Se muestra la información del diagnóstico según la OMS y el estado de la enfermedad en la última visita.

paciente	Diagnóstico	Transformado
PA-1	LMMC	NO
PA-2	LMMC	NO
PA-3	LMMC	NO
PA-4	SMD	NO
PA-5	LMMC	NO
PA-6	LMMC	NO
PA-7	LMMC	NO
PA-8	LMMC	NO
PA-9	LMMC	SI
PA-10	LMMC	SI
PA-11	monocitosis	SI

2. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del DNA genómico proveniente de las muestras de MO o SP de los pacientes diagnosticados de LMMC así como de las muestras obtenidas desde los donantes sanos, se ha realizado mediante la utilización del kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Este proceso de purificación del DNA consiste en cuatro fases.

Paso 1: **acceso a las hebras de DNA**: mezclamos el pellet seco de células con PBS (tampón de fosfato sódico), mezclando con micropipeta o vórtex. Con ello conseguimos la ruptura de las membranas celulares y accedemos a las hebras de DNA.

Paso 2: **separación del DNA**: el producto anterior lo mezclamos con 20µl de solución de proteinasa K y 40µl de Buffer AS2, mezclando vigorosamente con vórtex y se incuba a 56°C durante 10 minutos. De esta manera conseguiremos completar la separación del DNA del núcleo de la célula y del resto de las estructuras celulares.

Paso 3: **lavados**: para este paso contamos con los búferes específicos del KIT junto con el etanol (200 µl/180 µl de muestra) y a través de las columnas de decantación es posible retirar los detritus propios de las células y quedarnos con el DNA propiamente dicho en la membrana de la columna proporcionada en el kit.

Paso 4: **elución**: para este último paso nos quedaremos con la columna que contiene el DNA y se añade agua o buffer AE (50 µl) y se centrifuga durante 1 minuto a 8000rpm. El producto de esta centrifugación será nuestro DNA genómico.

El DNA extraído se cuantificó mediante la utilización del Nanodrop y se almacenó a 4°C para su posterior análisis de la metilación del DNA tras la modificación de este con Bisulfito Sódico.

3. ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE MUTACIONES

Para los estudios moleculares contamos con la colaboración del Servicio de Genética de la Universidad de Navarra. La detección de la mutación *JAK2V617F* fue llevada a cabo por la técnica de ARMS y las mutaciones en los genes *TET2*, *EZH2*, exón 4 de *IDH1*

(hotspot R132) y exón 4 de *IDH2* (hotspots R140 y R172) mediante secuenciación sanger directa (71,74,101-103).

4. TRATAMIENTO CON BISULFITO SÓDICO

El tratamiento del DNA con Bisulfito Sódico es quizás uno de los métodos más usados en el estudio de la metilación del DNA, ya que precede a la mayoría de las técnicas cuantitativas o cualitativas basadas en métodos de Biología Molecular para el análisis de esta modificación epigenética. Este tratamiento se basa en la modificación de las citosinas que conforman los dinucleótidos CpG susceptibles de sufrir una metilación. Las citosinas no metiladas se modificarán en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen como tal, no sufriendo ningún cambio tras el tratamiento con Bisulfito Sódico. El bisulfito sódico desamina las citosinas que no están metiladas y actúa sobre una cadena sencilla de DNA. El producto intermedio que se forma en un medio ácido tras el tratamiento con Bisulfito Sódico, la 5,6-dihidrocitosina-6-6 sulfonato sódico, se transforma en uracilo en un medio alcalino debido a la degradación del bisulfito. Durante este tratamiento, las citosinas metiladas también están sujetas a un proceso de desaminación, que las convertirá en timinas. Sin embargo, la reacción es tan lenta que no se llega a la formación del producto final. Tras el tratamiento, la aplicación de técnicas de biología molecular como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permite diferenciar las citosinas metiladas de las no metiladas, debido a que estas últimas se convertirán en timinas durante el proceso de amplificación del DNA modificado con Bisulfito Sódico, mientras que las citosinas metiladas se mantendrán como citosinas durante este proceso (**Figura 5**).

Tratamiento del ADN con Bisulfito

ADN NO METILADO

ggg	gcg	gac	cgc	g
Modificación con Bisulfito				
ggg	gug	gau	ugu	g

ADN METILADO

ggg	^m g ^m cg	gac	^m c ^m g ^m c	g
Modificación con Bisulfito				
ggg	^m g ^m c ^m g	gau	^m c ^m g ^m c	g

Figura 5. Modificaciones producidas en la secuencia de DNA tras la modificación de este con Bisulfito Sódico según si las citosinas se encuentran metiladas o no metiladas.

En este estudio, la modificación con Bisulfito sódico del DNA genómico de las muestras de MO y SP de los pacientes con LMMC se ha realizado mediante la utilización del kit CpGenome™ DNA Modification Kit, de CHEMICON. Esta técnica consiste en:

Paso 1: modificación del DNA:

- En un tubo de 1.5 ml, añadimos 7 µl de NaOH a una concentración de 3M por cada microgramo de DNA y se completa la reacción hasta 100 µl con agua destilada. Según el protocolo, para mejorar la técnica cuando el DNA es escaso, se añaden 2 µl de reactivo IV. El orden de adición será: 1º agua, 2º reactivo IV, 3º DNA y 4º NaOH (3M).
- Incubación a 37°C durante 10 minutos en bloque térmico o baño.
- Añadimos a esta mezcla 550 µl de reactivo I y homogeneizar (sin vórtex). Se añade aceite mineral hasta cubrir las muestras.
- Incubar a 50°C durante 16-20h en bloque térmico o baño.

Paso 2: **inicio de desalación:**

- Se rescatan las muestras del aceite mineral y se traspasan a un nuevo tubo de 1.5 ml.
- Añadimos 5 μ l del reactivo III de modificación a cada muestra y se homogeneiza con micropipeta.
- Incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Centrifugamos a 5000g durante 30 segundos y decantamos el sobrenadante.
- Añadimos 1 ml de etanol al 70% a cada muestra. Mezclar con vórtex 5 segundos y centrifugar a 5000g durante 10 segundos. Descartar sobrenadante. Repetir este paso un total de 3 veces.
- Una vez desechado el sobrenadante de la tercera centrifugación, centrifugamos de nuevo la muestra a máxima velocidad durante 3 minutos y retiramos el sobrenadante con micropipeta.

Paso 3: **completar la modificación del DNA (desulfonación alcalina), segunda desalación y elución.**

- Añadimos a cada muestra 50 μ l de NaOH (20 mM)/90% EtOH y resuspendemos bien el pellet (desulfonación).
- Incubamos a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugamos a 5000g durante 10 segundos y sin decantar el sobrenadante le añadimos a la muestra 1 ml de etanol al 90%, mezclamos con vórtex, centrifugamos y eliminamos el sobrenadante. Este paso con etanol se realiza 2 veces (desalación).
- Tras haber desechado el sobrenadante de la última centrifugación, centrifugamos de nuevo a máxima velocidad durante 5 minutos y retiramos el sobrenadante con micropipeta.
- Resuspendemos el pellet en 25-30 μ l de Buffer TE e incubamos las muestras a 55°C durante 15 minutos (elución).
- Centrifugamos la muestra a máxima velocidad durante 3 minutos y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo. Este sobrenadante es el que contiene el DNA genómico modificado con Bisulfito sódico y se almacenará a -20°C para su posterior análisis de la metilación del DNA.

5. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES GENÓMICAS DE INTERÉS MEDIANTE PCR

Para la validación de los resultados obtenidos mediante los arrays de metilación del DNA, se realizó una amplificación de las regiones genómicas que incluían los CpGs de interés mediante la utilización de la técnica de PCR.

Técnica de PCR: La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de amplificación del DNA. Los elementos fundamentales para que se lleve a cabo esta reacción de amplificación son la secuencia de DNA genómico a amplificar, cebadores u oligos de DNA que hibridarán con la secuencia de DNA a amplificar y la TaqPolimerasa, enzima capaz de iniciar la reacción de extensión de la hebra de DNA a amplificar a altas temperaturas tras la hibridación de los cebadores. Para potenciar esta enzima contamos con la adición de Magnesio (Mg⁺). Por último, se precisan los dinucleótidos para la síntesis de la hebra de DNA (dNTPs) y el agua para completar la reacción.

La técnica de PCR consta de tres pasos:

Paso 1: **Desnaturalización:** las cadenas de DNA son sometidas a temperatura alta (94-95°C) durante un breve tiempo con lo que conseguimos la separación de las hebras de DNA.

Paso 2: **Hibridación:** se trata de la unión de los cebadores específicos a la hebra complementaria de DNA a amplificar. La temperatura a la que se da esta reacción es la llamada temperatura de unión o annealing (Ta) que será específica del par de cebadores utilizados para la reacción de PCR. Si la Ta es la correcta junto con un buen diseño de los cebadores, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Paso 3: **Extensión:** Es el momento en el que la Taq polimerasa comienza su acción catalítica sobre el complejo hebra-cebador agregando dNTPs complementarios para continuar con la cadena complementaria de ADN en dirección 5'-3'. Esta reacción se da a una temperatura de 72°C y el producto formado es llamado amplicón que tendrá una longitud concreta y conocida según el diseño y la localización de los cebadores utilizados.

Materiales necesarios y procedimientos para la PCR:

1.- **CEBADORES:** para realizar la PCR se han diseñado pares de cebadores específicos para la secuencia que contenía cada uno de los dinucleótidos CpG de interés. Un cebador para PCR debe ser un oligonucleótido corto (18-25pb), con una temperatura de

annealing (T_a) que suele estar comprendida entre los 50 y 68°C. Con el KIT empleado en nuestro trabajo (explicado a continuación), estas temperaturas de annealing o emparejamiento nos aseguran buenos resultados en la mayoría de los casos. Para elegir la temperatura ideal, en la que se obtiene mayor especificidad (amplicón más puro y específico), es necesario el proceso de puesta a punto en el que se disminuye unos 5°C la temperatura inicial dada por el laboratorio de síntesis de cebadores y se realiza la técnica de PCR a varias temperaturas hasta obtener la T_a ideal. La pareja de cebadores necesarios son un cebador directo y un cebador reverso, ambos complementarios para la hebra de DNA que queremos amplificar. En el caso del análisis de la metilación del DNA mediante la técnica de pirosecuenciación, ninguno de los dos cebadores utilizados para la amplificación de la región de interés y que contiene el o los dinucleótidos CpGs a analizar, debe contener dinucleótidos CpGs en su secuencia. Esto es importante debido a que en la pirosecuenciación queremos analizar los CpGs de interés tanto si están metilados como si no lo están, por tanto, debemos amplificar la región genómica de interés tanto si los CpG incluidos en ella están o no metilados. Además, en el caso de la pirosecuenciación, uno de los cebadores deberá estar Biotinilado (-bio) en posición 5', normalmente el cebador reverso, para conseguir la posterior unión a la estreptavidina y como consecuencia la purificación de una de las hebras para su posterior secuenciación por la técnica de pirosecuenciación.

Diseño de los cebadores para la pirosecuenciación (**Tabla 12**):

- Es necesario conseguir la secuencia de nucleótidos del gen de interés mediante la plataforma GENOME BROWSER. Se localiza el fragmento de DNA que contiene el CpG de estudio y se elige la secuencia que vamos a amplificar. Normalmente el fragmento suele ser de 100 a 1000 pb pero en nuestro caso elegimos como máximo un fragmento de 500 pb.
- Una vez conocida esta secuencia se utilizó el programa informático METHPRIMER para completar el diseño de los cebadores.
- Tras recibir los cebadores, estos se concentran a 100 mM y se conservaron a -20°C.

Tabla 12. Tabla resumen con la información de los cebadores específicos utilizados. Estos cebadores son los correspondientes al análisis mediante pirosecuenciación de los genes hipermetilados seleccionados para el estudio de los niveles de 5hmC en muestras de LMMC TET2-MUT y TET2-WT, y de los CpGs que comprenden la huella de CpGs diferencialmente metilados entre muestras de pacientes con LMMC que transforman o no a una LMMC. Se incluye nombre del CpG de interés, sentido del cebador, secuencia de cada cebador y la temperatura de melting utilizada para cada par de cebadores, número de ciclos utilizados en la PCR y tamaño del producto de PCR. En algunos casos, debido a la secuencia a amplificar, posiblemente por el alto contenido en CpGs, fue necesario realizar una NESTED-PCR. Esto consiste en realizar, tras la primera PCR, una segunda ronda de amplificación utilizando cebadores internos al producto de amplificación obtenido en la primera PCR.

GEN	PCR	CEBADORES	SECUENCIA	Ta (°C)	Nº CICLOS	AMPLIF.
LAX1	1º PCR	LAX1-D	TGTTTTATTAGTATATTGGTGGTGT	51	45	299bp
		LAX1-R	CAACAAATTTAATTCTACCTAAAC			
	NESTED-PCR	LAX1-PYR-1	GAGTTATTTTATTGGAAAGTATTAT	52	35	90bp
		LAX1-R	CAACAAATTTAATTCTACCTAAAC			
SLC22A12	1º PCR	SLC22A12-D	TTTTAAGATTTGGTATAGAGTAGGT	49	45	167bp
		SLC22A12-R	TTTTAACTAAAATTTAAAATATAACC			
	NESTED-PCR	SLC22A12-PYR-1	AAGTAGAGGAGGTTGTATTTTTT	50	40	128bp
		SLC22A12-R	TTTTAACTAAAATTTAAAATATAACC			
VHL	1º PCR	VHL-D	AGTGTTGGGTTTATGGGTATGAGT	59	45	98bp
		VHL-R	ATAAAAACTAAAAAACCCACCTCAA			
FAAH	1º PCR	FAAH-D	GTTGGTATGTTTGGTATGGGGT	56	45	239bp
		FAAH-R	GTTTTGATAGTTTTAGGTTTTGG-bio			
FUT3	1º PCR	FUT3-D	GTTTGTAGGTTTATTTAAGGTGGA	53	45	199bp
		FUT3-R	GTGGTGTGGGTTTTAGTAG-bio			
INS	1º PCR	INS-D	ATTTAGTATGGGTAGAAGGGGGTAG	59	45	293bp
		INS-R	TTAAGTAAAGTTTTGGGTGATTTGG-bio			
KLK5	1º PCR	KLK5-D	TAGTAGGTAGGGAAGGAGAGGTGTT	58	45	178bp
		KLK5-R	TTTTTTTTATTTGGGAAATAAGg-bio			
NCF1	1º PCR	NCF1-D	GGGAATATGGTTAAGATTAGGAATATG	58	45	177bp
		NCF1-R	TTTTTTTGTTTTGTAGGTGTGTG-bio			
TRPM8	1º PCR	TRPM8-D	TATGTTGGGTATGGGAGTTTTTAGT	59	45	214bp
		TRPM8-R	TTATTTTATGATTTGTTTGGTTTTGG-bio			
PDE3B	1º PCR	PDE3B-D	TTTGAAAGGGATTAAGGTTAGAGATAG	58	45	204bp
		PDE3B-R	GTTTTAGGATGGTTGGTTTGT-bio			
PSCA	1º PCR	PSCA-D	ATTTTTGTAAAGTTTAGGTGAGTAA	52	45	185bp
		PSCA-R	GTATTTGTGTGTTGTTTTTTT-bio			

Para llevar a cabo la amplificación de las regiones de interés, en nuestro trabajo utilizamos dos polimerasas diferentes, la Taq PLATINUM y una polimerasa de QIAGEN para la técnica de pirosecuenciación (**Tablas 13 y 14**). Esto es debido a que según las características de la región genómica a ampliar una polimerasa funcionaba mejor que la otra. En cuanto a las condiciones de la PCR, destacar que en el caso de la Taq PLATINUM la primera desnaturalización se realiza a 95°C durante 10 minutos mientras que en el caso de la Taq de QIAGEN son necesarios 15 minutos para que la polimerasa se active y la desnaturalización del DNA ocurra correctamente y obtengamos una adecuada amplificación de la región genómica de interés. Para la adecuada amplificación de todos los fragmentos en el estudio, independientemente de la Taq polimeras utilizada, fueron necesarios 45 ciclos de PCR.

Tabla 13. Reactivos necesarios con el KIT PLATINUM[®], cantidad y condiciones del termociclador calculadas en la puesta a punto.

KIT PLATINUM [®]	
Reactivos	Cantidad
Buffer 10x	2.5 µl x n
Magnesio	1.5 µl x n
dNTPs (5uM)	1 µl x n
Cebador forward (10uM)	0.5 µl x n
Cebador reverse (10uM)	0.5 µl x n
Taq Platinum	0.1 µl x n

Tabla 14. Reactivos necesarios con el KIT PCR QIAGEN[®], cantidad y condiciones del termociclador calculadas en la puesta a punto.

KIT PCR QIAGEN [®]	
Reactivos	Cantidad
Buffer 2x	12.5 µl x n
H2O	10.5 µl x n
Cebador forward (10uM)	0.5 µl x n
Cebador reverse (10uM)	0.5 µl x n

2.- GEL DE AGAROSA: la amplificación correcta de cada amplicón de interés se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con tampón TAE 1x (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM y acetato sódico 20 mM), tinción con bromuro de etidio 1% (BrEt) y visualización en un transiluminador de luz ultravioleta. En todos los casos,

la longitud de las bandas o amplicones observados en el gel de agarosa contenían unos 90-299 pb, coincidente con el tamaño estimado a priori con el diseño de los cebadores.

6. PIROSECUENCIACIÓN

La técnica de pirosecuenciación es una técnica de secuenciación de ácidos nucleicos basada en la detección de un pirofosfato inorgánico liberado durante la incorporación de nucleótidos a la síntesis de una nueva hebra de DNA. Esta técnica es el gold standard para el estudio de la metilación del DNA en dinucleótidos CpG concretos, por lo que se decidió utilizar este método para la validación de los resultados obtenidos en el array de metilación del DNA. La pirosecuenciación ha demostrado un gran éxito en la cuantificación de la metilación del DNA de diferentes dinucleótidos CpG en varias regiones o genes clave para el desarrollo de tumores humanos y se propuso originalmente como alternativa a los métodos cuantitativos disponibles (104,105). Para facilitar un rendimiento mayor de la determinación de los niveles de metilación del DNA en estos dinucleótidos CpG específicos, en primer lugar se desarrolla una amplificación de la región genómica de interés mediante PCR utilizando para ello dos cebadores específicamente diseñados con la característica de que uno de ellos deberá estar biotinilado en su región 5'. Una de las limitaciones de la pirosecuenciación es la secuenciación correcta en zonas de alta densidad de CpGs (106), pero en nuestro estudio el análisis se trataba en todos los amplicones diseñados de una única CpG lo que hacía esta técnica perfecta para la validación de los resultados obtenidos mediante el array de metilación del DNA. La mayor ventaja que ofrece la pirosecuenciación es que se trata de una técnica cuyo resultado ofrece una cuantificación real de cada uno de los dinucleótidos CpG de interés, comparada a la técnica de MSP (PCR específica de Metilación), técnica que además depende de una precisión mayor para evitar falsos positivos (105). Para nuestro estudio, en el que se asumían diferencias de metilación del DNA en los pacientes que presentaban el gen *TET2* mutados frente a los pacientes sin mutaciones en este gen (WT), así como los pacientes con LMMC transformados o no transformados a una leucemia aguda, el método de pirosecuenciación permite estudiar las secuencias parcialmente metiladas con una alta probabilidad de éxito.

Procedimiento de la pirosecuenciación:

Paso 1: Una vez obtenidos los amplicones mediante PCR tras la modificación del DNA con Bisulfito Sódico, para el análisis de los dinucleótidos CpGs localizados en cada amplicón, es necesario **diseñar cebadores específicos** que nos permitan secuenciar correctamente estos CpGs. Las características más importantes de estos cebadores son que tengan una longitud de entre 18 y 20 nucleótidos y que no contenga en su secuencia ningún dinucleótido CpG con la finalidad de que emparejen con la hebra del amplicón obtenido en la PCR tanto si los dinucleótidos CpG que se localizan en ella estén o no metilados. En la medida de lo posible es muy importante que estos cebadores para la pirosecuenciación se localicen próximos a los dinucleótidos CpG a estudio. Para la pirosecuenciación de nuestros dinucleótidos CpG a estudio se diseñaron los siguientes cebadores para la reacción de pirosecuenciación (**Tabla 14**).

Tabla 14. Cebadores utilizados para la pirosecuenciación de los dinucleótidos CpGs de interés en el estudio.

GEN	CEBADORES INTERMEDIOS DE PIROSECUENCIACIÓN	
LAX1	LAX1-PYR-1	GAGTTATTTTATTTGGAAGTATTAT
SLC22A12	SLC22A12-PYR-2	GTTTGTGTTTGT
	SLC22A12-PYR-3	GATTAAGGAAATGATTGTTAAATT
VHL	VHL-D	AGTGTTGGGTTTATGGGTATGAGT
FAAH	FAAH-PYR-1	GGTGTTAAATTTAAGTTTGGGAGG
FUT3	FUT3-PYR-1	AAGTTTTTGTTTAAGGGGATTATGATGGAGA
INS	INS-PYR-1	GGTGTATTTTTTTAAAAAGAAGTTTTTTTGG
KLK5	KLK5-PYR-1	TTTTTTGAATTTTATAGTGTGGTTTTT
NCF1	NCF1-PYR-1	TTAAGGGGGGAAAGATGGTTAAGGGG
TRPM8	TRPM8-PYR-1	GAGATTTTTTTGATTTTTTTTTTTATTTTTAGTTGGA
PDE3B	PDE3B-PYR-1	AGTAGTGATTTGTGGGATTTTGGTTGGGTG
PSCA	PSCA-PYR-1	TTGTATTAGTTGGGGGAGTAGTGTGGGA

Paso 2: Una vez diseñados los cebadores para la pirosecuenciación se procede a la **preparación de los amplicones** para la propia pirosecuenciación. En las tablas siguientes (**Tabla 15**) se muestran los reactivos necesarios para la preparación de las muestras a pirosecuenciar.

Tabla 15. Reactivos y cantidad necesaria de estos para llevar a cabo la técnica de pirosecuenciación según el kit Pyromark ID de QIAGEN®

Annealing MIX	
Cebador de pirosecuenciación (10uM)	2 µl por muestra
Annealing buffer	38 µl por muestra

Binding MIX	
H2O	10 µl por muestra
Binding buffer	27 µl por muestra
Streptavidina	3 µl por muestra
Producto de PCR	20-22 µl de cada muestra

En primer lugar, se prepara en una placa de 96 pocillos la mezcla con el annealing buffer y el cebador que se utilizará para la pirosecuenciación de cada amplicón de interés. Esta placa se reserva hasta utilizarla después en el pirosecuenciador. En una segunda placa, que será una placa óptica, se mezclan el producto de amplificación obtenido en la PCR, que será el objetivo de secuenciación, con un buffer de unión y la estreptavidina, que se unirán a la biotina del amplicón. Esta placa se incuba a 37°C durante 5-10 minutos y en agitación (750 rpm) en un termobloque ya que si no la streptavidina precipita en reposo. Durante estos 5-10 minutos es preciso preparar las cubetas de la mesa de trabajo del pirosecuenciador:

- Primera cubeta: con etanol al 70%
- Segunda cubeta: con solución de desnaturalización (NaOH 0.2M)
- Tercera cubeta: con solución de lavado a 10X (Washing buffer)
- Cuarta cubeta: con agua milliQ™ (esta cubeta se utiliza para lavar las columnas de la máquina de vacío).

Paso 3: **proceso de unión del cebador para la pirosecuenciación al amplicón.** Tras preparar todo el material indicado anteriormente, las muestras que hemos mezclado en una placa junto con la streptavidina y las hemos incubado en agitación, se aspiran con la máquina de vacío, quedando capturadas en las columnas de la máquina de vacío (gracias a la sefarosa de estas columnas). Posteriormente, las muestras (mantenidas en las columnas) se someten a distintos lavados con etanol 70% (Primera cubeta), con NaOH para desnaturalizar las hebras de DNA (Segunda cubeta) y de esta manera quedarnos únicamente con una de las hebras del DNA amplificado y posteriormente otro segundo lavado especial con el buffer de lavado que eliminará todo el DNA y reactivos no

necesarios para la pirosecuenciación (tercera cubeta). El contacto de las muestras aspiradas por las columnas con cada uno de estas soluciones de debe realizarse con delicadeza y en constante agitación durante 5-10 segundos en cada una de las cubetas. Tras completar estos tres lavados, se detiene la aspiración de la máquina de vacío y por último, la máquina de vacío que contiene nuestro DNA en cada una de sus columnas, se introduce en la primera placa que hemos preparado anteriormente con el annealing buffer y el cebador que utilizaremos para la pirosecuenciación del fragmento de DNA de interés. En este paso, el cebador de pirosecuenciación se une a la hebra monocatenaria de DNA de nuestro amplicón. Para conseguir la correcta unión del cebador a nuestro fragmento de DNA monocatenario y posteriormente una adecuada secuenciación, esta placa se incubará durante 4 minutos a 80°C en un termociclador o termobloque. Una vez terminado este proceso, las columnas de la máquina de vacío se lavan en agua (Cuarta cubeta).

Paso 4: **Reacción de pirosecuenciación**. Para este último paso, en primer lugar se prepara el software para la lectura en el programa Pyro Q-CpG. Esto consiste en introducir en el programa la secuencia del fragmento que se quiere pirosecuenciar, indicando correctamente la localización de los dinucleótidos CpG en la secuencia a analizar. Según las características de la secuencia de interés, el software generará un orden de dispensación de los reactivos necesarios para la correcta pirosecuenciación del fragmento de interés. Una vez se tiene el orden de dispensación, se preparan los nucleótidos (Pyromark Gold Q96 Reagents de QIAGEN) para incluirlos en el cartucho de pirosecuenciación (Pyromark Q96 Cartridge. QIAGEN). El volumen de los reactivos necesarios para la correcta pirosecuenciación depende de las características de la secuencia del amplicón, el número de muestras y el tipo de cartucho utilizado. En esta reacción, además de los dinucleótidos se incluirán en él una mezcla enzimática (E) y una mezcla de sustrato (S), ambas necesarias para el inicio de la reacción.

En el proceso de pirosecuenciación, el pirofosfato liberado en la reacción de síntesis del DNA es cuantificado mediante la reacción de la luciferasa. La actividad luciferasa produce una señal proporcional al número de pirofosfatos liberados (proporcional a los nucleótidos incorporados en el DNA). Debido a que el pirosecuenciador conoce la secuencia del amplicón, utilizando el software de cuantificación alélica, la secuencia es representada en un Pirograma®, pudiendo conocer de esta manera el nivel de citosinas o

timinas en el dinucleótido CpG de interés, y así los niveles de metilación del DNA en este CpG (**Figura 6**).

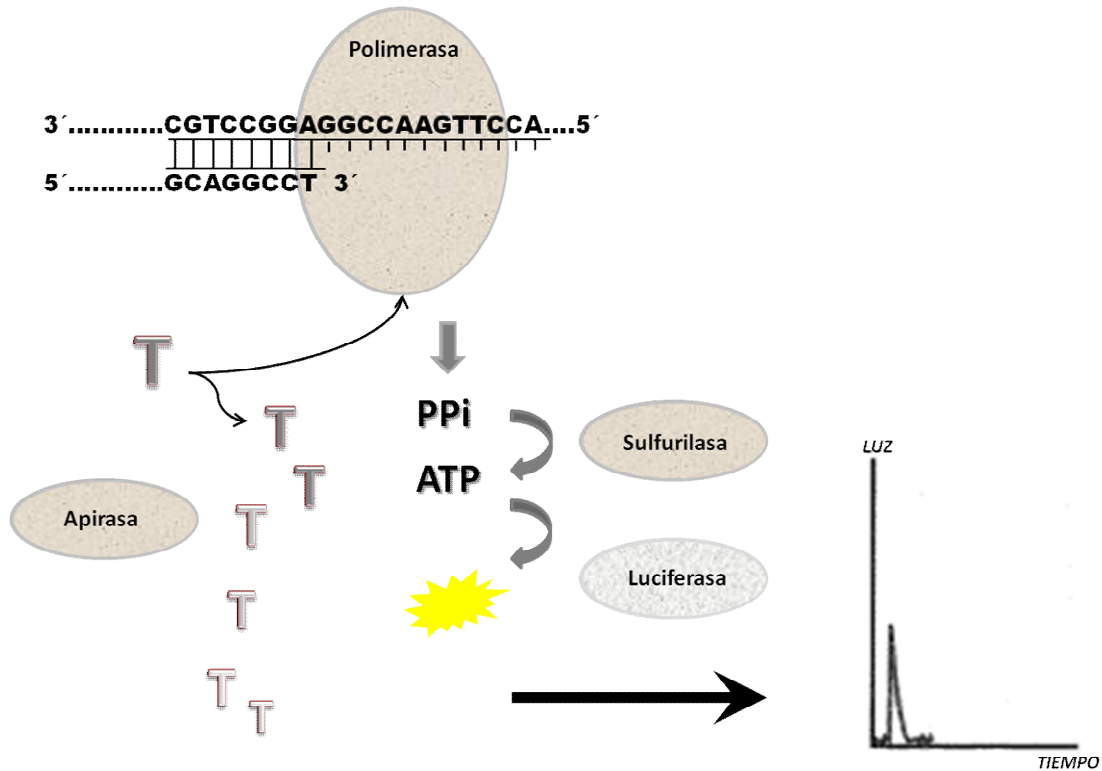


Figura 6. Ilustración esquemática de la cascada de la pirosecuenciación. Mientras los nucleótidos son incorporados en la cadena de ADN analizada, el pirofosfato es convertido en ATP. El ATP generado dirige la reacción luminosa detectada como un pico en el pirograma. La apirasa degrada cualquier nucleótido no incorporado a la cadena. Figura extraída y modificada del manual de pirosecuenciación “Pyromark ID de QUIAGEN®”

Tras obtener el pirograma este es estudiado para comprobar que la secuencia obtenida es la correcta, que no ha habido error en la lectura y se evalúa la calidad de la imagen para validar el estudio y concluir el porcentaje de metilación del DNA en cada uno de los dinucleótidos CpG del producto de PCR estudiado.

7. ESTUDIOS DE ARRAYS DE METILACIÓN DEL DNA. IDENTIFICACIÓN DE CpGs DIFERENCIALMENTE METILADAS

El array de metilación del DNA utilizado para el estudio de las 24 muestras de LMMC junto con las muestras de donantes sanos fue el 27k de Illumina. Este array nos permite analizar simultáneamente el nivel de metilación del DNA de más de 27000 dinucleótidos CpG. Gracias a al tratamiento con Bisulfito sódico la secuencia de DNA

está modificada, consiguiendo que las citosinas metiladas se mantengan como tal y las citosinas no metiladas se transformen en uracilos. Este array ofrece una sonda para amplificar la secuencia para las CpGs metiladas (M) y otra para las no metiladas (U) y cada uno de los puntos representados en el array es un valor de la metilación del DNA, que está representado por señales fluorescentes de los alelos que van desde la metilación completa (valor 1) hasta la total no metilación (valor 0). La ratio de la señal fluorescente de ambos alelos es la b-value, que será por tanto un valor entre 0 y 1.

La beta-value se define por la fórmula:

$$\text{B-value} = \frac{\text{Intensidad [M]}}{\text{Intensidad [U]} + \text{Intensidad [M]}}$$

Por tanto, la β -value se trata de una ratio entre la diferencia de intensidad de fluorescencia de cada una de las sondas en cada locus (107).

El análisis bioinformático de los datos del array se realizó empleando el entorno de análisis estadístico R/Bioconductor (108). Para el análisis de metilación del DNA diferencial que se realizó a partir de las beta-values obtenidas en el array de metilación se utilizó el paquete LIMMA (Linear Models for Microarray Data) (110), con el fin de identificar aquellas sondas que mostraban un patrón de metilación del DNA significativamente alterados. Para los análisis siguientes se consideraron únicamente aquellas sondas que tuvieran un p-value < 0.05 y un logFC > 0.25.

Análisis de la metilación del DNA diferencial entre donantes sanos y muestras de LMMC: arrays de metilación y técnicas bioinformáticas

Para nuestro análisis, en primer lugar, el genoma completo el DNA fue tratado con la técnica de modificación de bisulfito y el array de metilación utilizado fue el descrito anteriormente, el 27k de Illumina. Tras la hibridación y la extensión de cada base con nucleótidos conocidos, la intensidad de la sonda para el CpG no metilado y la sonda para el metilado fue medida con un lector de microarrays. El estado de metilación de cada CpG fue determinado mediante el cálculo de la beta-value. De manera adicional, evaluamos la detección de probabilidades (comparando las intensidades de señal frente al ruido de fondo) de todas las CpGs y se excluyeron aquellas que presentaron valores de la $p < 0.05$ en más del 10% de los casos en el estudio. De un total de 26486 CpGs situados en cromosomas autosómicos, 89 CpGs mostraron una pobre detección de la p-value en más del 10% de los casos por lo que fueron eliminados del estudio.

Finalmente, el nivel de metilación del DNA en 26397 CpGs autosómicas fue estudiado en las muestras de pacientes con LMMC y donantes sanos.

A través de un análisis del cluster no supervisado, los resultados obtenidos mediante este array de metilación 27K de Illumina nos proporcionó una visión global del perfil de metilación del DNA tanto de las LMMC como de los donantes sanos. Este cluster incluía sólo las CpGs con una desviación estándar >0.25 . Para determinar que CpGs estaban diferencialmente metiladas entre los pacientes y los donantes sanos, se realizó un análisis mediante tres distintas aproximaciones bioinformáticas:

- **T test:** Los dinucleótidos CpG significativamente y diferencialmente metilados fueron identificados usando al menos una diferencia de 0.34 entre las principales beta values obtenidas mediante el array de metilación en cada grupo de análisis ($\Delta\beta = \beta$ value principal del grupo A - β value principal del grupo B; <0.34 (dMCPG) o <-0.34 (dNMCPG)) y con una tasa de FDR (del inglés false discovery rate) por debajo de 0.05, calculado mediante T test permutado o análisis de varianzas comparados en más de dos grupos.
- **Análisis de Volcano:** Una segunda aproximación mediante análisis bioinformático fue llevado a cabo con el sistema R y Bioconductor (109), un medio de cómputo estadístico. Previo a los análisis estadísticos, se realizó un proceso de filtrado basado en el valor de índice de metilación (IM) para focalizar el análisis en los genes con mayores diferencias en su estado de metilación del DNA (Fold change, $FC < 1.2$). Brevemente, el valor IM se categoriza en tres estados: no metilado ($IM < 0.3$), parcialmente metilado ($IM > 0.3$ y < 0.7) y metilado ($IM > 0.7$). Nosotros asignamos un valor 0, 1, o 2 a cada IM de acuerdo a su estado de metilación del DNA y estos valores fueron usados para el cálculo de FC. Para descubrir las muestras que presentaban patrones significativamente diferencialmente metilados fueron usados los métodos LIMMA (del inglés Linear Models of Microarray Data) (110). Los genes fueron identificados con una metilación del DNA significativamente diferencial usando el estadístico β como corte ($\beta > 0$). Además, en este estudio, los cambios de metilación significativos de cada muestra fueron realizados mediante la transformación del score Z en las distribuciones Fold-change (111). Un umbral de $|z| > 1.64$ (p -value < 0.05) fue fijado para seleccionar los genes diferencialmente metilados.
- **Análisis de umbral de metilación del DNA:** Este tercer análisis define las diferencias de metilación del DNA según los siguientes criterios: los

dinucleótidos CpG estudiados mediante el array de metilación se consideraron hipermetilados en las muestras de los pacientes con LMMC respecto a las muestras control, cuando estos dinucleótidos CpG presentaban un valor de β en el array de metilación menor de 0.25 ($\beta < 0.25$) en las muestras control y al menos el 20% de las muestras de LMMC presentaban un valor de β en el array de metilación mayor de 0.5 ($\beta > 0.5$). Los dinucleótidos CpG fueron considerados hipometilados en las muestras de los pacientes con LMMC respecto a las muestras control, cuando estos dinucleótidos CpG presentaban un valor de β en el array de metilación mayor de 0.75 ($\beta < 0.75$) en las muestras control y al menos el 20% de las muestras de LMMC presentaban un valor de β en el array de metilación menor de 0.5 ($\beta < 0.5$).

Los archivos con los resultados obtenidos fueron depositados en la base de datos MIAME compatible con GEO (del inglés gene expresión omnibus) y están disponibles bajo el número de acceso GSE31600.

Análisis bioinformático de las vías patogénicas implicadas

Además de los datos de las diferencias de metilación del DNA, quisimos ver qué vías patogénicas estaban implicadas en la LMMC según los genes diferencialmente metilados en estos. Los análisis funcionales del Gene Ontology (GO) fueron realizados usando los genes diferencialmente metilados entre las muestras de pacientes con LMMC y los controles sanos usando los test estándar hipergeométricos. Todas las anotaciones fueron extraídas de la base de datos Ensembl (www.ensembl.org). El software Ingenuity Pathway Analysis también fue utilizado para identificar redes génicas desreguladas que contengan genes diferencialmente metilados entre las muestras de pacientes con LMMC y los controles sanos (Ingenuity System INC, www.ingenuity.com).

8. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE 5hmC EN LAS MUESTRAS DE LMMC

Este análisis fue llevado a cabo con dos muestras de sangre periférica de donantes sanos, y trece de pacientes con LMMC, de las cuales 8 eran muestras de pacientes con LMMC con el gen *TET2* mutado (LMMC *TET2*-mut) y 5 eran muestras de pacientes con LMMC con el gen *TET2* no mutado (LMMC *TET2*-wt).

Para determinar el contenido en 5hmC, estudiamos específicamente las regiones promotoras de 3 de los 13 genes que presentaban una hipermetilación del DNA en los pacientes con LMMC *TET2*-mut (*LAX1*, *SLD22A12* y *VHL*) (**Tabla 18**, anexo 2). Estos genes fueron escogidos en base al hecho de que solo los dinucleótidos CpGs asociados a los motivos CCGG pueden ser estudiados mediante las enzimas susceptibles a la metilación del DNA, *MspI*-*HpaII*, debido a que este motivo es su diana.

- Para el gen *LAX1*, analizamos dos CpGs localizados en sentido 5' (-38 y -244 bp respectivamente) de la CpG analizada en el array de metilación del DNA (cg10117369; Anexo 2).
- Para el *SLC22A12* analizamos un CpG en sentido 5' (59bp) y otro en el sentido 3' (58bp) del CpG analizado en el array de metilación del DNA (cg07220939; anexo 2).
- Para el gen *VHL*, analizamos un CpG downstream (5bp) del CpG del array de metilación del DNA (cg16869108; anexo 2).

El análisis y cuantificación del contenido en 5hmC y 5mC en regiones específicas fue llevado a cabo con el kit “EpiMarck 5-hmC and 5-mC analysis” (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido de una qPCR. El kit distingue los niveles de 5mC de los niveles de 5hmC por la adición de glucosa al grupo hidroxil del 5hmC utilizando para ello la T4 B-glucosiltransferasa.

Para ello, 1µg de DNA genómico se trató con 30 unidades de T4 B-glucosiltransferasa. El DNA glucosilado fue digerido con 100 unidades de la enzima *MspI* o 50 unidades de la enzima *HpaII* o sin enzima (“mock digestion”) a 37°C durante toda la noche. La fracción resistente de *MspI* y *HpaII* (en el contexto de CCGG) fue cuantificada por la qPCR usando los cebadores específicos que cubrían al menos un sitio *MspI*/*HpaII*. La resistencia a la digestión con la enzima *MspI* es bloqueada por el 5hmC glucosilado, traduciendo directamente en los niveles de 5hmC metilados, mientras que los niveles de 5mC se obtuvieron restando el porcentaje de 5hmC de la resistencia a la digestión con la

enzima HpaII, que es bloqueada por 5mC, 5hmC y 5hmC glucosilado. Los cebadores y condiciones de la reacción se muestran en la **tabla 16**.

Tabla 16: Cebadores, secuencias y condiciones usadas para la cuantificación de los niveles de 5hmC mediante qPCR. Las localizaciones de los CCGG están referidas a su posición con respecto al dinucleótido CpG analizado en el array de metilación del DNA. Todos los cebadores y sondas van de 5' a 3' las sondas etiquetadas con FAM en 5' y TAMRA en 3'. En todas las PCRs la Ta fue de 60°C.

GEN	CCGG LOCALIZACION	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO	SONDA	AMPLICON
LAX1	38bp downstream	AGATTCTCCCTGAGCCACCT	CTAATGCCCACTGCAGGAAG	CACCATGTCCGGATGAGATC	73bp
	244bp downstream	TAGCACATTGGTGGTGTCTGT	GCAAACCACTTTGCCAGAAT	TTCCGGTGACTGACTCTCTG	65bp
SLC22A12	59bp downstream	CGCCAGGAGAAAACTTAGG	GAGGTGCAGCCTCCTCTG	AAGACCTGGCACAGAGCAG	83bp
	58bp upstream	TTGACCAAGGAAATGATTGCT	AGGGAATGTGGAGACTGAAGA	TCCATAAGTGTACCGGTCA	98bp
VHL	5bp upstream	CCCAAAGTGCTGGGCTTAT	AGCCACCTCAAATGCAAAC	CGGCCAGAGCATTCTTTAT	89bp

9. IDENTIFICACIÓN DE UNA HUELLA DE METILACIÓN ASOCIADA A LA TRANSFORMACIÓN DE UNA LMMC EN FASE CRÓNICA A UNA LEUCEMIA AGUDA

El mismo array de metilación del DNA descrito anteriormente, el 27K de Illumina, se utilizó para comparar las muestras al diagnóstico de pacientes con LMMC que continuaban en fase crónica, o no transformados, con las muestras de LMMC transformadas a LMA. A partir de los CpGs diferencialmente metilados identificados en esta comparación, se aplicó un flujo de análisis para obtener una huella basada en la medida de niveles de metilación del DNA para distinguir entre los grupos de pacientes con LMMC que transformaron y no transformaron a una leucemia aguda.

Los CpGs diferencialmente metilados entre los pacientes con LMMC que continuaban en un estadio crónico (LMMC-NT) o que transformaron a una leucemia aguda (LMMC-T) durante su enfermedad, se analizaron mediante la técnica de pirosecuenciación tal y como se ha indicado anteriormente. Tras realizar la pirosecuenciación se obtuvieron datos brutos de la proporción de metilación del DNA en cada uno de los CpGs estudiados en cada paciente. Fueron estos valores de metilación del DNA (expresados

en porcentaje de metilación) los datos destinados al estudio estadístico. En un primer análisis se realizó el t-test, tal y como se ha descrito anteriormente, ya que nos permitía discriminar aquellas CpGs con diferencias de metilación del DNA estadísticamente significativas, $p < 0.05$.

Para conseguir uno de los objetivos del trabajo se precisaba confirmar que una vez demostrada la diferencia de metilación del DNA entre los pacientes con LMMC-T y los pacientes con LMMC-NT, estos CpGs podían ser utilizados como clasificadores o biomarcadores para la predicción de la transformación de los pacientes con LMMC a una leucemia aguda, en el mismo momento de su diagnóstico. Para ello se realizó un estudio mediante las Curvas ROC.

Pruebas diagnósticas continuas: Curvas ROC

La curva ROC es una forma útil de presentar las características de un test diagnóstico continuo. Es una gráfica que presenta en el eje x la proporción de falsos positivos (1-especificidad) y en el eje y la proporción de verdaderos positivos (sensibilidad). A medida que se cambia el punto de corte, se obtienen diferentes pares de valores de sensibilidad y 1-especificidad que se representan como puntos en la gráfica. La unión de estos puntos es la curva de ROC (**Figura 7**).

Cuanto más se aleja la curva ROC de la diagonal, mejor es el procedimiento diagnóstico. Una manera de cuantificar ese alejamiento es mediante el área bajo la curva (del inglés area under curve AUC). Como ambos ejes van de 0 a 1, el área comprendida entre 0.5 (nula eficacia) y 1 (máxima eficacia).

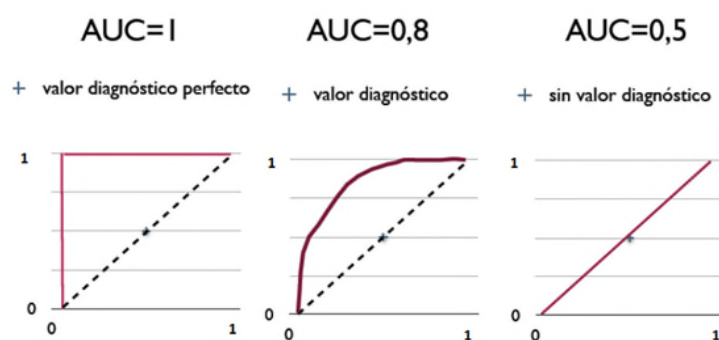


Figura 7. Esquema teórico de las curvas ROC y su significación diagnóstica.

El punto de corte óptimo, desde el punto de vista estadístico, viene dado por la combinación de máxima sensibilidad y especificidad, y tiene como coordenadas al punto en el que la curva se aleja más de la diagonal (Youden max).

*youden: es una medida del grado de concordancia entre la prueba y el patrón de referencia. Combina la sensibilidad y la especificidad asumiendo que ambas son de igual importancia.

Estas curvas se realizaron con cada uno de las 8 CpGs en el estudio por separado con un criterio de selección basado en una $AUC > 0.8$ y posteriormente con los CpGs en conjunto.

Con el tamaño de muestra del que partíamos y con los resultados obtenidos se hacía difícil extrapolar el resultado a la población general por lo que se optó por realizar un test que permitiera ampliar de manera ficticia el número de muestras para validarlo. Este método de validación interno es el denominado bootstrapping.

*Estudio de validación interna: **Bootstrapping***

El bootstrap es un tipo de técnica de re-muestreo de datos que permite resolver los problemas relacionados con la estimación de intervalos de confianza o la prueba de significación estadística. Por lo que es aplicable en nuestro trabajo debido a la limitación de encontrar muestras. Pertenece al grupo de técnicas llamadas de “remuestreo” como son el Jackknife, los test de aleatorización y permutación o la validación cruzada. El fundamento básico de esta técnica es simple, se trata de crear un número más amplio de muestras con reposición de los datos observados para posteriormente realizar las descripciones e inferencias estadísticas.

En nuestro trabajo el bootstrapping se realizó mediante el test K-FOLD siendo útil para evaluar la replicabilidad de los resultados del estudio. El análisis multivariante realizado se validó con el paquete WEKA (del inglés, Waikato Environment for Knowledge Analysis) (111,112), software preparado para la evaluación de curvas ROC permitiendo verificar clasificadores como es nuestro caso. La verificación viene definida por:

- Accuracy o exactitud: muestras correctamente clasificadas por el clasificador
- Tasa de error: errores que se detectan que ha cometido el clasificador
- Matriz de confusión de la que se extraen datos como la sensibilidad y especificidad de un test diagnóstico/clasificador.

4. RESULTADOS

1. ANÁLISIS MUTACIONAL EN PACIENTES CON LMMC

Para este estudio se disponía de una primera serie de muestras de 24 pacientes diagnosticados de LMMC según los criterios de la revisión de la Organización mundial de la salud (OMS) de 2008, en el momento de su diagnóstico. De 17 de ellos además contábamos con la información citogenética y molecular y un seguimiento clínico completo mayor de 5 años (aunque sólo 15 de ellas con muestra de DNA para continuar con el estudio de laboratorio). En este sentido, disponíamos de datos clínicos suficientes que nos permitían determinar cuál de los pacientes había transformado a una LMA o si en cambio permanecía en un estado crónico de la enfermedad. 12 pacientes no transformaron (12/17) y 5 pacientes (5/17) transformaron a una leucemia aguda durante los 5 años de seguimiento. Esta es una proporción similar a la observada en la población general de pacientes con LMMC, que se estima está en torno al 33% (5, 100). Además, disponíamos de otros datos clínicos y analíticos, como es el cariotipo (con su valor pronóstico de bajo, intermedio y alto riesgo según la clasificación GESMD (18). Pero debido a que en los últimos años se han detectado mutaciones en genes que participan en la regulación de los mecanismos epigenéticos en las neoplasias mieloproliferativas, en este estudio decidimos completar los datos clínicos disponibles con el análisis de las posibles mutaciones en los genes *JAK2*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1* y *EZH2*, (**Tabla 17**). Este análisis mutacional se realizó con la finalidad de estudiar si dichas alteraciones genéticas podrían participar en la alteración de los patrones de la metilación del DNA en los pacientes con LMMC. En este análisis observamos que los genes *IDH1* e *IDH2* no se encontraban alterados debido a mutaciones en su secuencia; *EZH2* únicamente estaba mutado en dos de los pacientes; *ASXL1* en 11 de los pacientes y por último *TET2* en 15 de los pacientes con LMMC. Estos resultados revelaron que los genes *TET2* y *ASXL1* son los genes que se encuentra mutados en un porcentaje mayor de los pacientes con LMMC, sugiriendo que las alteraciones de estos genes podrían alterar los patrones epigenéticos en estos pacientes. En nuestro estudio, decidimos continuar más específicamente con el posible papel que podrían jugar las mutaciones en el gen *TET2* ya que de los dos genes este es el gen que más se ha relacionado y se ha demostrado que puede participar en la regulación de la metilación del DNA.

Tabla 17. Resumen de los datos genéticos de los pacientes con LMMC. En amarillo se resaltan las muestras no transformadas a leucemia aguda; en verde las transformadas a una leucemia aguda y en rosa las muestras de las que no teníamos seguimiento clínico. UD: No determinado. R BAJO: cariotipo de bajo riesgo; R.INTERMEDIO: cariotipo intermedio y R.ALTO: cariotipo de alto riesgo.

Paciente	EZH2	JAK2	TET2	IDH1	IDH2	ASXL1	Cariotipo
LMMC1	NO MUTADO	NO MUTADO	UD	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC3	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	UD
LMMC4	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC5	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC6	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	R.BAJO
LMMC9	NO MUTADO	MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC14	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	UD	UD	MUTADO	R.ALTO
LMMC15	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	R.BAJO
LMMC19	NO MUTADO	MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	UD	R.BAJO
LMMC21	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC22	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC24	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	UD	UD	NO MUTADO	R. BAJO
LMMC8	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC17	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	R.BAJO
LMMC18	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	R.BAJO
LMMC20	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	R.INTERMEDIO
LMMC23	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	R.ALTO
LMMC2	MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	UD	UD	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC7	MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	UD	UD	MUTADO	R.BAJO
LMMC10	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	UD	UD	NO MUTADO	R.BAJO
LMMC11	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	UD	UD	UD	R.BAJO
LMMC12	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	UD	UD	MUTADO	R.INTERMEDIO
LMMC13	NO MUTADO	NO MUTADO	MUTADO	UD	UD	MUTADO	R.BAJO
LMMC16	NO MUTADO	NO MUTADO	NO MUTADO	UD	UD	MUTADO	R.ALTO

2. ESTUDIO GLOBAL DE LOS PATRONES DE METILACIÓN DEL DNA EN PACIENTES CON LMMC. RELACIÓN DE ESTOS PATRONES CON LAS MUTACIONES EN GENES QUE REGULAN LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS

En la literatura se habla de la posibilidad de encontrar patrones de metilación del DNA o metilomas únicos para cada tipo de tumor e incluso para subgrupos de pacientes de un mismo tipo tumoral o enfermedad, correlacionando los diferentes patrones de metilación del DNA con el pronóstico y la evolución de distintas enfermedades (113). Por tanto, uno de los objetivos de este trabajo consistió en conocer el patrón de metilación del DNA de los pacientes con LMMC respecto a su contrapartida normal y estudiar si este patrón de la metilación del DNA tenía alguna relación con las mutaciones en los genes que se han descrito recientemente alterados en algunos pacientes con esta enfermedad como son los genes *JAK2*, *EZH2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* y/o *TET2*. En este estudio, las mutaciones en *TET2* nos interesaban de manera especial por ser uno de los genes mutados más recurrentes en la LMMC según la literatura y por los resultados obtenidos tal y como pudimos determinar en nuestra serie de pacientes con LMMC.

2.1 PATRONES DE METILACIÓN DEL DNA

Para el estudio del patrón de metilación del DNA en la LMMC, se analizaron las muestras de los 24 pacientes con LMMC y 8 muestras control (4 provenientes de Medula Ósea (MO) y 4 de sangre periférica (SP) de donantes sanos) mediante los arrays de Illumina Human Methylation27 beadchip tal y como se ha descrito en el apartado de material y métodos (página 60).

En un primer análisis no supervisado de los datos de la metilación del DNA, incluyendo todos los CpGs del array excepto los localizados en el cromosoma X, observamos que la gran mayoría de las muestras de los pacientes con LMMC se agrupaban todas juntas y separadas de las muestras obtenidas de los donantes sanos (**Figura 8**). Al comparar el perfil de metilación del DNA entre las muestras de los pacientes con LMMC y las muestras de los donantes sanos usando para ello la combinación de las tres estrategias bioinformáticas descritas en el apartado de material y métodos (T test, análisis de Volcano y el análisis del umbral de metilación), se detectaron 260 dinucleótidos CpG

estadísticamente diferencialmente metilados. Estos dinucleótidos CpG diferencialmente metilados, están localizados en 249 genes únicos (**Tabla 18**, anexo 2). De ellos, 198 dinucleótidos CpGs (76%) presentaban una hipermetilación significativa del DNA en las muestras de los pacientes con LMMC respecto a las muestras de los controles sanos. Entre estos, 156 (79%) de los dinucleótidos CpGs hipermetilados en la muestra de los pacientes con LMMC se localizaban en islas CpG bien definidas, indicando que en la LMMC la hipermetilación de los dinucleótidos CpG ocurre significativamente dentro de las islas CpG. Entre estos dinucleótidos CpG se encuentran algunos que están localizados en las regiones promotoras de genes supresores de tumores importantes como *AIM2*, *CDKN2A*, *POU4F2* o *WT1*. Estos resultados indican que la metilación aberrante del DNA puede participar en el silenciamiento de genes supresores de tumores en la LMMC. En contra de la hipermetilación de los dinucleótidos CpG, 62 CpGs (24%) de los diferencialmente metilados en las muestras de los pacientes con LMMC respecto a las muestras obtenidas desde los donantes sanos, mostraron una hipometilación significativa del DNA en las muestras de LMMC. Al contrario de los CpGs hipermetilados en la LMMC, 38 de los CpGs hipometilados (61%) mostraron una localización fuera de islas CpG, indicando que la pérdida de metilación del DNA en la LMMC ocurre en regiones sin un acúmulo significativo de dinucleótidos CpG. Algunos de estos dinucleótidos CpG hipometilados en la LMMC se localizan en las regiones promotoras de oncogenes importantes como *DDR2*, *DTL* o *FGF1*. Estos resultados indican que la hipometilación del DNA podría conducir a la activación de oncogenes importantes en la LMMC. Como conclusión, la alteración en el patrón de la metilación del DNA podría dar lugar a la inactivación de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes en la LMMC, pudiendo ser el mecanismo de la transformación tumoral de esta neoplasia.

La metilación diferencial del DNA en los 260 CpGs fue validado mediante la utilización de un estudio publicado en el que se analizaba la metilación del DNA de 18 muestras de pacientes con LMMC y 9 controles sanos utilizando para ello el mismo array de metilación que el utilizado en nuestro estudio (85). Como muestra la figura 9, la mayoría de las muestras de LMMC de los dos estudios se agrupan entre ellas en dos grupos bien definidos pero separadas de las muestras de donantes sanos, (**Figura 9**). Uno de los grupos de pacientes de LMMC de este análisis, presentaba un perfil de metilación del DNA más parecido a los donantes sanos mientras que el segundo cluster mostraba un perfil de metilación del DNA mucho más alterado que los controles sanos.

Estos resultados validan por una parte el patrón de metilación diferencial del DNA en la LMMC detectado en nuestro estudio y además sugiere que los dos grupos de pacientes con LMMC observados con diferencias en el patrón de metilación del DNA podría deberse a posibles diferencias tanto en el cariotipo como en las mutaciones en genes que regulan el mecanismo epigenético de la metilación del DNA.

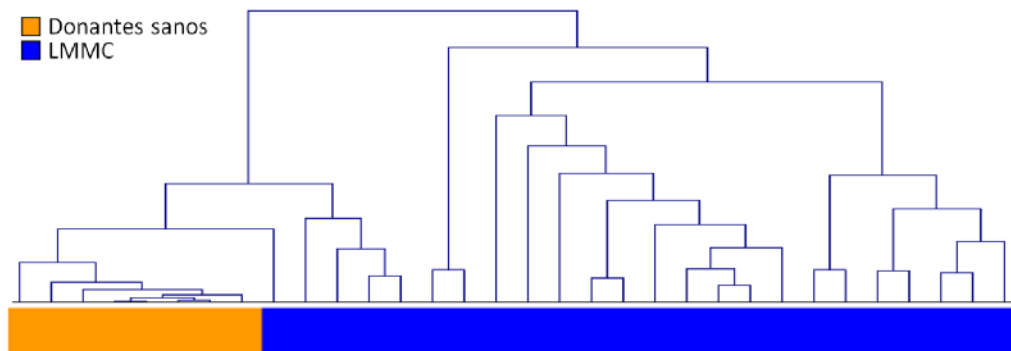


Figura 8: Cluster jerárquico no supervisado basado en todos los datos del array de metilación del DNA en las muestras de LMMC comparadas con las de donantes sanos. Representación tras el estudio mediante el array de metilación del DNA (Illumina Human Methylation27 beadchip) de las muestras de donantes sanos frente a las muestras de pacientes con LMMC. Amarillo: donantes sanos; Azul: muestras de pacientes con LMMC.

Al igual que los genes codificantes, la expresión de los RNA no codificantes localizados en regiones intrónicas del genoma, como pueden ser los miRNAs o snoRNAs pueden ser regulados por los mismos mecanismos que regulan a su gen huésped. Debido a esto, con la finalidad de conocer mejor que estos RNAs no codificantes también podrían estar regulados por la metilación del DNA en la LMMC, realizamos una anotación de los RNAs no codificantes pequeños que podrían estar relacionados con los CpGs estudiados en el array de metilación. Entre los 26397 CpGs analizados en el array de metilación del DNA, encontramos 454 sondas del array relacionados por su localización genómica con 203 miRNAs (incluyendo mirtrons) y 177 sondas del array relacionados con 94 snoRNAs. La mayoría de estos CpGs estaban localizadas en regiones sin ninguna metilación del DNA tanto en las muestras de los pacientes con LMMC como en las muestras de los donantes sanos. Pero en contra, detectamos que los miRNAs *hsa-mir-204* y *hsa-mir-153-1*, se encontraban localizados en regiones del genoma que presentaban una hipermetilación significativa y un mirtron, el *hsa-mir-1231*, en una región significativamente hipometilado en las muestras de pacientes con LMMC en

comparación con las muestras de donantes sanos (**Tabla 18**, incluida en el anexo 2). Estos resultados indican que al igual que los genes codificantes, la metilación del DNA puede participar en la regulación de la expresión de los RNAs no codificantes y la desregulación de estos RNAs no codificantes en consecuencia en la leucemogénesis de los pacientes con LMMC.

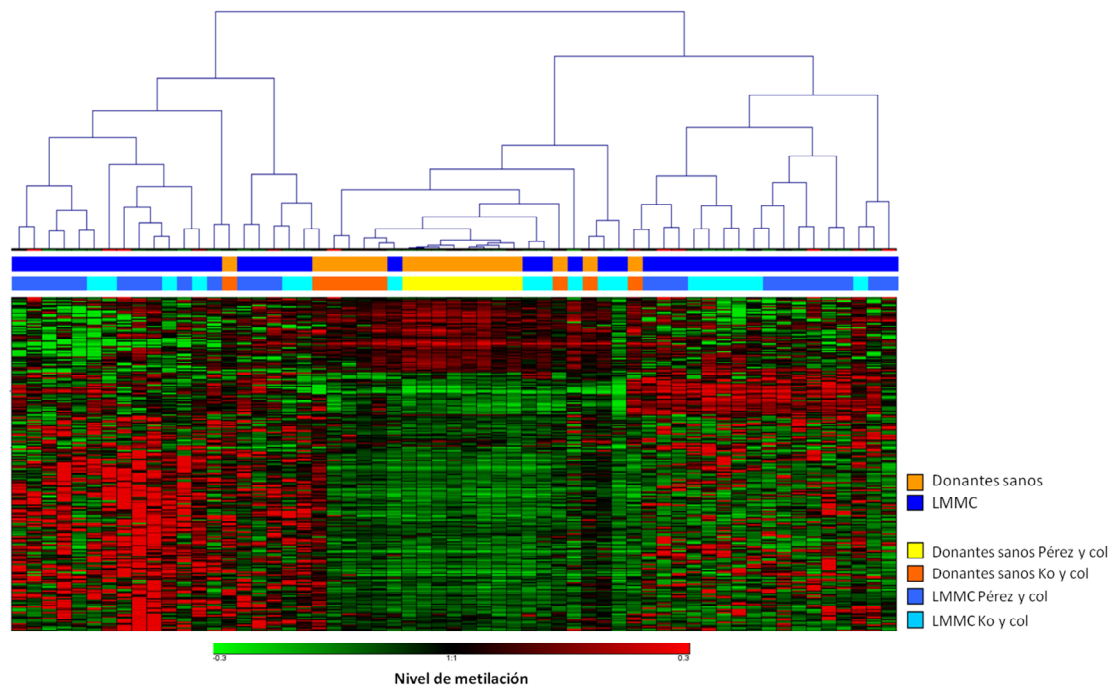


Figura 9: Cluster jerárquico no supervisado de los pacientes con LMMC y controles sanos de dos estudios utilizando para ello los 260 CpGs diferencialmente metilados en nuestra serie. En la barra superior: en amarillo, donantes sanos y en azul muestras de pacientes con LMMC de nuestra serie y de la serie de Ko y col. En la barra inmediatamente inferior: en amarillo donantes sanos de nuestra serie y en naranja las muestras de donantes sanos de la serie de Ko y col; en azul oscuro las muestras de pacientes con LMMC de nuestra serie y en azul celeste las de LMMC de la serie de Ko y col. Los valores de Beta están representados por una escala de pseudocolor (Rojo= genes hipermetilados, verde= genes hipometilados).

En resumen, los resultados obtenidos en este apartado indican que los pacientes con LMMC presentan una patrón de la metilación del DNA específico y que por tanto la alteración de este mecanismo epigenético podría jugar un papel importante en el desarrollo y transformación de esta neoplasia hematológica.

2.2 VÍAS BIOLÓGICAS EN LAS QUE SE IMPLICAN LOS GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS EN LA LMMC

En la LMMC no disponemos hasta la fecha de una vía o vías biológicas que pudieran ser capaces de definir la biología de la enfermedad, lo que nos deja sin una posible diana terapéutica para modificar la evolución natural de esta entidad hacia la leucemia aguda. En este trabajo, hemos detectado que en la LMMC hay varios genes diferencialmente metilados, pero no sabemos que funcionalidad tienen de una manera general ni qué papel podrían estar jugando en esta enfermedad. Para elucidar esto, teniendo en cuenta los genes que se encontraban diferencialmente metilados en la LMMC, analizamos mediante la utilización del software Ingenuity Pathway (Ingenuity System INC, www.ingenuity.com) las diferentes redes génicas que podían estar reguladas de manera anormal. Además, se utilizó el Gene Ontology, analizando todas las sondas diferencialmente metiladas que habíamos detectado en la LMMC. En ambos análisis detectamos que los genes diferencialmente metilados se encontraban enriquecidos dentro de las categorías o funciones biológicas como son la adhesión celular, diferenciación celular, regulación de procesos del desarrollo y señales de transducción. Dentro de estas funciones biológicas, identificamos más concretamente que los genes diferencialmente metilados estaban enriquecidos en las vías de PLC, JNK y ERK. Estos resultados sugieren que, la alteración en la regulación de los mecanismos epigenéticos, en este caso concreto en la metilación del DNA, participa en la regulación de procesos importantes de la biología en la LMMC (114,115) (**Figura 10**).

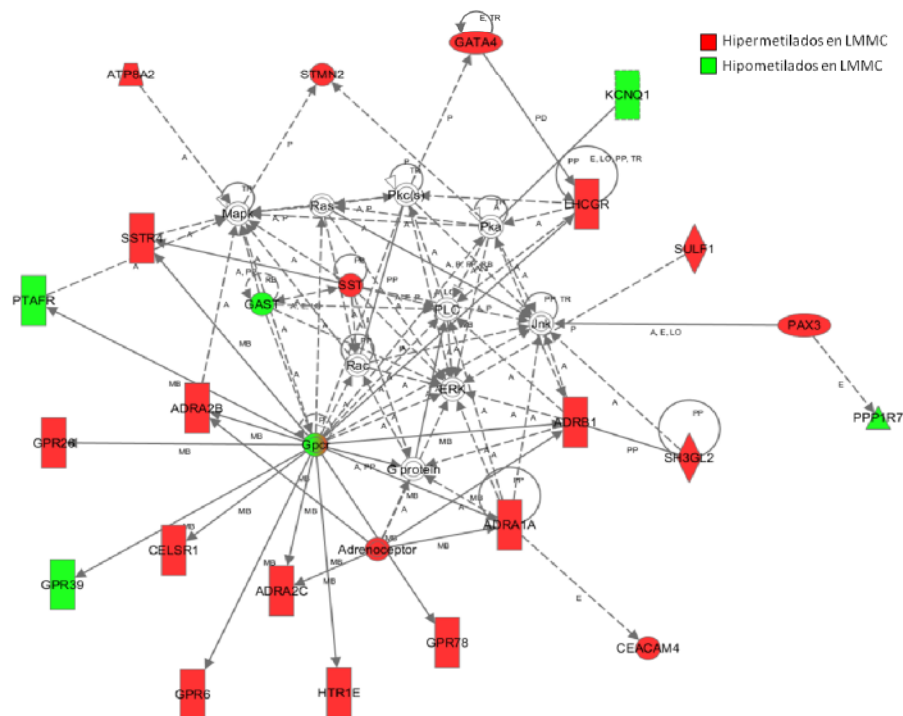


Figura 10. Red de la vía de señalización PLC/JNK/ERK obtenida con ingenuity, que contiene genes diferencialmente metilados entre los pacientes con LMMC y las muestras de donantes sanos.

Trabajos previos al nuestro han mostrado que la adquisición de una hipermetilación del DNA en algunos genes relacionados con cáncer, están frecuentemente reprimidos por el complejo represor polycomb 2 (PRC2) en las células madre embrionarias (114,115). Este fenómeno se ha descrito en algunos tumores tales como carcinoma de mama, colon o en los linfomas (116,117). Con el objetivo de determinar si en el caso de la LMMC podría ocurrir lo mismo, analizamos el nivel de enriquecimiento de los genes que son diana del PRC2 en las células embrionarias en la lista de genes que detectamos diferencialmente metilados en las muestras de pacientes con LMMC. 20% de los genes hipermetilados de manera aberrante en las muestras de LMMC (**Tabla 18**, anexo 2) se correlacionaban con genes que son diana del PRC2 en las células madre embrionarias ($p=6 \times 10^{-5}$ y OR: 2.2; 10.1% de las sondas incluidas en el array eran dianas de PRC2) indicando el enriquecimiento en dianas del PRC2 entre los genes diferencialmente hipermetilados en la LMMC. Estos resultados indican que, al igual que en otros tumores, en la LMMC mecanismos como este podría predisponer a la metilación aberrante de ciertos genes.

Por último, como la hipermetilación del DNA tiene como diana los genes con alta densidad en dinucleótidos CpG, analizamos el contenido de CpGs en los genes diferencialmente metilados de las muestras de LMMC. Para analizar si las CpGs diferencialmente metiladas de las regiones promotoras contenían diferente composición

de dinucleótidos CpG, se utilizó una clasificación recientemente descrita que agrupa a los genes según su contenido en CpGs en alto (HCP), intermedio (ICP) o bajo (LCP). Entre los 13827 genes (26397 CpGs) analizados en el array, el 54% se correspondían con genes que contienen promotores HCP, 12% ICP y el 25% a LCP (135). En nuestro caso, al igual que se ha descrito en otros tumores, no detectamos un enriquecimiento de los genes hipermetilados en la LMMC en aquellos genes con HCP (59% vs 54%). Tampoco observamos que los genes hipometilados en la LMMC se enriquecían en genes con LCP en su promotor (26 vs 25%) (**Tabla 18** anexo 2). Estos resultados indican que en la LMMC no hay una selección dirigida por el contenido de dinucleótidos CpG en los genes hiper o hipometilados.

2.3 RELACIÓN DE LA METILACIÓN DEL DNA EN LA LMMC CON LAS MUTACIONES EN GENES QUE REGULAN LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS.

Las mutaciones en genes que regulan los mecanismos epigenéticos como son los genes *JAK2*, *UTX*, *DNMT3*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2* o *TET2*, son eventos que se han detectado en pacientes con neoplasias mieloproliferativas y entre ellos en los pacientes diagnosticados de LMMC (30,55,67,101). Basándonos en el hecho de que un grupo de muestras de pacientes con LMMC presentaba un perfil de metilación del DNA mucho más similar a los controles sanos mientras que un segundo grupo de muestras de pacientes con LMMC se separaba en una segunda cohorte con un patrón de la metilación del DNA mucho más alterado (**Figura 9** y **Figura 11**) y que las mutaciones en genes que regulan los mecanismos epigenéticos ocurre en algunos de los pacientes con LMMC, nos planteamos la hipótesis de que estas diferencias en el patrón de metilación del DNA podrían ser debidas a alteraciones en genes que regulan estos mecanismos epigenéticos. Para validar nuestra hipótesis, analizamos tal y como se ha descrito anteriormente las posibles mutaciones de los genes *TET2*, *JAK2*, *IDH1*, *IDH2* o *EZH2* en nuestra serie de pacientes y estudiamos su posible asociación con el patrón de metilación del DNA observado entre los pacientes con LMMC.

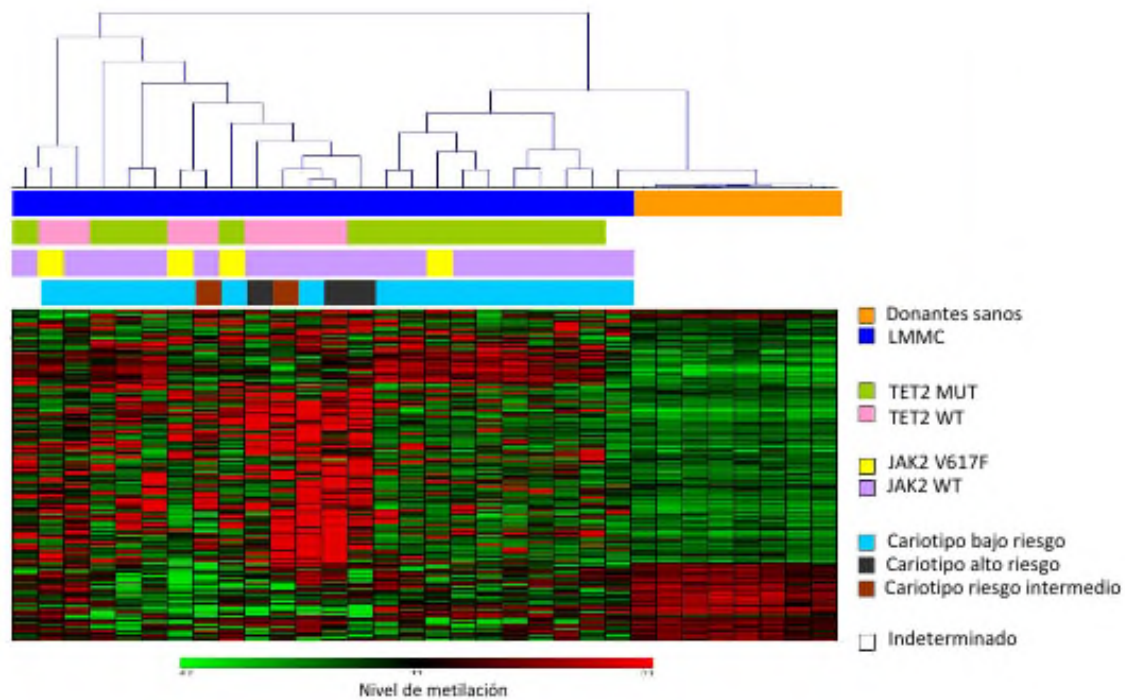


Figura 11. Cluster jerárquico basado en los dinucleótidos CpG diferencialmente metilados en las muestras de LMMC comparadas con las de donantes sanos. Los valores de Beta están representados por una escala de pseudocolor (Rojo= genes hipermetilados, verde= genes hipometilados). Las muestras están codificadas por colores. La primera barra de debajo del diagrama se refiere a las muestras de LMMC y las de donantes sanos; la siguiente barra muestra la presencia o no de mutaciones en el gen *TET2* en las muestras de LMMC; la tercera barra la presencia o no de la mutación *JAK2 V617F* y por último, la barra más inferior muestra el riesgo citogenético según el cariotipo de cada LMMC.

Un total de 15 de las 24 muestras de pacientes con LMMC mostraron alguna mutación en gen *TET2*. En 4 muestras de los 24 pacientes con LMMC, se encontró la mutación V617F en el gen *JAK2*, y solo una de las muestras mostraba mutado el gen *EZH2*. A diferencia de estas alteraciones, no se encontró ninguna mutación a lo largo de los genes *IDH1* e *IDH2* (Tabla 17).

Al superponer los resultados de los genes diferencialmente metilados en relación a las mutaciones de los genes descritos, observamos que los pacientes que no presentaban mutaciones en el gen *TET2* (*TET2*-wt) se agrupaban juntas y separadas de las muestras que presentaban algún tipo de mutación en el gen *TET2* (*TET2*-mut).

Asimismo, y en contra de lo esperado en un principio, observamos que las muestras de LMMC *TET2*-wt mostraban un mayor número de genes diferencialmente hipermetilados que las muestras de LMMC *TET2*-mut (Figura 11). Comparando los perfiles de metilación de DNA entre las muestras control y las muestras de LMMC *TET2*-wt y las muestras control con las muestras de LMMC *TET2*-mut, se identificaron un total de 83 y 18 CpGs diferencialmente metilados, respectivamente. Las CpGs

diferencialmente metiladas entre las muestras de LMMC *TET2*-mut y *TET2*-wt y las muestras control, fueron sometidas a un segundo análisis estadístico (descrito en el apartado de métodos en la página 61) para identificar diferencias significativas en la metilación del DNA entre muestras de pacientes con LMMC *TET2*-wt y *TET2*-mut. Estos análisis mostraron 63 CpGs diferencialmente metilados ($p < 0.05$) entre las muestras de pacientes de LMMC con *TET2*-wt o *TET2*-mut (**Figura 12**). De estos 63 dinucleótidos CpGs, 13 mostraban una hipermetilación en las muestras de LMMC *TET2*-mut y 50 CpGs una hipermetilación del DNA en las muestras de LMMC *TET2*-wt (**Figura 13** y **Tabla 17**). El grado de metilación del DNA observado mediante el array de metilación del DNA en 3 de los 13 genes hipermetilados en las muestras de pacientes de LMMC con *TET2*-mut se analizó mediante pirosecuenciación. En los tres casos se observó un resultado similar, validando el resultado de la metilación del DNA obtenido mediante el array de metilación.

Además, en este análisis observamos que los pacientes de LMMC con *TET2*-wt se asociaban con la presencia de cariotipos alterados a diferencia de los pacientes de LMMC con *TET2*-mut ($p < 0.01$). De hecho, los pacientes con LMMC y *TET2*-wt pertenecerían al grupo de riesgo citogenético intermedio-alto en la clasificación de la LMMC recientemente descrita (17). 4 de los 6 pacientes con LMMC y *TET2*-wt pertenecían al grupo de riesgo intermedio o alto mientras que solo uno de los 13 pacientes con LMMC y *TET2*-mut pertenecía a este grupo (**Figura 11** y **Tabla 17**). Esta asociación con las alteraciones del cariotipo podría ser la causante de la mayor hipermetilación del DNA observada, a diferencia de lo esperado, en los pacientes con LMMC y *TET2*-wt, más que la propia alteración de este gen por mutaciones en su región codificante.

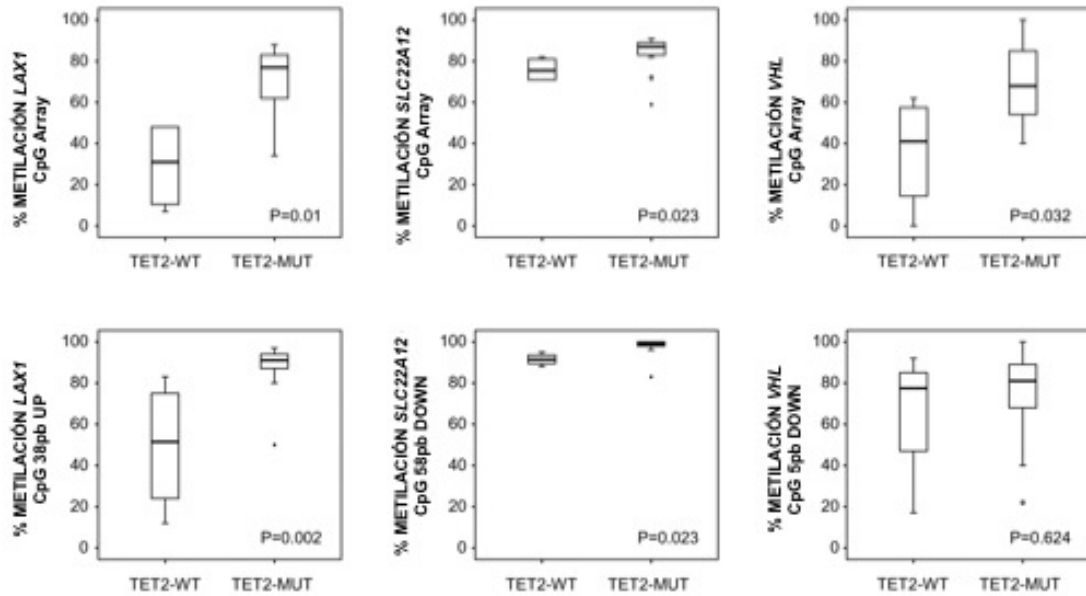


Figura 12. Resultados de la metilación obtenida por pirosecuenciación en las muestras de pacientes con LMMC según estado mutacional de *TET2* (*TET2-mut* o *TET2-wt*). Los CpG analizados se corresponden con los genes *LAX1*, *SLC22A12* y *VHL* que se encontraban hipermetilados en los pacientes con *TET2-mut*. Además, se analiza un CpG localizado 38pb upstream del CpG analizado en el gen *LAX1*; un CpG a 58pb downstream en el caso del gen *SLC22A12* y un CpG 5pb downstream en el gen *VHL*. Los valores son expresados como porcentaje de metilación. Se indican los valores medianos del porcentaje de la metilación del DNA y los valores de P que se han obtenido del análisis estadístico T-test o U-Mann Whitney.

En el caso del gen *JAK2*, el 16.6% de las muestras de nuestra cohorte de LMMC presentaba la mutación V617F (4/24 *JAK2V617F*) (**Tabla 3**, anexo 2). En el análisis realizado, no observamos ninguna asociación entre la presencia de la mutación V617F en *JAK2* y ningún perfil de metilación del DNA en los pacientes con LMMC (**Figura 4**). A pesar de no encontrar una asociación clara, realizamos un análisis diferencial entre los pacientes con LMMC y la mutación *JAK2V617F* y los controles sanos, detectando 12 CpGs diferencialmente metilados entre ambos. Pero de nuevo, al realizar un cluster jerarquizado no supervisado con los datos de la metilación del DNA de estos 12 CpGs con las muestras de pacientes con LMMC, con o sin mutaciones en *JAK2*, y las muestras control, no detectamos ninguna diferencia significativa. Junto con las mutaciones, observamos algunos dinucleótidos CpG localizados en la región promotora del gen *JAK2*, mostraban diferencias de metilación entre los pacientes con LMMC y los controles sanos pero al realizar un estudio más exhaustivo, estas diferencias no se

correlacionaron con ningún patrón de la metilación del DNA específico en los pacientes con LMMC. Estos resultados por tanto sugieren, que al menos en la LMMC, la presencia de la mutación V617F en el gen *JAK2* o diferencias en la metilación del DNA en su región promotora no están relacionadas con el perfil de la metilación del DNA específico observado en las muestras de pacientes con esta neoplasia.

Por último, en el caso de los genes *EZH2*, *IDH1* e *IDH2*, no se detectaron mutaciones ni diferencias de metilación del DNA en los CpG localizados en sus regiones promotoras, indicando que las alteraciones en estos genes no guardan relación con ningún patrón específico de la metilación del DNA en la LMMC.

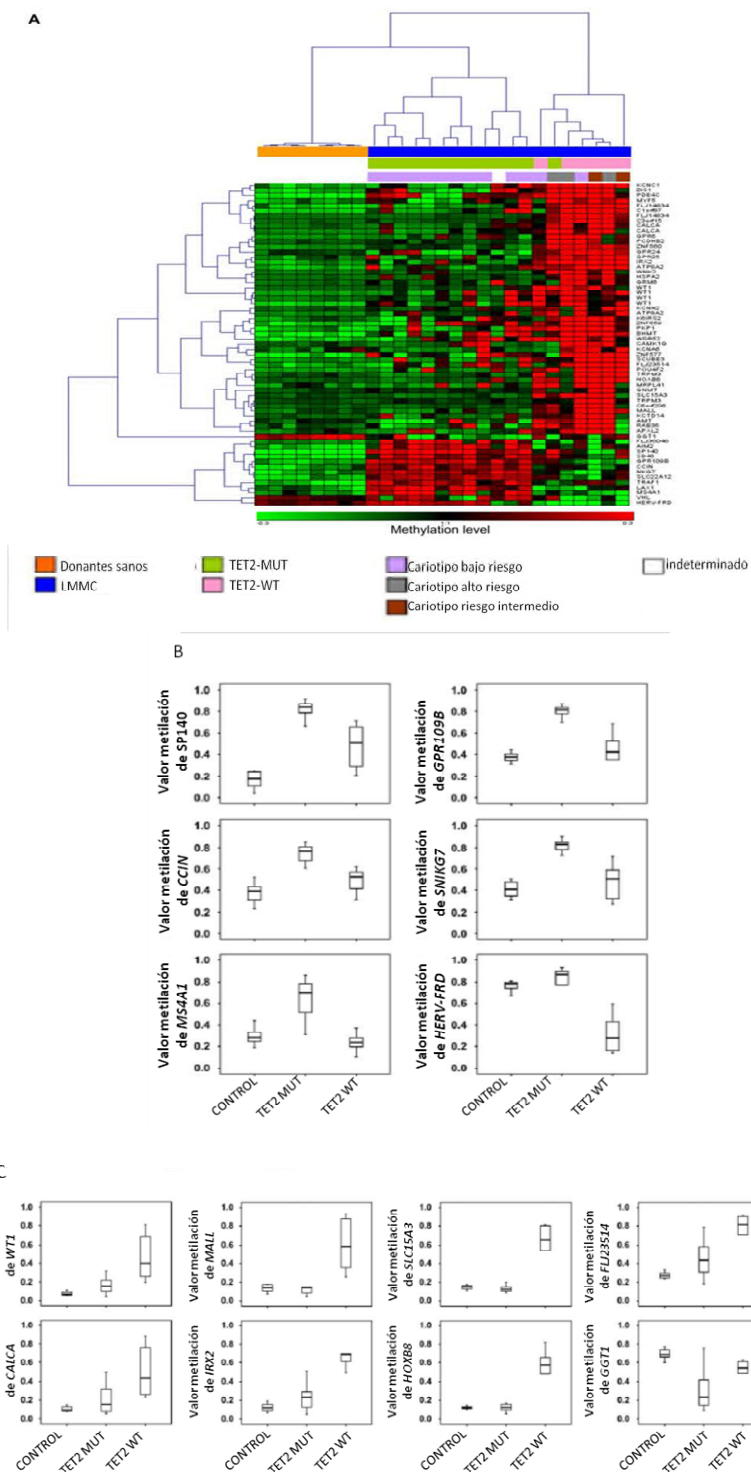


Figura 13. Análisis de los genes diferencialmente metilados entre las muestras de LMMC con y sin mutaciones en el gen *TET2*. **A)** Cluster jerárquico basado en los genes diferencialmente metilados entre las muestras de LMMC con *TET2* mutado y las muestras sin mutaciones en *TET2*. Los valores de Beta están representados por una escala de pseudocolor (Rojo= genes hipermetilados, verde= genes hipometilados). Las muestras están codificadas por colores. La barra de debajo del clustering refiere las muestras de LMMC y las de donantes sanos, la segunda barra muestra la presencia o no de mutaciones en el gen *TET2* en las muestras de LMMC y por último, la barra inferior muestra el riesgo citogenético según el cariotipo de cada LMMC. **B)** Box plot de los genes hipermetilados en las muestras del LMMC con mutaciones en *TET2* (TET2-mut) respecto a las muestras *TET2* wild type (*TET2*-wt). **C)** Box plots de los genes hipermetilados en las muestras de LMMC con *TET2*-wt respecto de las muestras *TET2*-mut.

2.4 PAPEL DEL GEN *TET2* EN LA LMMC

Tal y como hemos comentado anteriormente, a diferencia de lo esperado, las muestras de LMMC con el gen *TET2* intacto mostraron un mayor número de genes hipermetilados y esto puede estar relacionado con la presencia de cariotipos más alterados y complejos. La proteína TET2 se ha demostrado que cataliza la conversión de la 5mC en 5hmC y los pacientes con neoplasias mieloides muestran de una manera uniforme bajos niveles de 5hmC (101). En nuestro caso, debido a la tecnología utilizada que se basa en la modificación del DNA con bisulfito sódico, no podemos discriminar si el aumento en la metilación del DNA es debido a una ganancia en 5mC o en 5hmC. Aunque de una manera uniforme, los pacientes con neoplasias mieloides muestran bajos niveles de 5hmC (101). El contenido específico de 5hmC y 5mC en genes hipermetilados en pacientes con neoplasias mieloides, especialmente en aquellos pacientes donde el gen *TET2* está mutado, no se ha estudiado. Para determinar si la ganancia de metilación del DNA en genes hipermetilados en la LMMC presentaba un enriquecimiento tanto de 5mC como de 5hmC, en este estudio analizamos específicamente las regiones promotoras de 3 (*LAX1*, *SLD22A12* y *VHL*; referenciados en Anexo 1) de los 13 genes hipermetilados en los pacientes con LMMC y *TET2*-mut respecto a los pacientes con LMMC y *TET2*-wt. Este análisis lo realizamos en dos muestras de SP de donantes sanos, 8 muestras de LMMC y *TET2*-mut y 5 muestras de LMMC y *TET2*-wt. En el caso concreto del gen *LAX1*, analizamos los niveles de metilación del DNA de dos dinucleótidos localizados en dirección 5' por delante (posiciones -38 y -244 respectivamente) del dinucleótido CpG estudiado en el array de metilación correspondiente a *LAX1* (cg10117369, anexo 1). Para el gen *SLC22A12*, estudiamos un dinucleótido CpG localizado 5' por delante (59pb) y un segundo dinucleótido localizado 3' por detrás (58pb) del dinucleótido estudiado en el array de metilación para este gen *SLC22A12* (cg07220939, anexo 1). Por último, en el caso del gen *VHL*, estudiamos un único dinucleótido CpG localizado 3' por detrás (5pb) del dinucleótido CpG estudiado en el array de metilación para el este gen *VHL* (cg16869108, anexo 1) (**Figura 14**). Estos CpGs se seleccionaron debido a que eran los CpGs posibles de analizar el contenido de 5mC y 5hmC mediante la técnica elegida utilizando las enzimas de restricción MspI-HpaII (material y métodos página 55). Antes del análisis de los niveles de 5mC y 5hmC, comprobamos que estos dinucleótidos

seleccionados seguían el mismo patrón de metilación del DNA diferencial al observado en los dinucleótidos incluidos en el array. Para ello, mediante la técnica de pirosecuenciación testamos la metilación del DNA del dinucleótido localizado 38pb en dirección 5´por delante del dinucleótido analizado mediante el array de metilación para el gen *LAX1*, el CpG localizado 58pb 3´por detrás del dinucleótido CpG analizado en el array de metilación para el gen *SLC22A12* y el dinucleótido CpG localizado 5pb 3´por detrás del dinucleótido CpG analizado en el array de metilación para el gen *VHL*. Este análisis mostró, que al igual que los dinucleótidos CpG correspondientes indicados para estos tres genes y analizados mediante el array de metilación, que estos tres dinucleótidos CpG estaban hipermetilados en las muestras de LMMC con *TET2*-mut.

Tras observar los resultados obtenidos en el análisis del nivel de 5hmC en los diferentes dinucleótidos CpG seleccionados en nuestro estudio pudimos concluir que: 1) El contenido en 5hmC varía entre los diferentes genes analizados independientemente del estado mutacional del gen *TET2* (**Figura 14**); 2) Los cambios en el porcentaje de 5hmC no afectan de igual manera a los diferentes CpGs analizados incluso en el mismo gen como se observa en la **Figura 14**, los pacientes con LMMC y *TET2*-mut muestran niveles menores de 5hmC y mayores de 5mC en el dinucleótido CpG localizado 38pb 5´por delante del CpG para el gen *LAX1* y en el dinucleótido CpG localizado 58pb 3´por detrás para el CpG del gen *SLC22A12*. Pero este efecto no se observa para el segundo dinucleótido CpG estudiado para cada uno de estos mismos genes. Estos resultados nos sugieren que aunque las mutaciones en el gen *TET2* inducen una disminución de los niveles de 5hmC en el genoma en general, este efecto en la disminución de 5hmC es heterogéneo entre los genes e incluso entre los distintos dinucleótidos CpGs localizados en un mismo gen, y sobre todo en genes hipermetilados.

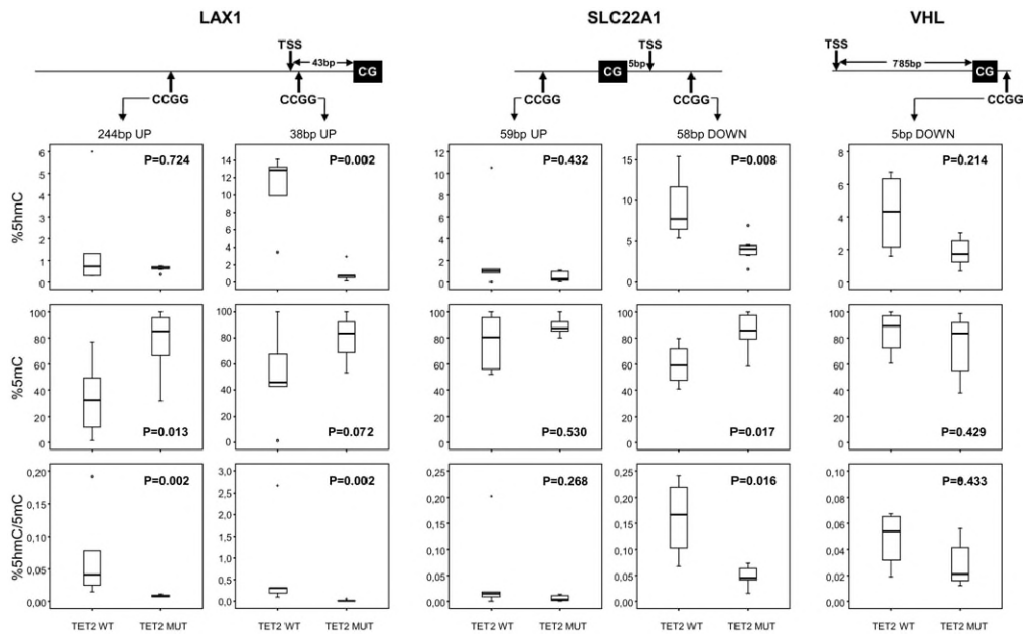


Figura 14. Análisis de los niveles de 5hmC y 5mC en los genes hipermetilados en las muestras de LMMC con TET2-mut en comparación con TET2-wt. En las gráficas se indica el valor medio del porcentaje de 5hmC, 5mC o el ratio entre 5hmC/5mC y la estadística fue realizada utilizando el análisis de T test o U Mann Whitney. CG: dinucleótido CpG incluido en el array de metilación; CCGG: dinucleótidos CpG en los cuales se han analizado los niveles de 5hmC y 5mC y TSS: sitio de inicio de la transcripción.

3. DIFERENCIAS EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES TRANSFORMADOS CON LOS NO TRANSFORMADOS A LEUCEMIA AGUDA.

Tras demostrar que las muestras de los pacientes con LMMC muestran diferentes patrones de la metilación del DNA, decidimos continuar el trabajo con la finalidad de conocer si las diferencias en la metilación del DNA nos podrían proporcionar información relevante en cuanto a la predicción de una transformación de estos pacientes con LMMC hacia una leucemia aguda. Para ello estudiamos el patrón de metilación del DNA de las 17 muestras de LMMC de las que disponíamos el seguimiento clínico y por tanto conocíamos el estado de la enfermedad (transformado a leucemia o en fase crónica) mínimo a los 5 años de seguimiento de cada uno de estos pacientes (**Tabla 9** de material y métodos, página 38). Mediante el análisis bioinformático de los datos obtenidos con el array de metilación descrito anteriormente, observamos que podíamos diferenciar a los pacientes de LMMC que transformaron a una leucemia de los pacientes que no presentaron esta transformación mediante una huella concreta de metilación del DNA. Esta huella se compone de 8 dinucleótidos CpG asociados a 8 genes diferentes,

situados en 7 de los CpGs fuera de regiones definidas como islas CpG, y 4 de ellos localizados en regiones intrónicas y uno en un exón: *TRPM8* (cg15746445). Localizado en región promotora pero no-isla CpG, *INS* (cg13993218). Localizado en región intrónica no-isla CpG, *FUT3* (cg17471102). Localizado en región intrónica no-isla CpG, *KLK5* (cg27583102). Localizado en exón no-isla CpG, *PSCA* (cg13446199). Localizado en región intrónica no-isla CpG, *NCF1* (cg02537023). Localizado en región promotora pero no-isla CpG, *FAAH* (cg12671744) el único localizado en región promotora con isla CpG bien definida y *PDE3B* (cg03439703) localizado en región intrónica no-isla CpG (**Figura 15** y **Figura 16**, ésta incluida en anexo 3)

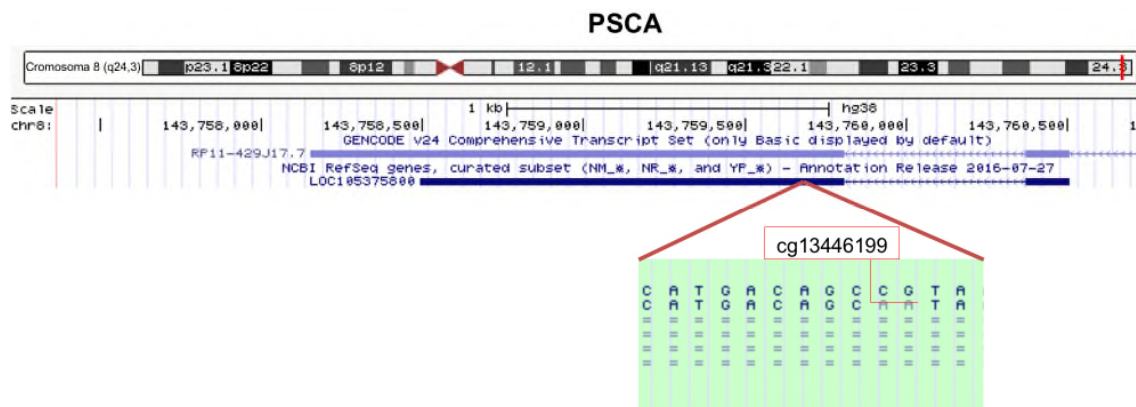


Figura 15: Esquema de la localización del dinucleótido CpG estudiado en el gen *PSCA*. La figura muestra parte del cromosoma 8 donde se localiza este gen y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg13446199) del gen *PSCA*.

Los datos de los niveles de metilación del DNA en estos 8 dinucleótidos CpG, nos permitía discriminar perfectamente los pacientes de LMMC que transformaban de los que no transformaban a una leucemia aguda. Estos 8 dinucleótidos estaban hipometilados en los pacientes que, durante los 5 años de seguimiento tras su diagnóstico, habían transformado a una leucemia aguda (**Figura 17**). En el análisis no supervisado de los niveles de metilación del DNA de estos 8 CpG, observamos que las 5 muestras correspondientes a los pacientes con LMMC que durante el curso de la enfermedad transformaron a una leucemia aguda, se agrupaban entre ellos y totalmente separados de las muestras de los pacientes con LMMC que no transformaron. Estos resultados nos sugieren que una huella basada en la metilación del DNA podría tener un valor muy importante en la predicción de la transformación a leucemia aguda en el momento del diagnóstico de una LMMC.

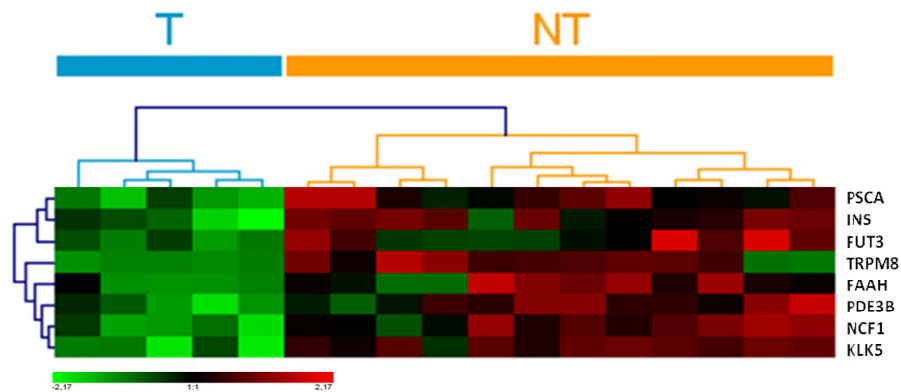


Figura 17. Cluster y heatmap supervisados de los 8 dinucleótidos CpGs que permiten discriminar las muestras de los pacientes con LMMC que transforman de los que no transforman a una leucemia aguda. T: barra horizontal azul: pacientes de LMMC transformados a leucemia aguda; NT: barra horizontal amarilla: pacientes de LMMC no transformados a leucemia aguda. Cada muestra está codificada según la escala de pseudo color; Verde: hipometilado; Rojo: metilado.

3.1 VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ARRAY DE METILACIÓN MEDIANTE PIROSECUENCIACION

Una vez obtenida la huella de los 8 dinucleótidos CpG diferencialmente metilados entre los pacientes con LMMC que transforman o no a una leucemia aguda utilizando los datos obtenidos mediante el array de metilación, realizamos una validación de estos resultados mediante una técnica mucho más cuantitativa y fiable para el análisis de la metilación del DNA como es la pirosecuenciación. Para ello, disponíamos de material biológico (DNA) obtenido en el momento del diagnóstico de LMMC de 10 pacientes que se mantenían en un estado crónico de la enfermedad y 5 pacientes que habían transformado a una leucemia aguda durante los 5 años de seguimiento. La técnica de pirosecuenciación nos permite cuantificar el nivel de metilación del DNA de cada uno de los dinucleótidos CpGs de interés, en nuestro caso los 8 dinucleótidos CpGs localizados en 8 genes diferentes. Para ello en primer lugar se realizó la modificación del DNA genómico con bisulfito sódico de las 15 muestras de pacientes con LMMC en el estudio, junto con 4 muestras de sangre periférica obtenida desde donantes sanos que se utilizaron como control negativo. Además, se utilizó un DNA comercial totalmente metilado como control positivo de la técnica de pirosecuenciación. Tras ello se realizó la pirosecuenciación de cada una de las muestras.

Primeramente, se realizó la puesta a punto de las amplificaciones mediante PCR de cada una de las regiones genómicas que contenían cada uno de los 8 dinucleótidos CpG de interés en estudio de validación. Para ello se utilizaron los cebadores diseñados y

condiciones de PCR para estos cebadores indicados en las Tablas 5 y 6 del apartado de Material y Métodos (página 48).

Una vez puesta a punto la amplificación de estas 8 regiones, se pusieron a punto las condiciones de pirosecuenciación de cada uno de los 8 dinucleótidos CpG del estudio utilizando para ello los cebadores de secuenciación diseñados e indicados en la Tabla 8 del apartado de Material y Métodos (página 51). Esta puesta a punto se llevó a cabo con una muestra de sangre periférica obtenida desde un donante sano y que se utilizó como muestra control de una no metilación y el DNA comercial totalmente metilado que se utilizó como control positivo de la metilación del DNA en cada uno de los 8 dinucleótidos CpG de interés en esta validación. En esta puesta a punto conseguimos amplificar la región genómica correspondiente y secuenciar mediante la técnica de pirosecuenciación el dinucleótido CpG de interés correctamente y sin ningún problema en 7 de los 8 dinucleótidos CpG de interés en la validación. En el caso del dinucleótido CpG englobado en la región promotora del gen *TRPM8*, aunque se consiguió una correcta amplificación de la región, no se consiguió una pirosecuenciación adecuada, ya que ni el pirograma de la muestra de sangre periférica utilizada como control negativo ni el pirograma obtenido desde el control positivo, eran pirogramas fiables, y no se podía obtener un valor fiable de la metilación del DNA de este dinucleótido CpG. Tras varias pruebas modificando las condiciones y sin mejoría en los resultados, el análisis de este dinucleótido fue excluido del análisis de validación y por tanto del estudio. Una vez puesta a punto la amplificación y la pirosecuenciación para los 7 dinucleótidos que se mantenían en el estudio, se procedió al análisis de los niveles de metilación del DNA de estos 7 dinucleótidos CpG en las 15 muestras de pacientes con LMMC. En el análisis de los niveles de metilación del DNA en cada uno de los 7 dinucleótidos CpGs en el estudio, observamos que estos mostraban una metilación del DNA parcial en las muestras de SP y que se utilizó como control (niveles de metilación del DNA de entre un 40% y un 70% en cada uno de los CpGs analizados). A diferencia de estos niveles parciales de la metilación del DNA en los controles sanos, en las muestras de los pacientes con LMMC observamos desde una hipometilación del DNA (niveles de la metilación del DNA menores al 40%) hasta una hipermetilación del DNA (niveles de la metilación del DNA mayores al 70%) respecto a los controles (**Tabla 19**).

Tabla 19: Tabla resumen de la cuantificación de cada uno de los CpGs en cada una de las muestras de LMMC en el estudio. En amarillo aparecen sombreados los pacientes de LMMC que se mantienen en un estadio crónico de la enfermedad y en verde los pacientes que sabemos que han transformado a una leucemia aguda.

Pacientes	% met <i>FAAH</i>	% met <i>NCF1</i>	% met <i>KLK5</i>	% met <i>PDE3B</i>	% met <i>INS</i>	% met <i>FUT3</i>	% met <i>PSCA</i>
LMMC1	97	36	85	84	33	94	38
LMMC3	98	38	85	79	36	97	23
LMMC4	43	40	90	57	60	91	37
LMMC5	84	41	91	72	70	100	18
LMMC6	45	37	82	51	72	97	n/a
LMMC9	50	26	87	69	62	97	25
LMMC15	42	32	85	36	70	100	68
LMMC19	42	34	74	80	54	100	14
LMMC21	84	43	84	69	53	98	56
LMMC22	88	41	87	54	62	95	20
LMMC8	53	30	54	71	65	99	28
LMMC17	7	15	84	37	40	100	8
LMMC18	5	22	50	35	30	98	24
LMMC20	10	16	87	34	26	99	16
LMMC23	12	12	27	23	13	95	7

Al analizar los resultados obtenidos de los niveles de metilación del DNA de los 7 CpGs estudiados mediante la técnica de pirosecuenciación y mostrados en la **Tabla 19**, observamos que los pacientes de LMMC transformados presentaban una clara tendencia a presentar niveles de metilación del DNA, en 6 de los 7 dinucleótidos CpGs estudiados, mucho menores que en los pacientes con LMMC no transformados (**Figura 18**). Esta tendencia no se observó en el caso del dinucleótido CpG localizado en el gen *FUT3*, siendo la metilación de este CpG mayor del 90% en todas las muestras analizadas. Estos resultados indicaban, al igual que lo observado desde los resultados obtenidos mediante el array de metilación, que los pacientes con LMMC que transforman a una leucemia aguda durante el curso de su enfermedad, presentan niveles de metilación del DNA menores que los pacientes con LMMC que no transforman, en este caso en 6 de los 7 dinucleótidos CpGs detectados en la primera huella discriminatoria de metilación del DNA en la LMMC.

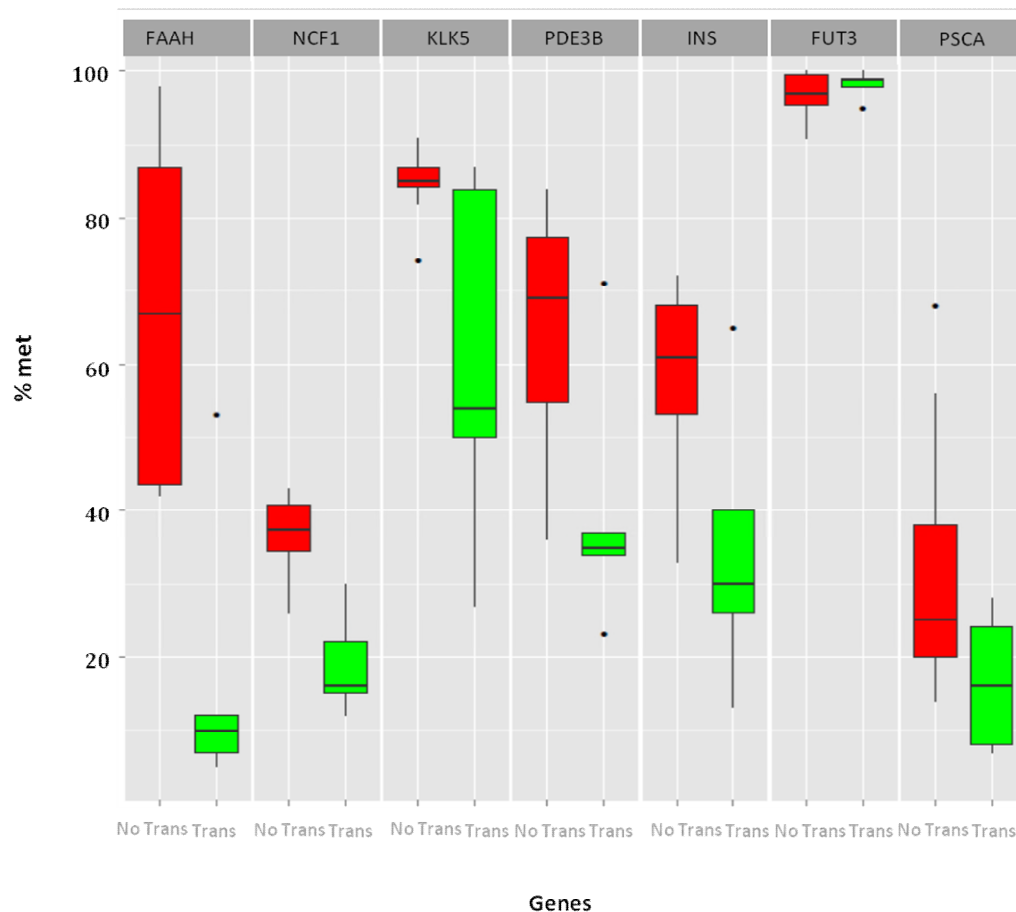


Figura 18: Resultados de los niveles de metilación de la 7 CpGs analizados mediante pirosecuenciación. Boxplot con los niveles de la metilación del DNA de los 7 dinucleótidos CpGs en las 15 muestras de LMMC. NT: muestras de pacientes con LMMC que no transforman a una leucemia aguda; T: muestras de pacientes con LMMC que transforman a una leucemia aguda.

Para obtener unos valores mucho más cuantitativos y estadísticos de la validación de los resultados obtenidos, realizamos un análisis estadístico de los valores obtenidos mediante el estudio de la p-value, o t-test. El análisis estadístico nos mostró que únicamente 4 de los 7 dinucleótidos CpGs incluidos en la validación, (localizados en los genes *PSCA*, *NCF1*, *FAAH* y *PDE3B*), mostraban niveles de metilación significativamente menores en los pacientes con LMMC que transformaban respecto a los que no transformaban durante el curso de su enfermedad (p-value < 0.05). (**Tabla 20 y Figura 19**).

Tabla 20. Valores de la p-value resultado del t-Test con los datos obtenidos del análisis de la metilación del DNA mediante pirosecuenciación y la relación de los válidos (V)/no válidos (NV) para continuar con el estudio.

GEN	FAAH	NCF1	KLK5	PDE3B	INS	FUT3	PSCA
p-VALUE	0.0019	0.0024	0.0936	0.0329	0.0602	0.3241	0.0451
VALIDEZ	V	V	NV	V	NV	NV	V

Utilizando los niveles de metilación del DNA de los 4 CpGs con unas diferencias de la metilación del DNA significativas, en el análisis no supervisado observamos, que al igual que en el análisis no supervisado con los datos del array en los 8 dinucleótidos CpGs, las muestras de los pacientes de LMMC que transformaron a una leucemia aguda se agrupan entre si y separados de las muestras de los pacientes con LMMC que transformaron. (**Figura 19**).

Como resumen, los resultados de este análisis nos permitieron validar los resultados obtenidos mediante el array de metilación. Sin embargo, el número de CpGs utilizados se redujo en relacion a los resultados del array. Por tanto los niveles de metilación del DNA pueden ser un importante marcador para predecir una posible transformación a leucemia aguda de los pacientes con LMMC ya en el momento de su diagnóstico.

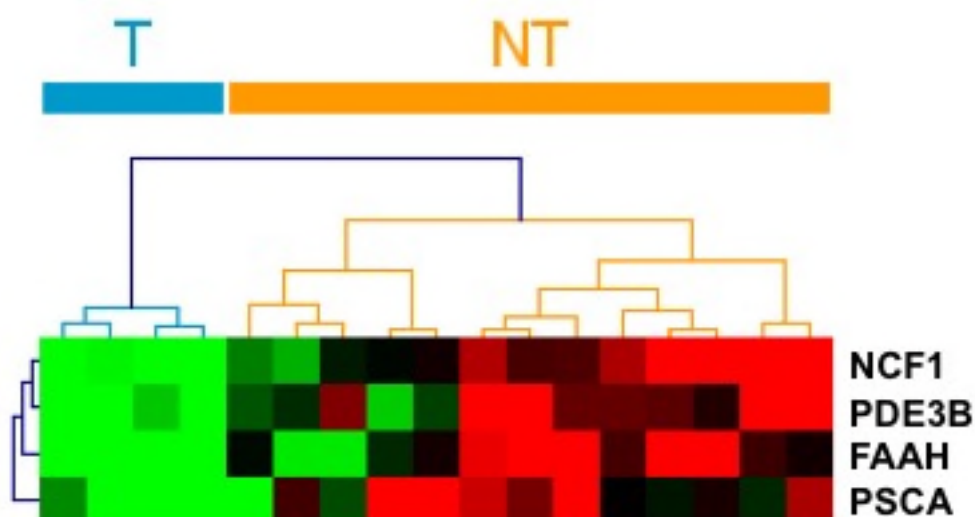


Figura 19. Cluster y heatmap supervisados de los 4 dinucleótidos CpGs que mostraron una diferencia significativa en sus niveles de metilación entre los dos grupos de pacientes con LMMC. La barra horizontal muestra que los pacientes transformados (azul) y los no transformados (amarillo) se agrupan perfectamente entre ellos pero separados un grupo del otro. Verde: hipometilado; Rojo: metilado.

3.2 ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE PREDICCIÓN DE LOS 4 DINUCLEÓTIDOS CpGs EN EL ESTUDIO.

Con los datos de los niveles de metilación del DNA en los 4 dinucleótidos CpG significativos entre los pacientes de LMMC que transforman o no transforman a una leucemia aguda, se crearon las matrices de datos y las gráficas que nos permitieron conocer el punto de máxima potencia diagnóstica mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC). En nuestro estudio, de manera independiente, los niveles de metilación del DNA de cada uno de los 4 dinucleótidos CpGs presentaba un área bajo la curva (AUC) mayor de 0.8 en el análisis de las curvas ROC. Considerando que el AUC =1 corresponde a un test predictor perfecto y los valores por debajo de 0.5 se explican por el azar, la potencia predictora de transformación de cada uno de nuestros CpGs estudiados por separado era francamente buena. No obstante, consideramos que era mucho más interesante conocer la potencia predictiva del estudio de los 4 dinucleótidos CpGs de interés en conjunto. Este análisis reveló que el análisis de la metilación del DNA de los 4 CpGs en conjunto mejoraba el resultado en comparación con el estudio de cada uno de los CpGs de manera independiente, alcanzando con el análisis global un AUC de 1. (**Figura 20**) Como se ha dicho anteriormente, nos encontramos ante un resultado ideal. Entendiendo pues, que la potencia predictiva de nuestros 4 CpGs estudiados de manera conjunta predicen desde el diagnóstico, con altísima precisión, el riesgo de transformación a LMA.

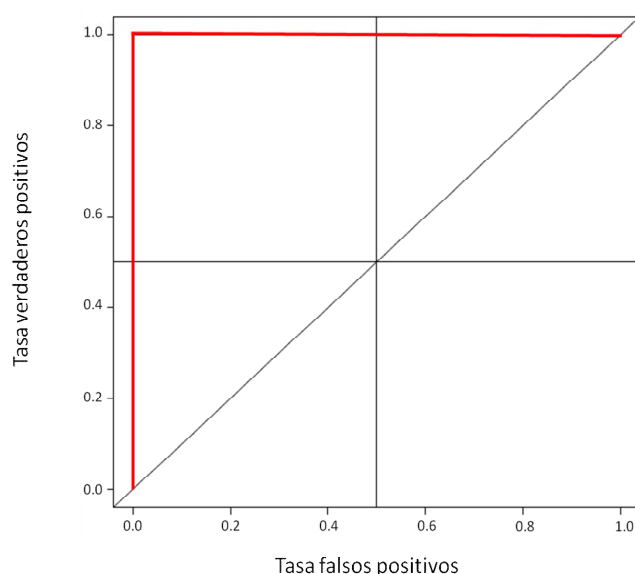


Figura 20: Representación de la curva ROC obtenida del estudio de la primera serie. La AUC es igual a 1, curva perfecta, en los cuatro CpGs confirmados.

Dado el número reducido de muestras en nuestra serie tanto de pacientes con LMMC que no transformaban como que transformaban a una leucemia aguda, es muy complicado extrapolar los datos obtenidos ni hacer una estimación poblacional con el nivel de metilación de los 4 dinucleótidos CpGs en el estudio, por lo que realizamos una validación interna de los resultados de predicción mediante la técnica de bootstrapping (K-FOLD, 10-FOLD en nuestro caso). Esta técnica, también descrita con anterioridad, enfrenta cada uno de los resultados obtenidos con el resto de los resultados por lo que de una manera controlada estadísticamente se amplía la muestra en estudio. De esta manera, este estudio nos permitió extraer una nueva matriz de datos (**Tabla 21**) y de ella conocer los datos de Sensibilidad y Especificidad de nuestra huella con los niveles de la metilación del DNA de los 4 CpGs. Los resultados obtenidos mediante la aproximación de K-FOLD, nos mostraron que la metilación del DNA de estos 4 CpGs presentaba una sensibilidad de 0.889 y una especificidad de 0.8 con un AUC igual a 0.95 para la predicción de la transformación de los pacientes con LMMC en el momento del diagnóstico (**Tabla 21**). Estos resultados indicarían que nuestro modelo predictivo de transformación a LMA cometía un error, es decir, de las 14 muestras no transformadas una fallaba y de las 5 muestras transformadas solo en una cometía error de predicción. Estos datos extrapolados a la población, nos permiten estimar que en 100 casos de pacientes con LMMC que fueran a transformar detectaríamos el 80% de ellos utilizando nuestra huella de metilación del DNA. Sólo en el 20% de la población analizada cometeríamos el error de no catalogarla como LMMC con riesgo muy alto de transformación. Mientras que el 80% restante, como consecuencia de este análisis, podrían beneficiarse otro tipo de seguimiento y/o tratamiento que mejoraría su respuesta y calidad de vida gracias a una actuación anticipada.

Tabla 21: matriz de confusión de donde se puede calcular la Sensibilidad (S) y la Especificidad (E) de la prueba. Se añade además el resultado del cálculo del área bajo la curva (AUC) tras la aproximación K-FOLD.

	No transformadas	Transformadas	Total
Test +	8	1	9
Test -	1	4	5
Total	9	5	14
precisión	0,889 (S)	0,80 (E)	
Área ROC	0,956	0,956	

4. VALIDACIÓN EXTERNA DE LOS RESULTADOS

Con la finalidad de conocer la validez de nuestra huella predictiva de la transformación a una leucemia aguda en el momento del diagnóstico de una LMMC utilizando para ello niveles de metilación de 4 dinucleótidos CpGs, estudiamos los niveles de metilación de estos 4 dinucleótidos CpGs en una nueva serie de 52 pacientes. Al analizar exhaustivamente los datos demográficos y de seguimiento en las muestras de pacientes con LMMC, en alguno de los casos observamos que los datos eran insuficientes, lo que supuso una reducción en el número de los casos candidatos a estudio. Además, este motivo nos llevo a permitir la inclusión en el estudio de muestras de pacientes con LMMC pero que presentaban un seguimiento muy limitado (apenas un año). Aún no siendo las condiciones exactas a la primera serie en estudio, consideramos que la serie podía seguir siendo representativa de la población ya que la relación de pacientes que mostraron una transformación a leucemia aguda y de los que no, se mantenía (7 transformados/16 no transformados). Siguiendo estos criterios, de las 52 muestras de la serie, únicamente 23 muestras fueron evaluadas en el estudio de validación (**Tabla 10 de material y métodos**, página 39)

De igual manera que con la serie inicial se realizó la modificación del DNA genómico de las 23 muestras con bisulfito y se realizó el análisis de los niveles de metilación del DNA en los 4 dinucleótidos CpG de la huella mediante la técnica de pirosecuenciación **Figura 21** (incluida en anexo 3, pirogramas correspondientes a las muestras transformadas de los 4 CpGs de estudio)

Con los datos de los niveles de metilación de los 4 CpGs obtenidos mediante pirosecuenciación en las 26 muestras de LMMC de la serie alemana incluidas en el estudio, se realizó una nueva tabla para el estudio bioinformático y estadístico. (Tabla 22).

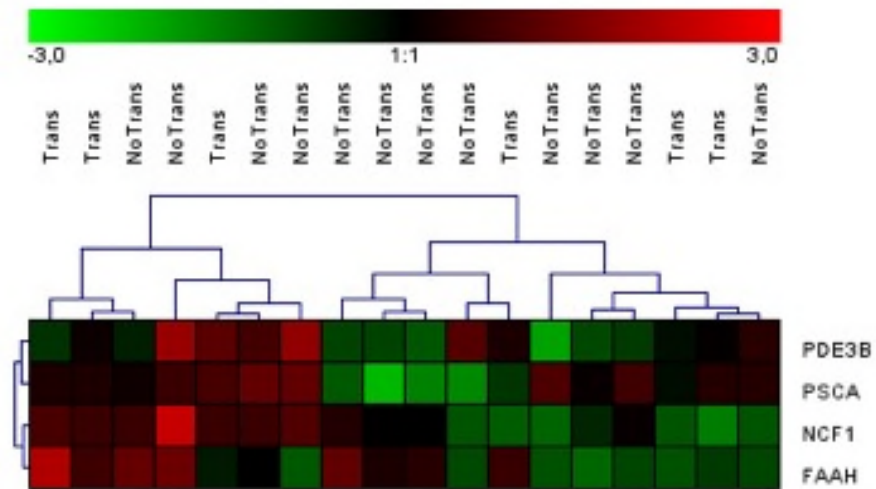


Figura 22. Cluster y heatmap Array resultado del estudio de los datos de la pirosecuenciación donde se observa que las muestras no clusterizan diferenciando el estado de la transformación. En este estudio además fueron excluidas las muestras que no conseguimos un pirograma lo suficientemente claro como para ser interpretado, estudiando por tanto 18 muestras. Con la escala de pseudo color se muestran en verde las muestras hipometiladas según los resultados de la pirosecuenciación y en rojo los hipermetilados.

Tabla 22. Tabla resumen de los porcentajes de metilación del DNA de los 4 CpGs obtenidos en las 26 muestras de LMMC de la serie alemana. El sombreado en verde indica los pacientes que habían transformado a una leucemia aguda y en amarillo los seguían sin evidencia de transformación.

Paciente	<i>NCF1</i>	<i>PDE3B</i>	<i>PSCA</i>	<i>FAAH</i>
PA-1	18	69	15	15
PA-4	24	34	36	7
PA-6	54	84	43	64
PA-9	29	35	8	42
PA-13	33	35	22	61
PA-15	29	31	16	45
PA-16	999	999	999	999
PA-17	36	65	49	35
PA-23	16	14	46	13
PA-25	36	43	37	62
PA-29	39	82	49	11
PA-31	30	37	44	16
PA-33	18	59	40	16
PA-35	43	52	N/A	90
PA-36	17	43	N/A	64
PA-48	26	51	N/A	57
PA-2	36	53	39	51
PA-5	36	70	45	28
PA-11	38	39	39	82
PA-22	17	56	27	50
PA-24	13	51	40	19
PA-27	18	47	33	13
PA-53	47	73	N/A	56

En esta ocasión el análisis estadístico realizado, el t-test, no encontró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metilación de ninguno de los 4 CpGs entre los pacientes que progresaban y los que no. Además, ninguno de los 4 CpGs de manera independiente mostraba un AUC suficiente para considerarse un buen estadístico en la predicción de transformación a una leucemia aguda (un AUC de 0.5 es considerado como una asociación debida al azar) (**Tabla 23**). Se realizó también un boxplot con los datos crudos de la metilación del DNA (% de metilación) obtenidos de la pirosecuenciación comparando los pacientes que transformaron a una leucemia aguda

de los que no, y este análisis, sorprendentemente, mostró que la tendencia en cuanto a la metilación del DNA de estos 4 CpGs estaba invertida respecto a los datos obtenidos en nuestra primera serie (**Figura 23**). Los CpGs que en esta serie mostraban diferencias de metilación del DNA eran a expensas de una mayor metilación del DNA en los pacientes transformados, en contra de lo que habíamos observado en nuestra primera serie de pacientes con LMMC.

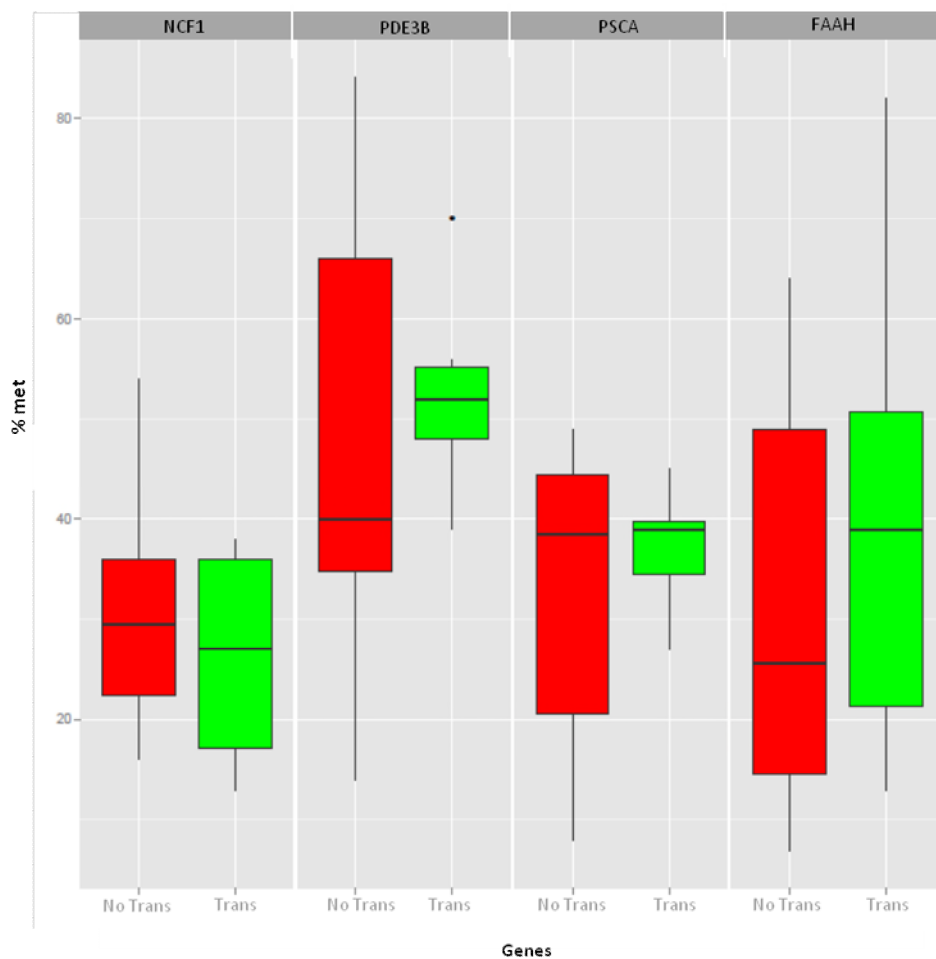


Figura 23. Boxplot de los resultados del nivel de metilación de los 4 CpGs de interés. En esta figura se muestran los niveles de metilación de los 4 CpGs en los pacientes con LMMC de la serie alemana. No Transformadas en rojo y transformadas en verde.

Tabla 23. Resultados del análisis estadístico realizado mediante t-test con las muestras válidas de la serie alemana.

GEN	NCF1	PDE3B	PSCA	FAAH
p-VALUE	0.5106	0.639	0.4974	0.5177
AUC	0.5694	0.611	0.4930	0.6180

Aunque el primer análisis estadístico realizado no mostrase ningún resultado significativo en cuanto a la validación de nuestra huella de metilación del DNA, realizamos el estudio K-FOLD. Este análisis, al igual que el anterior análisis mediante t-test, nos mostró que en esta segunda serie de pacientes con LMMC, el nivel de metilación del DNA de los 4 CpGs en el estudio no presentaba ningún valor predictivo en cuanto a la transformación de estos pacientes a una leucemia aguda (**Tabla 24**).

Tabla 24. Matriz de confusión de donde se puede calcular la Sensibilidad y la Especificidad de la prueba. Se añade además el resultado del cálculo del área bajo la curva (AUC) tras la aproximación K-FOLD.

	No transformadas	Transformadas	Total
Test +	9	4	13
Test -	3	2	5
Total	12	6	18
precisión	0,692 (S)	0,40 (E)	
Área ROC	0.768	0.497	

5. VALIDACIÓN EXTERNA DE LOS RESULTADOS CON UNA NUEVA SERIE ESPAÑOLA

Dado que los resultados obtenidos en el análisis de la segunda serie no eran los esperados y sin poder precisar de manera concreta la idoneidad de las muestras recibidas, se decidió continuar con el estudio. Para ello contactamos nuevamente con el Departamento de Genética de la Universidad de Navarra. Se solicitaron muestras de pacientes diagnosticados de LMMC según los criterios de la OMS; estas muestras debían haber sido tomadas al diagnóstico y debían tener un seguimiento más amplio que dos años. Eran los requisitos básicos que se necesitaban. Con estas características, nos

proporcionaron DNA de 11 nuevos pacientes con LMMC (**Tabla 10 de material y métodos**, página 40). De los 11 pacientes sabíamos que 3 habían transformado a LMA, por lo que la proporción transformados/no transformados también se mantenía, asumiendo por tanto que la serie, aunque pequeña, era representativa.

De la misma manera que en las dos series anteriores, las muestras de DNA recibidas de los 11 pacientes con LMMC se procesaron mediante la técnica de modificación con bisulfito sódico y posteriormente se realizó el análisis de la metilación de los 4 CpGs en estudio mediante la técnica de pirosecuenciación. A pesar de que no fue posible concluir con el estudio de varias de las muestras para el gen *PSCA* en la serie alemana, para este estudio partimos desde el punto inicial y se intentó el análisis de la metilación de los cuatro CpGs de interés (**Tabla 25**).

Tabla 25. Tabla que muestra los resultados de la pirosecuenciación de los 4 CpG de interés en las muestras de pacientes con LMMC de la tercera serie.

Individuo	NCF1	FAAH	PSCA	PDE3B
LMMC1	34	91	20	31
LMMC2	47	43	29	31
LMMC3	56	77	44	97
LMMC4	36	18	26	35
LMMC5	35	84	29	53
LMMC6	17	12	27	40
LMMC7	34	15	54	31
LMMC8	29	91	35	52
LMMC9	32	22	0	45
LMMC10	28	23	38	31
LMMC11	47	43	NA	35

De igual manera que en las anteriores series, con los resultados obtenidos en el estudio mediante pirosecuenciación de los niveles de metilación del DNA de los 4 CpGs de interés, se realizó el t-test para comprobar si alguno de los CpGs presentaba una diferencia de metilación del DNA estadísticamente significativa entre los pacientes con LMMC que transforman o no a una leucemia aguda, así como si alguno de ellos o el conjunto de ellos se mostraba como buen marcador diagnóstico mediante las curvas de ROC. (**Tabla 26 y Figura 24**)

Tabla 26. Resultados del t-test para las muestras de la serie española para los cuatro CpGs que demostraron su validez en el estudio inicial.

GEN	NCF1	PDE3B	PSCA	FAAH
p-VALUE	0.9646	0.3285	0.594	0.1208
AUC	0.6041	0.5833	NO	0.6041

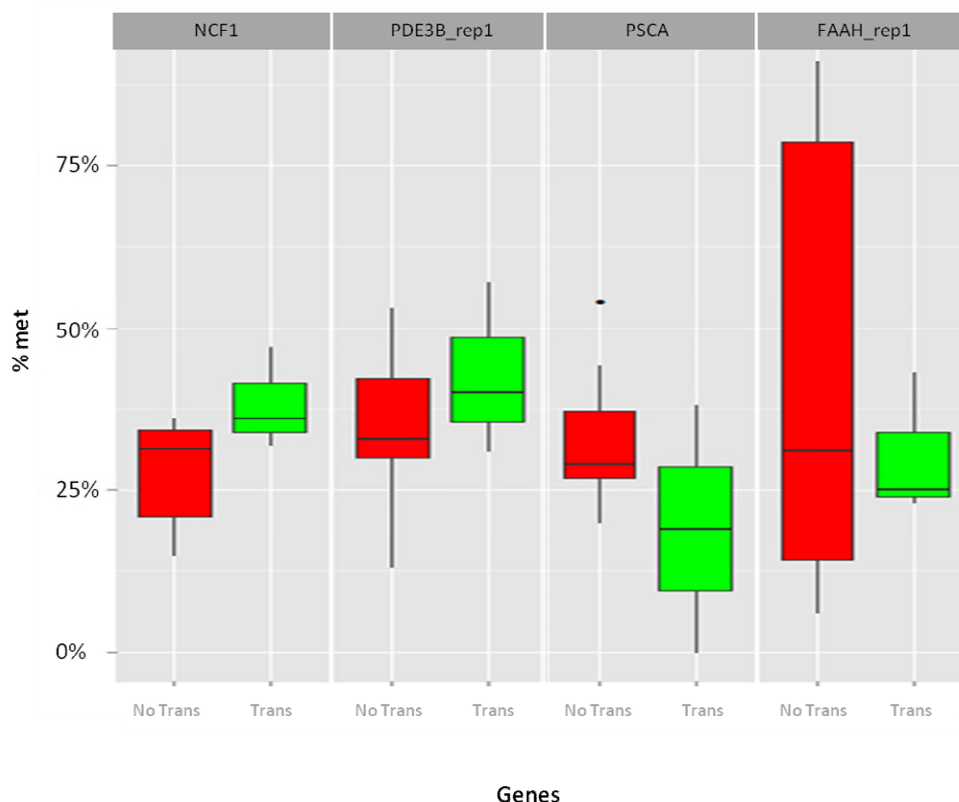


Figura 24. Boxplot resultado del estudio con los datos de la pirosecuenciación de las muestras obtenidas de la Universidad de Navarra.

Observamos que en ninguno de los CpGs, los niveles de la metilación del DNA entre los pacientes con LMMC que transformaron a una leucemia aguda y de los que no transformaron, presentaba una p-value < 0.05 por lo que concluimos que no existen diferencias significativas en la metilación del DNA entre estos dos grupos de pacientes con LMMC. Aunque las AUC para las 3 CpGs en las que se pudo continuar el estudio era mayor de 0.5, los resultados son muy pobres y no aseguran ser un buen predictor de la transformación a leucemia aguda. De igual manera que ocurría con la serie alemana la tendencia observada es que los pacientes no transformados presentan menos metilación del DNA que los transformados. Por lo tanto, estos resultados están en dirección contraria al estudio inicial. Parece que los niveles de metilación del CpG

correspondiente al gen *FAAH* tienden más hacia los resultados originales pero no tienen potencia suficiente para confirmarse con los estudios estadísticos.

Los niveles de metilación del DNA correspondientes al gen *PSCA* no son válidos para este estudio ya que no fue posible conseguir un valor de metilación del DNA fiable para una de las muestras de un paciente que transformó a una leucemia aguda por lo que nos quedamos únicamente con dos muestras transformadas que no es suficiente para ningún estudio estadístico.

Por lo tanto, y en contra de lo esperado, estos resultados indican que, los niveles de metilación del DNA de los CpGs candidatos no muestran un valor predictivo seguro para la correcta predicción de una posible transformación a una leucemia aguda de los pacientes con LMMC en el momento del diagnóstico.

5. DISCUSIÓN

En la última década asistimos a un gran auge del estudio molecular, tanto desde el punto de vista del transcriptoma, genoma o incluso del epigenoma, en las enfermedades hematológicas, sobretodo en los LNH, LLA, LMA y SMD. Concretamente, los estudios realizados en estos últimos, los SMDs, en los que en las series analizadas se incluían de manera repetida algunos pacientes diagnosticados de LMMC, nos han permitido empezar a intuir el papel que puede tener la metilación aberrante del DNA en la LMMC. Pero en la actualidad las evidencias de la alteración de este mecanismo epigenético en la LMMC son escasas aunque en el tratamiento de esta enfermedad se estén aplicando drogas epigenéticas como la azacitidina, inhibidor de la actividad metiltransferasa de las DNMTs, o inhibidores de las desacetilasas de histonas.

A nivel de genes individuales, en trabajos previos se había demostrado la presencia de una hipermetilación del DNA en la región del promotor del gen *CDKN2B* en el 58% de los pacientes de LMMC estudiados (en una serie de 33 pacientes) y una hipometilación del DNA de *C-MYC* en 2 pacientes con LMMC (de los 15 pacientes estudiados de las diferentes patologías) (89,118). A nivel más global, en un estudio realizado utilizando un array que permitía analizar simultáneamente la metilación del DNA de la región promotora de 807 genes, Jiang y colaboradores observaron la hipermetilación del DNA en 94 de los 807 genes en un grupo pequeño de 14 muestras de pacientes con LMMC comparados con muestras obtenidas de controles sanos (119) indicando por primera vez, aunque todavía de una manera limitada, que la metilación del DNA podría estar sufriendo alteraciones, al igual que en otros tumores humanos, en distintas regiones promotoras de distintos genes en la LMMC. Debido a estos primeros resultados, se llegó a la aprobación del uso de drogas epigenéticas como son la Decitabina, 5-azacitidina (inhibidores de la actividad metiltransferasa de los DNMTs) o inhibidores de las desacetilasas de histonas, como es el ácido valproico, para el tratamiento de pacientes diagnosticados de LMMC. En este sentido, es interesante indicar que con el tratamiento con Decitabina, se han conseguido resultados importantes, alcanzando respuestas globales de hasta el 50% de los pacientes con LMMC (32). Estos datos por tanto evidencian que la presencia de anormalidades epigenéticas en la LMMC puede ser una interesante diana terapéutica para el diseño de nuevos fármacos que mejoren el tratamiento y la calidad de vida de los pacientes con LMMC.

En nuestro estudio hemos identificado 260 dinucleótidos CpGs, correspondientes a 249 genes, diferencialmente metilados en la LMMC, lo que claramente indica que una metilación aberrante del DNA podría contribuir de una manera importante en la patogénesis de esta enfermedad. Este número de genes hipermetilados es significativamente menor en comparación con otras enfermedades hematológicas como son el linfoma de células B o la leucemia linfoblástica aguda, (120,121) pero aun así, esta alteración del patrón de metilación del DNA observado en las muestras de pacientes con LMMC puede ser de gran interés, como comentaremos más adelante, debido a que afecta a genes y vías importantes para la correcta biología de las células y por tanto sugiere que esta alteración epigenética puede jugar un papel importante en el desarrollo de la LMMC. Además, nuestros resultados, junto los resultados de los estudios descritos anteriormente evidencian que la presencia de anomalías epigenéticas en la LMMC se muestra como una interesante diana terapéutica para el diseño de nuevos fármacos que mejoren el tratamiento y la calidad de vida de los pacientes con LMMC.

Al analizar las características de los genes diferencialmente metilados en la LMMC, en nuestro estudio observamos que varios de estos genes son genes que están frecuentemente regulados por el complejo represor polycomb (PRC2) en las células madre embrionarias (101,116,117). Varios estudios han demostrado que en distintos tumores humanos los genes regulados por el complejo PRC2 son susceptibles y están predispuestos a sufrir una hipermetilación del DNA en su región promotora. Los resultados de estos estudios han sugerido que las células tumorales pueden provenir de una célula madre epigenéticamente alterada previamente o que bien las células tumorales pueden ir hacia atrás en su proceso de diferenciación, adquiriendo unas características epigenéticas similares a la de una célula mucho más indiferenciada (117,120). Aunque el enriquecimiento de genes diana del complejo PRC2 entre los genes hipermetilados en la LMMC es menor que en otras neoplasias hematológicas como el LNH o la LLA, hay dianas de PRC2 significativamente hipermetiladas como para apoyar esta hipótesis. Además, como la LMMC está caracterizada por la implicación de las célula madre hematopoyéticas, sugiere en este caso que la alteración del patrón de metilación del DNA podría ser el evento inicial que predisponga al precursor celular a desarrollar una neoplasia mieloproliferativa.

Junto con los genes regulados por el complejo PRC2, en este caso utilizando el software de análisis bioinformático Ingenuity Pathway Analysis (IPA), en la lista de genes diferencialmente metilados entre las muestras de pacientes con LMMC y los controles sanos, identificamos una red génica específica centrada en tres vías importantes que son las vías de PLC, JNK y ERK. La deficiencia de PLC-beta3 y Lyn en ratas, da lugar al desarrollo en estas ratas de un SMD/NPM parecido a la LMMC en humanos (114,115). Además, este desarrollo de la LMMC es dependiente del descenso de la actividad de la fosfatasa Shp-1 y como consecuencia una activación constitutiva de stat5, requerida para el desarrollo de una leucemia y un síndrome muy parecido a la LMMC humana (115). Sin embargo, el mecanismo de regulación de la expresión del gen *PLC-beta3* en tumores humanos no ha sido descrito todavía. Los resultados de nuestro estudio sugieren en este sentido, que la hipermetilación del DNA podría jugar en parte un papel importante en la regulación del gen *PLC-beta3*, liderando la activación de manera constitutiva de STAT5, de una manera similar a lo observado en la LMC y otras NMP asociadas a la proteína BCR-ABL1 o mutaciones en el gen *JAK2* (122). En el caso de las vías de JNK y ERK, aunque su relación con la LMMC no está demasiado probada, la activación de ambas vías juega un papel importante en la inducción de la apoptosis y la resistencia a drogas en la LMC (123,124) y LMA (125). Estos datos indican que la alteración de las vías descritas debido a la metilación aberrante del DNA podría ser importante para el desarrollo de la LMMC e incluso para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estos pacientes.

En los últimos años, en parte gracias al desarrollo frenético de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, uno de los grandes hallazgos que se ha realizado en relación a las neoplasias mieloproliferativas, entre ellas la LMMC, es que en todas ellas se han detectado que varios genes están alterados debido a mutaciones en su región codificante (29,30,55,57,63,66,67,71,99). Entre estos genes, sobre todo destacan genes que están implicados en la regulación de los mecanismos epigenéticos como son los genes *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1* o *EZH2*. En el caso de la LMMC, se ha observado que más del 80% de los pacientes con LMMC albergan mutaciones en diversos genes incluyendo los genes *TET2*, *CBL*, *RUNX1*, *RAS*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *ASXL1* o *EZH2* (126). A pesar de la importancia de las mutaciones en genes que están implicados en la proliferación celular o la inhibición de la apoptosis, como es el caso de *RAS* o *RUNX1*, debido a su implicación directa en la expansión del clon aberrante (7,59), no ha sido posible

demostrar su relevancia en la evolución hacia la malignidad o su papel pronóstico en la LMMC. En el caso del gen *SRSF2*, implicado en la maquinaria del espliceosoma, se ha observado que hasta el 13% de los pacientes que muestran la mutación en este gen, se asocian con una transformación leucémica, sin embargo no se ha podido demostrar su papel como factor pronóstico independiente en la LMMC (71). Las mutaciones en el gen *TET2* se han postulado como mutaciones “driver” de la enfermedad y que cuando éstas se asocian con mutaciones en otros genes como *ASXL1*, *EZH2*, *NCSTN* o *KIT D816V* (66,86) empeorarían el pronóstico de los pacientes con LMMC, ya que parece que estos genes aceleran la evolución a estados más avanzados de la enfermedad. *TET2* es uno de los genes más ampliamente estudiados y existen trabajos que indicarían su implicación en la patogénesis de la LMMC (63,67,90-93,127). Este gen junto con otros como *EZH2* se han asociado con el pronóstico de la enfermedad (30,55,70,94,101), pero en la actualidad el papel de la mayoría de los genes mutados e incluso de cada mutación en los genes descritos es todavía controvertido. Sólo destacar que la única alteración molecular capaz de mantener su papel pronóstico independiente en la LMMC, tras varios análisis multivariantes en los diferentes scores pronósticos estudiados ha sido el gen *ASXL1*(92), aunque no se ha podido correlacionar en estos estudios con la transformación hacia una leucemia aguda.

Debido a todo esto, en nuestro estudio hemos querido examinar la posible correlación de las mutaciones en genes codificantes, sobre todo en genes implicados en la regulación de los mecanismos epigenéticos como *TET2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2* o *ASXL1*, y la alteración del patrón de metilación del DNA en la LMMC. Tal y como se ha descrito en el apartado de resultados, debido al número limitado de pacientes en el estudio y la frecuencia de mutaciones en los genes indicados anteriormente, al final únicamente hemos podido analizar en detalle la posible correspondencia entre el patrón de metilación del DNA y la presencia o no de mutaciones en el gen *TET2* en los pacientes diagnosticados de LMMC. *TET2* participa en la conversión del residuo 5mC en 5hmC y por lo tanto parece que esta conversión puede ser el primer paso para una posible des-metilación del DNA (96,108,128). La inactivación de *TET2* induce un descenso en los niveles de 5hmC en progenitores mieloides, y una desregulación en células progenitoras hematopoyéticas liderando el desarrollo de neoplasias mieloides parecidas a la LMMC (92,93,129). Aunque en los pacientes con presencia de mutaciones en *TET2* en principio esperaríamos encontrar unos niveles aumentados de la

hipermetilación del DNA en relación a niveles de 5mC (debido a la falta de la capacidad del gen *TET2* mutado de transformar la 5mC en 5hmC) en comparación con los pacientes sin mutaciones en *TET2*, en nuestro estudio al igual que en estudios posteriores (130), prácticamente no encontramos diferencias entre ambos grupos, y lo que encontramos presentaba un patrón contrario a lo esperado. Únicamente 13 genes presentaban hipometilación del DNA en los pacientes de LMMC con *TET2* no mutado, respecto del total de genes diferencialmente metilados entre los pacientes con presencia de mutaciones o no en el gen *TET2*. La mayoría de los genes diferencialmente metilados, en concreto 43 genes, mostraban una hipermetilación aberrante del DNA en los pacientes con LMMC sin mutaciones en el gen *TET2* en comparación con los pacientes con mutaciones en este gen. Curiosamente, que los pacientes con LMMC que no presentaban mutaciones en el gen *TET2* se relacionaban con una asociación estadísticamente significativa con la presencia de cariotipos muy alterados ($p < 0.01$). En nuestra opinión, estos cariotipos complejos podrían ser la causa y explicar la mayor hipermetilación del DNA en el promotor de genes en pacientes con LMMC y el gen *TET2* no mutado. La relación entre el cariotipo alterado y una secuencia normal del gen *TET2* ha sido descrita como un factor de peor pronóstico en pacientes con LMMC (17,29), sugiriendo que la alteración del patrón de metilación del DNA podría jugar un papel importante en el desarrollo y pronóstico de estos pacientes con LMMC.

Aunque estudios recientes han demostrado que el silenciamiento de la proteína TET2 induce un descenso en el contenido del residuo 5hmC en células mieloides normales y patológicas (85,127), el contenido de los residuos 5mC y 5hmC en las regiones promotoras (regiones CpGs) de los genes con un patrón alterado de la metilación del DNA en los pacientes diagnosticados de LMMC y con presencia o no de mutaciones en el gen *TET2* no había sido analizado. Aunque mediante la técnica de análisis de los niveles de metilación del DNA que hemos utilizado, array de metilación, no podemos discriminar correctamente si la metilación del DNA observada es debido a residuos de 5mC o 5hmC (las técnicas de biología molecular que permiten analizar los niveles de metilación del DNA tras el tratamiento con bisulfito sódico no permiten esta discriminación), los resultados obtenidos nos sugerían que los genes hipermetilados en los pacientes con LMMC y el gen *TET2* mutado tendrían un alto contenido en 5mC, tal y como se esperaría debido a la ausencia de función de TET2. Existen trabajos, como el publicado en 2012 por Yamazaki y colaboradores (128), en el que muestran

significativamente este aumento de los niveles globales de 5mC en pacientes de LMMC con *TET2* mutado. Pero este aumento no lo detectaban reflejado en las regiones promotoras de los genes codificantes, sugiriendo que los cambios podrían ocurrir fuera de estas regiones promotoras. En nuestro caso observamos lo contrario de lo esperado, una mayor hipermetilación en los casos de LMMC con la presencia del gen *TET2* no mutado. Sin embargo, al analizar con más especificidad los niveles de 5mC o 5hmC en varios de los genes, observamos que el descenso de los niveles de 5hmC y el incremento de 5mC no ocurría de la misma manera en cada uno de los genes hipermetilados en la LMMC, incluso en cada una de los diferentes CpGs en un mismo gen, en estos pacientes con LMMC. Estos resultados, junto a los resultados de Yamazaki y colaboradores (127) indican por un lado que no todos los dinucleótidos localizados en el genoma humano son igualmente susceptibles a la acción de la conversión de la 5mC a 5hmC llevada a cabo por el gen *TET2*; posiblemente los CpGs más susceptibles de sufrir esta modificación estén fuera de regiones promotoras de genes codificantes como es el caso de los genes *AIM2* y *SP140* (127), sugiriendo incluso una regulación de regiones enhancer (130) o genes no codificantes en esta enfermedad. En el caso de *AIM2* y *SP140*, estudios recientes han observado una mayor metilación de CpGs relacionados con estos dos genes pero que se localizan fuera de la región promotora en los pacientes de LMMC con *TET2* mutado y que se correlacionan negativamente con su expresión (130), sugiriendo que la metilación aberrante del DNA en dinucleótidos CpG fuera de regiones promotoras puede ser un buen biomarcador en la LMMC. Otros de los genes estudiados en nuestro trabajo y que aparecen hipermetilados en los pacientes con LMMC y *TET2* mutado, los genes *ZIC1*, *WT1*, *WNK2*, *MRPL41* y *POU4F2*, han sido directamente o indirectamente relacionados con el arresto del ciclo celular, supresión de tumores o diferenciación mieloide. Esto sugiere, que en estudios futuros se deberían determinar mejor los mecanismos de regulación de estos genes, en particular los que hacen referencia a la metilación del DNA, y el papel de estos genes en la patogénesis de la LMMC.

En resumen, los estudios en relación a la metilación del DNA en la LMMC nos permiten concluir que: 1) la LMMC está asociada a un patrón epigenético aberrante en comparación con muestras control; 2) los pacientes con LMMC y mutaciones en el gen *TET2* muestran diferencias en el perfil de metilación del DNA respecto a los pacientes con *TET2* no mutado, y aunque estas diferencias sean pequeñas, separan los pacientes

con LMMC en dos grupos; 3) aunque las mutaciones en *TET2* inducen un descenso en los niveles de 5hmC, el análisis de genes específicos y CpGs demuestran un comportamiento heterogéneo en cuanto al contenido de 5mC y 5hmC, sugiriendo que la mayoría de los cambios podrían ocurrir en CpGs localizados fuera de regiones promotoras de genes codificantes, aunque estas pudiesen regular negativamente la expresión de genes codificantes importantes para el desarrollo de la enfermedad. Estos resultados junto con los recientes estudios que demuestran el papel de *TET2* en la hematopoyesis y el desarrollo de neoplasias mieloides, sugiere que los cambios epigenéticos son probablemente el mecanismo por el que la inactivación de la proteína *TET2* induce lesiones mieloides malignas y en consecuencia, las neoplasias mieloproliferativas como la LMMC.

Todos los trabajos descritos anteriormente en relación a la alteración del patrón de metilación del DNA en la LMMC (85,96,108,127,130), justifica sin ninguna duda el tratamiento recientemente aprobado para esta enfermedad con agentes desmetilantes del DNA. Incluso, es interesante comentar que se han encontrado diferencias en la respuesta a estos agentes desmetilantes del DNA, concretamente a la Decitabina (DAC) según el perfil epigenético que mostraban los pacientes con LMMC. Trabajos como el publicado por Meldi y colaboradores postulan que existen diferencias epigenéticas entre pacientes con LMMC en el momento del diagnóstico que condicionan la respuesta a Decitabina DAC (47). Genes como *STMN1*, *CACNAE1* y *MAPT* se encuentran hipermetilados en pacientes no respondedores a Decitabina mientras que pacientes respondedores presentan hipermetilados los promotores de genes como *MKNK2*, *NFATC1*, *CRKL* o *PRKCB*. Estos resultados sugieren que son necesarios estudios más robustos donde estudiemos el papel de la metilación del DNA tanto en relación a la patogénesis de esta enfermedad como en relación al pronóstico de los pacientes según el patrón de metilación del DNA.

Una vez demostrado el papel del patrón de la metilación del DNA en la patogénesis de la LMMC, decidimos estudiar el papel que esta alteración epigenética podría tener en cuanto a la evolución, la supervivencia y el riesgo de transformación de los pacientes diagnosticados con una LMMC hacia una LMA. En el trabajo mencionado anteriormente de Meldi y colaboradores (47), en el cual estudian la respuesta al tratamiento con Decitabina de una manera retrospectiva, observaron un patrón

específico de la metilación del DNA en el momento del diagnóstico del paciente con LMMC que predecían con una precisión muy buena (entre el 92% y el 100% según la serie) la respuesta a Decitabina. Este patrón se trata de 167 CpGs diferencialmente metilados, tanto hipermetilados como hipometilados, que separan perfectamente los pacientes de LMMC respondedores de los no respondedores a Decitabina, incluso desde el momento de diagnóstico (47). Estos resultados presentan gran importancia clínica debido a la posibilidad que se le ofrece al clínico de administrar un tratamiento no dirigido pero sí a su vez muy eficaz con un conocimiento a priori de que funcionaría en el paciente. Siguiendo un planteamiento similar, para nuestro objetivo de analizar si la metilación del DNA nos permitía o ayudaba en predecir la transformación a una leucemia aguda de los pacientes diagnosticados de LMMC, estudiamos las muestras de los 17 pacientes diagnosticados de LMMC de las que disponíamos de amplio seguimiento clínico. 12 de los pacientes no habían transformado y el resto (cinco) transformaron a LMA durante el transcurso de los 5 años de seguimiento desde su diagnóstico de LMMC. El análisis de nuestros datos mostró una huella de metilación del DNA compuesta por 4 dinucleótidos CpGs asociados a 4 genes diferentes que predecía a los pacientes con LMMC que llegarían a transformarse a una LMA o los que no transformarían, por lo menos en los 5 años de seguimiento de la enfermedad, ya en el momento de su diagnóstico de LMMC. En concreto, esta huella está compuesta por 4 dinucleótidos CpGs de los cuales 3 ellos están localizados fuera de islas CpG, dos de ellos curiosamente en región intrónica correspondiente a cada gen. Estos resultados de nuevo nos indican que a diferencia de lo que se conocía hasta hace pocos años, en los cuales los cambios de la metilación del DNA se pensaba que únicamente ocurrían en regiones promotoras con islas CpG definidas, las alteraciones importantes de la metilación del DNA en el caso de la LMMC, ocurren fuera de regiones promotoras de genes codificantes que contienen islas CpG bien definidas, tanto relacionadas con la patogénesis como con el pronóstico de esta neoplasia. En futuros estudios será muy interesante estudiar con mayor definición, si aparte de ser unos interesantes biomarcadores, estas regiones que no corresponden a regiones promotoras de genes codificantes, se asocian o bien con regiones reguladoras del genoma, como pueden ser los enhancers, o bien con regiones relacionadas con el inicio de la transcripción de genes no codificantes.

En relación a nuestra huella de metilación del DNA, en nuestro estudio hemos demostrado que la hipometilación de los 4 CpGs asociados con los genes *PSCA*, *NCF1*,

FAAH y *PDE3B* predicen de una manera muy robusta, ya desde el momento el diagnóstico de LMMC, la transformación de estos pacientes a una LMA. El análisis de nuestra huella mostró una especificidad de 0.98, y una sensibilidad de 0.9, lo que supone un AUC en las curvas ROC de valor 1, y por tanto robustez en la predicción. Al igual que el estudio anteriormente comentado de Meldi y colaboradores, los resultados de nuestro estudio sugieren que las diferencias en los niveles de metilación del DNA de unos pocos genes pueden ser 1) interesantes biomarcadores para la predicción de una transformación a leucemia aguda de los pacientes con LMMC, ya en el momento de su diagnóstico. 2) Abre la posibilidad de dirigir un tratamiento más o menos intensivo sin permitir un descontrol de la evolución natural de esta entidad y 3) modificar por tanto el pronóstico de la enfermedad y ofrecer quizás una supervivencia mayor en pacientes que antes estaban abocados a evolucionar a una LMA. Estos tres puntos son de vital importancia en la práctica clínica diaria, para la toma de decisiones del clínico y también a la hora de responder ante los pacientes.

Actualmente disponemos de varios scores pronósticos para la LMMC que están basados en datos analíticos y de citogenética tanto convencional como molecular para clasificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo (18,19), pero ninguno de ellos incluye las alteraciones epigenéticas como un factor pronóstico, salvo la reciente inclusión del análisis de la mutaciones en el gen *ASXL1* como factor pronóstico independiente (70,131). Estos scores clasifican a los pacientes en función de una supervivencia teórica, pero el tratamiento de los pacientes no se modifica en función del grupo de riesgo que se le atribuye a cada uno de los pacientes, lo que sigue limitando muchísimo la actuación adecuada de los clínicos. Clásicamente, los biomarcadores se han considerado cambios en el material hereditario que somos capaces de detectar mediante técnicas analíticas en los individuos afectos. Con la aparición y perfeccionamiento de las técnicas de biología molecular se consiguieron encontrar marcadores moleculares asociados con alteraciones en la secuencia de DNA, como pueden ser mutaciones puntuales, deleciones, o inserciones. A diferencia de este tipo de biomarcadores, los marcadores relacionados con alteraciones en los mecanismos epigenéticos no han tenido demasiada repercusión en los estudios clínicos relacionados con los tumores humanos. En este sentido, en nuestro estudio proponemos una huella epigenética biomarcador predictor de la evolución y transformación a LMA de los pacientes con LMMC ya en el momento de su diagnóstico.

Es decir, con esta huella trataríamos de conseguir una información al diagnóstico de la LMMC que permitiese, con las armas terapéuticas disponibles, cambiar el curso, hasta ahora natural, de una enfermedad. Una evolución rápida de la LMMC hacia la LMA tiene, hoy por hoy, un pronóstico infausto. Los resultados de nuestro estudio junto a los obtenidos por otros estudios en cuanto a la posibilidad de terapias dirigidas (25,47,51,132), permitiría controlar síntomas derivados de la progresión, mejoraría la calidad de vida de los pacientes y probablemente se prolongarían los tiempos de supervivencia global de los pacientes con LMMC.

En cuanto a la aplicabilidad de nuestra huella basada en la metilación del DNA, aunque el resultado era muy positivo, éramos conscientes que la aplicabilidad en la rutina clínica diaria podría ser complicada. El análisis de los niveles de metilación del DNA mediante la utilización de arrays de metilación, es muy robusta, pero hasta la fecha, es una técnica poco accesible a los laboratorios convencionales y a una rutina diagnóstica asistencial, por lo que, a pesar del prometedor resultado, no nos permitiría una aplicación fácil a la práctica clínica. Esto nos condujo a pensar en validar nuestra huella basada en la metilación del DNA mediante alguna estrategia o aproximación de laboratorio más accesible y que nos permitiera el estudio de este patrón de metilación del DNA en cualquier laboratorio de una manera fácil y coste efectivo para poder generalizar de esta manera su aplicabilidad. Gracias a técnicas de secuenciación y cuantificación, como es la pirosecuenciación tras la modificación del DNA con bisulfito sódico, confirmamos la hipometilación significativa en 4 de los 8 CpGs en las muestras de los pacientes con LMMC que transformaron a una leucemia aguda, mientras que los pacientes que no transformaron mostraban en este análisis un hipermetilación parcial en estos mismos 4CpG. Esta técnica de pirosecuenciación, de la forma que la diseñamos, es una técnica fácil de realizar, fácil de identificar y cuantificar los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de metilación del DNA en los CpGs de interés, barata y rápida. Estos resultados nos permiten concluir que la estrategia diseñada del análisis de los niveles de metilación del DNA en 4 CpGs específicos mediante pirosecuenciación, nos permite predecir con una gran especificidad y sensibilidad los pacientes diagnosticados de LMMC que transformarán a una leucemia aguda en el curso de la evolución de la enfermedad, y además mediante una técnica fácil, rápida y con un coste relativamente bajo, pudiendo ser una estrategia para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con LMMC de fácil implementación en la rutina diaria de cualquier hospital o laboratorio de análisis molecular.

Para la implementación de este análisis de la metilación del DNA, es necesario su validación en series independientes de pacientes con LMMC. En este sentido, aunque el análisis de la primera serie de pacientes con LMMC nos ha permitido establecer una huella epigenética formada por 4 CpGs específicos como predictor de la transformación a una leucemia aguda, uno de los problemas que hemos tenido en este estudio es que estos resultados no los hemos podido validar en posteriores series que hemos incluido en el estudio. La LMMC es una enfermedad que sin ningún tipo de tratamiento evoluciona irremediablemente hacia la malignización y transformación a LMA. Bien es verdad, que muchos de los pacientes con LMMC presentan un comportamiento más estable y evolución más larvada, estando periodos largos de tiempo sin precisar de ningún tratamiento. Seguimientos amplios de los pacientes como los presentados en la primera serie de pacientes con LMMC de nuestro estudio, nos permiten catalogar mucho más fielmente el comportamiento de los mismos. A diferencia de la primera serie de LMMC que estudiamos, el problema con el que nos hemos encontramos en las siguientes series fue que el seguimiento de estos pacientes no era suficiente y tan prolongada como en la primera. En concreto, en la segunda serie el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la última visita del paciente a consulta era de menos de 1 año, lo que no permitía seleccionar a estos pacientes como de crónicos. En este sentido, con esta segunda serie contamos con unas muestras de pacientes de reciente diagnóstico pero con un seguimiento muy escaso que no nos permitía asegurar que los pacientes catalogados como no transformados, realmente lo fueran. Prácticamente lo mismo nos ocurrió con la tercera serie de pacientes con LMMC incluida en el estudio. Con esta tercera serie a pesar de tener un seguimiento más amplio, por encima de 2 años pero menor de 4 años, nos encontramos con el handicap del número reducido de pacientes incluidos en la serie y en el que pudimos asumir su posible idoneidad únicamente por la proporción entre los pacientes crónicos y los transformados a LMA (8 pacientes en fase crónica y 3 transformados precozmente). Pero en el análisis de los niveles de metilación del DNA no se observaron diferencias significativas. No obstante, la tendencia de comportamiento del CpG localizado en el gen *FAAH* presentaba la misma tendencia a los resultados obtenidos en la primera serie. Estos resultados enmascaran en cierta medida los resultados en nuestra opinión interesantes en relación de la huella de metilación del DNA con la predicción de la transformación de los pacientes con LMMC pero creemos que esto mejoraría significativamente con el estudio de nuevas series de

pacientes con LMMC bien caracterizados durante al menos 5 años desde el momento de su diagnóstico.

La validación de nuestra huella basada en la metilación del DNA y su hipotética inclusión en los scores de predicción actuales, posibilitaría adecuar la intensidad de tratamiento en función de los resultados de estos scores. Esperar a que la LMMC evolucione es un hecho que empeora a priori los resultados de la terapia, ya que nos encontramos con datos ampliamente descritos como desfavorables, como la leucocitosis, aumento del porcentaje de blastos o la dependencia transfusional. Evitar esta evolución y tratar de manera dirigida y precoz a estos pacientes aportaría una mayor supervivencia de los mismos. La elección de la terapia, en ausencia de otras dianas terapéuticas, parece que va encaminada a la terapia epigenética, que ofrece mejores resultados (respuestas de hasta el 40%). Por tanto, en nuestra opinión, los resultados obtenidos en relación a la huella epigenética son de gran interés y es necesario continuar en su estudio para que realmente podamos estratificar mucho mejor ya desde el momento del diagnóstico a los pacientes con LMMC e incluso poder tener la posibilidad de nuevos tratamientos, en concreto los epigenéticos, para obtener mejores respuestas y una mejor calidad de vida de estos pacientes con LMMC.

6. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con LMMC presentan un patrón de la metilación del DNA específico sugiriendo que la alteración de este mecanismo epigenético podría jugar un papel importante en el desarrollo y transformación de esta neoplasia hematológica.
2. Los genes diferencialmente metilados en la LMMC están enriquecidos en las vías de PLC, JNK y ERK indicando que la metilación del DNA participa en la regulación de procesos importantes de la biología en la LMMC.
3. Entre los pacientes con LMMC se observan dos grupos según el patrón de metilación del DNA, sugiriendo que esto podría deberse a posibles diferencias tanto en el cariotipo como en las mutaciones en genes que regulan el mecanismo epigenético de la metilación del DNA.
4. Las mutaciones en los genes *JAK2*, *EZH2*, *IDH1* e *IDH2* no muestran relación con ningún patrón de metilación del DNA observado en la LMMC.
5. Los pacientes con LMMC muestran patrones de metilación del DNA diferentes en función de la presencia de mutaciones de *TET2*. En contra de lo esperado, los pacientes de LMMC que no tienen mutaciones en el gen *TET2*, presentan un número mayor de genes hipermetilados, pudiendo ser su causa la asociación de estos casos con cariotipos complejos.
6. Aunque la mutación en *TET2* induce la disminución en los niveles de 5hmC en el genoma, ese efecto es heterogéneo entre los diferentes genes e incluso entre los dinucleótidos CpGs de un mismo gen.
7. La metilación del DNA como biomarcador puede tener un valor muy importante para la predicción de la transformación a leucemia aguda en el momento del diagnóstico de una LMMC.
8. La metilación de 4 dinucleótidos CpGs mediante pirosecuenciación podría constituir una herramienta predictiva de la transformación a LMA en pacientes con LMMC al diagnóstico.

7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009 Sep 1;115(17):3842-3847.
- (2) DeAngelo DJ, Stone RM. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *HEMATOLOGY: Basic Principles and Practice*. 5ªed.: Churchill Livingstone Elsevier;2009.p.1051.
- (3) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, et al. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2012 Aug;26(8):1879-1881.
- (4) Sans-sabrafen J., Besses Raebel C, Vives Corrons JL. Chapter 13. Hematología clínica. 5ªed. Elsevier España;2006.
- (5) Courville EL, Wu Y, Kourda J, Roth CG, Brockmann J, Muzikansky A, et al. Clinicopathologic analysis of acute myeloid leukemia arising from chronic myelomonocytic leukemia. *Mod Pathol* 2013 Jun;26(6):751-61..
- (6) Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leul.* 2016 Nov;16(11):607-609.
- (7) Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clin Cancer Res* 2010 Apr 15;16(8):2246-2256.
- (8) VV.AA. WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS OF HAEMATOPOIETIC AND LYMPHOID TISSUES. Myelodysplastic/Myeloproliferative syndromes. International agency for research 2008.
- (9) Woesnner, Florence. Síndromes mielodisplásicos. Síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos. Estudio morfológico de la mielodisplasia. Anemias diseritropoyéticas congénitas.Elsevier España 2006:285.

- (10) Orazi A, Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 2008 Jul;22(7):1308-1319.
- (11) Orazi A, Chiu R, O'Malley DP, Czader M, Allen SL, An C, et al. Chronic myelomonocytic leukemia: The role of bone marrow biopsy immunohistology. *Mod Pathol* 2006 Dec;19(12):1536-1545.
- (12) Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007 Jun;92(6):744-752.
- (13) Kanagal-Shamanna R, Bueso-Ramos CE, Barkoh B, Lu G, Wang S, Garcia-Manero G, et al. Myeloid neoplasms with isolated isochromosome 17q represent a clinicopathologic entity associated with myelodysplastic/myeloproliferative features, a high risk of leukemic transformation, and wild-type TP53. *Cancer* 2012 Jun 1;118(11):2879-2888.
- (14) Solal-Celigny P, Desaint B, Herrera A, Chastang C, Amar M, Vroclans M, et al. Chronic myelomonocytic leukemia according to FAB classification: analysis of 35 cases. *Blood* 1984 Mar;63(3):634-638.
- (15) Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol* 2005 Nov;124(5):799-806.
- (16) Parikh SA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2012 Jun;87(6):610-619.
- (17) Morel P, Hebbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, et al. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia* 1993 Sep;7(9):1315-1323.

- (18) Such E, Cervera J, Costa D, Sole F, Vallespi T, Luno E, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2011 Mar;96(3):375-383.
- (19) Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013 Apr 11;121(15):3005-3015.
- (20) Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 2002 Feb 1;99(3):840-849.
- (21) Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 Jul 30;114(5):937-951.
- (22) Kantarjian HM, Kurzrock R, Talpaz M. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990 Apr;4(2):389-404.
- (23) Tefferi A, Hoagland HC, Therneau TM, Pierre RV. Chronic myelomonocytic leukemia: natural history and prognostic determinants. *Mayo Clin Proc* 1989 Oct;64(10):1246-1254.
- (24) Zang DY, Deeg HJ, Gooley T, Anderson JE, Anasetti C, Sanders J, et al. Treatment of chronic myelomonocytic leukaemia by allogeneic marrow transplantation. *Br J Haematol* 2000 Jul;110(1):217-222.
- (25) Fenaux P, Ades L. Review of azacitidine trials in Intermediate-2-and High-risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2009 Dec;33 Suppl 2:S7-11.
- (26) Tendas A, Cupelli L, Siniscalchi A, Scaramucci L, Giovannini M, Dentamaro T, et al. Azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia: an effective and manageable approach. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014 Feb 16;6(1):e2014020.

- (27) Greco M, Criscuolo M, Fianchi L, Fabiani E, Pagano L, Voso M. 5-Azacytidine in Chronic Myelomonocytic Leukemia: Case Report and Review of Literature. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3(1):e2011011.
- (28) Costa R, Abdulhaq H, Haq B, Shaddock RK, Latsko J, Zenati M, et al. Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* 2011 Jun 15;117(12):2690-2696.
- (29) Cazzola M, Malcovati L, Invernizzi R. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:264-272.
- (30) Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, et al. 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. *J Clin Oncol* 2010 Aug 20;28(24):3858-3865.
- (31) Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2013 Jul 1;31(19):2428-2436.
- (32) Aribi A, Borthakur G, Ravandi F, Shan J, Davisson J, Cortes J, et al. Activity of decitabine, a hypomethylating agent, in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* 2007 Feb 15;109(4):713-717.
- (33) Wattel E, Guerci A, Hecquet B, Economopoulos T, Copplestone A, Mahe B, et al. A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Francais des Myelodysplasies and European CMML Group. *Blood* 1996 Oct 1;88(7):2480-2487.
- (34) Beran M, Estey E, O'Brien SM, Giles FJ, Koller CA, Kornblau S, et al. Results of topotecan single-agent therapy in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998 Nov;31(5-6):521-531.
- (35) Gerhartz HH, Marcus R, Delmer A, Zwierzina H, Suciú S, Dardenne M, et al. 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* 1994 Jan;8(1):16-23.

(36) Beran M. Chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Treat Res* 2008;142:107-132.

(37) Beran M, Estey E, O'Brien S, Cortes J, Koller CA, Giles FJ, et al. Topotecan and cytarabine is an active combination regimen in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1999 Sep;17(9):2819-2830.

(38) Vey N, Kantarjian H, Beran M, O'Brien S, Cortes J, Koller C, et al. Combination of topotecan with cytarabine or etoposide in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized phase I/II study. *Invest New Drugs* 1999;17(1):89-95.

(39) Edlin R, Connock M, Tubeuf S, Round J, Fry-Smith A, Hyde C, et al. Azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome, chronic myelomonocytic leukaemia and acute myeloid leukaemia. *Health Technol Assess* 2010 May;14 Suppl 1:69-74.

(40) Garcia-Manero G, Gore SD, Cogle C, Ward R, Shi T, Macbeth KJ, et al. Phase I study of oral azacitidine in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011 Jun 20;29(18):2521-2527.

(41) Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaria C, Caballero-Velazquez T, Blanco B, Herrero-Sanchez C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood* 2010 Jan 7;115(1):107-121.

(42) Stubig T, Badbaran A, Luetkens T, Hildebrandt Y, Atanackovic D, Binder TM, et al. 5-azacytidine promotes an inhibitory T-cell phenotype and impairs immune mediated antileukemic activity. *Mediators Inflamm* 2014;2014:418292.

(43) Beguin Y, Selleslag D, Meers S, Graux C, Bries G, Deeren D, et al. Safety and efficacy of azacitidine in Belgian patients with high-risk myelodysplastic syndromes, acute myeloid leukaemia, or chronic myelomonocytic leukaemia: results of a real-life, non-interventional post-marketing survey. *Acta Clin Belg* 2015 Feb;70(1):34-43.

- (44) Pleyer L, Germing U, Sperr WR, Linkesch W, Burgstaller S, Stauder R, et al. Azacitidine in CMML: matched-pair analyses of daily-life patients reveal modest effects on clinical course and survival. *Leuk Res* 2014 Apr;38(4):475-483.
- (45) Ades L, Sekeres MA, Wolffromm A, Teichman ML, Tiu RV, Itzykson R, et al. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. *Leuk Res* 2013 Jun;37(6):609-613.
- (46) Oki Y, Jelinek J, Shen L, Kantarjian HM, Issa JP. Induction of hypomethylation and molecular response after decitabine therapy in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2008 Feb 15;111(4):2382-2384.
- (47) Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol JB, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest* 2015 May;125(5):1857-1872.
- (48) Patnaik MM, Wassie EA, Padron E, Onida F, Itzykson R, Lasho TL, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in younger patients: molecular and cytogenetic predictors of survival and treatment outcome. *Blood Cancer J* 2015 Feb 13;5:e280.
- (49) Kosmider O, Chapuis N, Kaltenbach S, Coriat R, Boudou Rouquette P, Willems L, et al. Sustained Leukemia-Free State and Molecular Response to Sorafenib in a Patient With Chronic Myelomonocytic Leukemia in Transformation Driven by Homozygous FLT3-ITD Malignant Hematopoiesis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012 Dec 12.
- (50) Mesa RA. Imatinib and tyrosine kinase inhibition, in the management of BCR-ABL negative myeloproliferative disorders. *Biologics* 2007 Jun;1(2):129-138.
- (51) Chesnais V, Kosmider O, Damm F, Itzykson R, Bernard OA, Solary E, et al. Spliceosome mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget* 2012 Nov;3(11):1284-1293.
- (52) Eissa H, Gooley TA, Sorrow ML, Nguyen F, Scott BL, Doney K, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: relapse-free

survival is determined by karyotype and comorbidities. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011 Jun;17(6):908-915.

(53) Krishnamurthy P, Lim ZY, Nagi W, Kenyon M, Mijovic A, Ireland R, et al. Allogeneic haematopoietic SCT for chronic myelomonocytic leukaemia: a single-centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2010 Oct;45(10):1502-1507.

(54) Appelbaum FR. The role of hematopoietic cell transplantation as therapy for myelodysplasia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011 Dec;24(4):541-547.

(55) Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* 2011 Oct 6;118(14):3932-3941.

(56) Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP. Chronic myelomonocytic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia: novel pathogenetic lesions. *Semin Oncol* 2012 Feb;39(1):67-73.

(57) Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Aceto N, Remy V, Pinson S, et al. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer* 2008 Oct 16;8:299-2407-8-299.

(58) Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012 Jul;26(7):1730-1741.

(59) Tyner JW, Rutenberg-Schoenberg ML, Erickson H, Willis SG, O'Hare T, Deininger MW, et al. Functional characterization of an activating TEK mutation in acute myeloid leukemia: a cellular context-dependent activating mutation. *Leukemia* 2009 Jul;23(7):1345-1348.

(60) Bacher U, Haferlach T, Schnittger S, Kreipe H, Kroger N. Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2011 Apr;153(2):149-167.

- (61) Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, Dunbar A, Tiu R, Huh J, et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol* 2009 Dec 20;27(36):6109-6116.
- (62) Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009 Jun 11;113(24):6182-6192.
- (63) Vizmanos JL, Ormazabal C, Larrayoz MJ, Cross NC, Calasanz MJ. JAK2 V617F mutation in classic chronic myeloproliferative diseases: a report on a series of 349 patients. *Leukemia* 2006 Mar;20(3):534-535.
- (64) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009 May 28;360(22):2289-2301.
- (65) Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005 Nov 15;106(10):3377-3379.
- (66) Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C, et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* 2013 Mar 21;121(12):2186-2198.
- (67) Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gaken J, Lea NC, et al. 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* 2010 Nov 11;116(19):3923-3932.
- (68) Damm F, Itzykson R, Kosmider O, Droin N, Renneville A, Chesnais V, et al. SETBP1 mutations in 658 patients with myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and secondary acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2013 Jun;27(6):1401-1403.

- (69) Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 2009 Jul;23(7):1343-1345.
- (70) Itzykson R, Solary E. An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2013 Jul;27(7):1441-1450.
- (71) Patnaik MM, Hanson CA, Hodnefield JM, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic study of 277 patients. *Leukemia* 2012 Jan;26(1):101-105.
- (72) Kosmider O, Delabesse E, de Mas VM, Cornillet-Lefebvre P, Blanchet O, Delmer A, et al. TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Haematologica* 2011 Jul;96(7):1059-1063.
- (73) Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010 Dec 16;363(25):2424-2433.
- (74) Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica* 2010 Oct;95(10):1668-1674.
- (75) Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012 Feb;41(1):10-13.
- (76) Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007 Feb 23;128(4):683-692.
- (77) Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 Nov 20;349(21):2042-2054.
- (78) Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev* 2006 Jan;20(1):1-13.
- (79) Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1998 Jun 1;26(11):2536-2540.

- (80) Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999 Dec;10(12):1419-1432.
- (81) Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008 Mar 13;358(11):1148-1159.
- (82) Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005 Dec;2 Suppl 1:S4-11.
- (83) Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003 Apr 18;300(5618):489-492.
- (84) Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009 Jan;41(1):87-95.
- (85) Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 2010 Dec 9;468(7325):839-843.
- (86) Ko M, An J, Pastor WA, Koralov SB, Rajewsky K, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev* 2015 Jan;263(1):6-21.
- (87) Yamazaki J, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Shen L, et al. Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics* 2012 Feb;7(2):201-207.
- (88) Yamazaki J, Jelinek J, Lu Y, Cesaroni M, Madzo J, Neumann F, et al. TET2 Mutations Affect Non-CpG Island DNA Methylation at Enhancers and Transcription Factor-Binding Sites in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Cancer Res* 2015 Jul 15;75(14):2833-2843.

- (89) Tessema M, Langer F, Dingemann J, Ganser A, Kreipe H, Lehmann U. Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia* 2003 May;17(5):910-918.
- (90) Mercher T, Quivoron C, Couronne L, Bastard C, Vainchenker W, Bernard OA. TET2, a tumor suppressor in hematological disorders. *Biochim Biophys Acta* 2012 Apr;1825(2):173-177.
- (91) Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* 2009 Oct 8;114(15):3285-3291.
- (92) Li Z, Cai X, Cai CL, Wang J, Zhang W, Petersen BE, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* 2011 Oct 27;118(17):4509-4518.
- (93) Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011 Jul 12;20(1):25-38.
- (94) Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010 Jan 15;70(2):447-452.
- (95) Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010 Mar 16;17(3):225-234.
- (96) Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010 Dec 14;18(6):553-567.
- (97) Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2013 Dec;98(6):648-657.

- (98) Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009 Jun;145(6):788-800.
- (99) Ko M, An J, Pastor WA, Koralov SB, Rajewsky K, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev.* 2015 Jan;263(1):6-21.
- (100) Mughal TI, Cross NC, Padron E, Tiu RV, Savona M, Malcovati L, et al. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2015 Sep;100(9):1117-1130.
- (101) Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010 Aug;42(8):722-726.
- (102) Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008 Sep 26;321(5897):1807-1812.
- (103) Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005 Sep 15;106(6):2162-2168.
- (104) Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *BioTechniques* 2003 Jul;35(1):146-150.
- (105) Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med* 2007 Feb;7(1):85-102.
- (106) Dupont JM, Tost J, Jammes H, Gut IG. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem* 2004 Oct 1;333(1):119-127.

- (107) Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay. *Epigenomics* 2009 Oct;1(1):177-200.
- (108) Elliott MA. Chronic neutrophilic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia: WHO defined. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19(3):571-593.
- (109) Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5(10):R80.
- (110) Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3:Article3.
- (111) Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* 2003 May;5(2):73-81.
- (112) Palmer LE, Dejori M, Bolanos R, Fasulo D. Improving de novo sequence assembly using machine learning and comparative genomics for overlap correction. *BMC Bioinformatics*.2010 Jan 15;11:33.
- (113) Fernandez-Mercado M, Yip BH, Pellagatti A, Davies C, Larrayoz MJ, Kondo T, et al. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *PLoS One* 2012;7(8):e42334.
- (114) Xiao W, Hong H, Kawakami Y, Kato Y, Wu D, Yasudo H, et al. Tumor suppression by phospholipase C-beta3 via SHP-1-mediated dephosphorylation of Stat5. *Cancer Cell* 2009 Aug 4;16(2):161-171.
- (115) Xiao W, Ando T, Wang HY, Kawakami Y, Kawakami T. Lyn- and PLC-beta3-dependent regulation of SHP-1 phosphorylation controls Stat5 activity and myelomonocytic leukemia-like disease. *Blood* 2010 Dec 23;116(26):6003-6013.
- (116) Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 2007 Feb;39(2):237-242.

- (117) Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-Garcia E, et al. New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood* 2009 Mar 12;113(11):2488-2497.
- (118) Stephenson J, Akdag R, Ozbek N, Mufti GJ. Methylation status within exon 3 of the c-myc gene as a prognostic marker in myeloma and leukaemia. *Leuk Res* 1993 Mar;17(3):291-293.
- (119) Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009 Feb 5;113(6):1315-1325.
- (120) Vilas-Zornoza A, Agirre X, Martin-Palanco V, Martin-Subero JI, San Jose-Eneriz E, Garate L, et al. Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2011 Feb 28;6(2):e17012.
- (121) Milani L, Lundmark A, Kiialainen A, Nordlund J, Flaegstad T, Forestier E, et al. DNA methylation for subtype classification and prediction of treatment outcome in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010 Feb 11;115(6):1214-1225.
- (122) Shannon K, Van Etten RA. JAKing up hematopoietic proliferation. *Cancer Cell* 2005 Apr;7(4):291-293.
- (123) Puissant A, Robert G, Fenouille N, Luciano F, Cassuto JP, Raynaud S, et al. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res* 2010 Feb 1;70(3):1042-1052.
- (124) Yang SH, Wu ZZ, Chien CM, Lo YH, Wu MJ, Chang LS, et al. JNK and ERK mitogen-activated protein kinases mediate THDA-induced apoptosis in K562 cells. *Cell Biol Toxicol* 2008 Aug;24(4):291-302.

- (125) Lagadinou ED, Ziros PG, Tsopra OA, Dimas K, Kokkinou D, Thanopoulou E, et al. c-Jun N-terminal kinase activation failure is a new mechanism of anthracycline resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008 Oct;22(10):1899-1908.
- (126) Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, Haferlach C, Kern W, Cross NC, et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia* 2011 May;25(5):877-879.
- (127) Yamazaki J, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Shen L, et al. Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics* 2012 Feb;7(2):201-207.
- (128) Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010 Aug 26;466(7310):1129-1133.
- (129) Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 2011 Jul 12;20(1):11-24.
- (130) Yamazaki J, Jelinek J, Lu Y, Cesaroni M, Madzo J, Neumann F, et al. TET2 Mutations Affect Non-CpG Island DNA Methylation at Enhancers and Transcription Factor-Binding Sites in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Cancer Res* 2015 Jul 15;75(14):2833-2843.
- (131) Siitonen T, Timonen T, Juvonen E, Terava V, Kutila A, Honkanen T, et al. Valproic acid combined with 13-cis retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2007 Aug;92(8):1119-1122.
- (132) Padron E, Abdel-Wahab O. Importance of genetics in the clinical management of chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2013 Jul 1;31(19):2374-2376.

8. ANEXOS

ANEXO 1. TABLA 8. Descripción del cariotipo y presencia de mutaciones en JAK2, TET2 y EZH2 en los pacientes con LMMC: * Cariotipo de alto riesgo. **: Cariotipo riesgo intermedio. WT: secuencia wild type. ID: Indeterminado.

Muestra paciente	EZH2	JAK2	TET2	IDH1	IDH2	Cariotipo
LMMC1	WT	WT	ID	WT	WT	46,XX
LMMC2	WT	WT	5047_5050het_delCAGA 5043_5046het_delCAGA	WT	WT	46,XY
LMMC3	WT	WT	6079C>T:S1898F	WT	WT	ID
LMMC4	WT	WT	4779C>T:R1465X	WT	WT	46,XX
LMMC5	WT	WT	4284T>G:F1300V	WT	WT	46,XX
LMMC6	WT	WT	3103T>C:M906T 5826_5841het_dupGGAGGCTTACACAAAT5825_5826het_insAGGAGGTTACACAAAT	WT	WT	46,XX
LMMC7	73976C>C/A: 658F>F/L	WT	3790G>A:C1135Y 3716het_delA 3714het_delA	WT	WT	46,XY
LMMC8	WT	JAKV 617F	WT	WT	WT	46,XY
LMMC9	WT	JAKV 617F	6067C>T:P1894L 1988_1992het_delAAACA	WT	WT	46,XY
LMMC10	WT	WT	WT	WT	WT	46,XY
LMMC11	WT	WT	6330het_dupT	WT	WT	46,XY
LMMC12	WT	WT	WT	WT	WT	46,XY [22%];47,XY,+19, del(20)(q13) [78%]**
LMMC13	WT	WT	WT	WT	WT	46,XY
LMMC14	WT	WT	WT	WT	WT	45,XY,-7*
LMMC15	WT	WT	3183C>T:Q933X	WT	WT	46,XY
LMMC16	WT	WT	WT	WT	WT	46,XX,del(7)(q?), del(12)(p12) [100%]*
LMMC17	WT	JAKV 617F	WT	WT	WT	46,XY
LMMC18	WT	WT	6041het_dupT 6043het_dupT,	WT	WT	46,XY
LMMC19	WT	JAKV 617F	1396het_delA 1399het_delA	WT	WT	46,XY
LMMC20	WT	WT	WT	WT	WT	46,XY,t(17;19)(q11;p13) [100%]**
LMMC21	WT	WT	4167C>G:R1261G 3942het_delG	WT	WT	46,XY
LMMC22	WT	WT	2293het_dupT 4828het_delC 2294het_dupT 4830het_delC	WT	WT	46,XY
LMMC23	WT	WT	2954_2957het_dupAAAC 2959_2962het_dupAGAC	WT	WT	47,XY,+8,add(21)(q22) [100%]*
LMMC24	WT	WT	2654het_dupA	WT	WT	46,XY

ANEXO 2. TABLA 18: genes diferencialmente metilados entre pruebas de pacientes con LMMC y las muestras de donantes sanos. Nombre del gen; rojo: genes hipermetilados en las muestras de LMMC; Verde: genes hipometilados en las muestras de LMMC. ISLAS CpG; VERDADERA: sonda dentro de la isla CpG; FALSA: sonda fuera de la isla CpG. POLYCOMB; NO: no se trata de una diana del grupo Polycomb; SI: se trata de una diana del grupo Polycomb; UD: desconocido. CLASE PROMOTOR: HCP: Alto contenido CpG; ICP: contenido intermedio de CpG; LPC: bajo contenido de CpG; UD: desconocido (todo ello traducido del inglés). miRNA: NO: no anotado como miRNA en la secuencia génica. snoRNA; NO: no anotado como snoRNA en la secuencia génica.

UniquelD	NOMBRE GEN	ISLA CpG	CROMOSOMA	POLYCOMB	CLASE PROMOTOR	miRNAs	snoRNA
cg19378133	A2BP1	VERDADERA	16	NO	HCP	NO	NO
cg05488632	ABHD9	VERDADERA	19	NO	ICP	NO	NO
cg16853982	ACTN2	VERDADERA	1	SI	HCP	NO	NO
cg20807545	ADAMTS18	VERDADERA	16	SI	LCP	NO	NO
cg23653187	ADPN	VERDADERA	22	NO	HCP	NO	NO
cg22461835	ADRA1A	VERDADERA	8	NO	HCP	NO	NO
cg21542793	ADRA2B	VERDADERA	2	NO	HCP	NO	NO
cg10235817	ADRA2C	VERDADERA	4	NO	LCP	NO	NO
cg14826456	ADRB1	VERDADERA	10	UD	UD	NO	NO
cg15957394	AFAP	VERDADERA	4	NO	ICP	NO	NO
cg19564367	AFAP	VERDADERA	4	NO	ICP	NO	NO
cg05674199	AHCY	VERDADERA	20	NO	ICP	NO	NO
cg10636246	AIM2	FALSA	1	SI	HCP	NO	NO
cg15799267	ALOX15B	FALSA	17	NO	ICP	NO	NO
cg08321346	ANKMY1	VERDADERA	2	NO	ICP	NO	NO
cg16609957	APXL2	VERDADERA	5	SI	UD	NO	NO
cg23855989	AQP5	VERDADERA	12	SI	HCP	NO	NO
cg12111714	ATP8A2	VERDADERA	13	NO	HCP	NO	NO
cg17241310	BARHL2	VERDADERA	1	NO	HCP	NO	NO
cg10660256	BHMT	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg05890484	BHMT	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg07621046	C10orf82	VERDADERA	10	NO	ICP	NO	NO
cg09851465	C1orf87	VERDADERA	1	NO	LCP	NO	NO
cg19438514	C20orf102	VERDADERA	20	NO	UD	NO	NO
cg04972979	C20orf54	FALSA	20	NO	HCP	NO	NO
cg14178895	C6orf105	FALSA	6	NO	UD	NO	NO
cg02564523	C7orf19	VERDADERA	7	NO	UD	NO	NO
cg13064571	C8orf44	FALSA	8	NO	HCP	NO	NO
cg01126560	C9orf142	VERDADERA	9	NO	HCP	NO	NO
cg06295856	CALCA	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg14348532	CALCA	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg22183706	CALCA	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg09188980	CALCA	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg27337148	CAMK1G	FALSA	1	NO	LCP	NO	NO
cg05436231	CD164L2	VERDADERA	1	NO	ICP	NO	NO
cg13311440	CD48	FALSA	1	NO	HCP	NO	NO
cg07752420	CDKN2A	VERDADERA	9	NO	UD	NO	NO

cg21529807	CEACAM4	FALSA	19	NO	LCP	NO	NO
cg06268694	CELSR1	VERDADERA	22	NO	LCP	NO	NO
cg12991365	CHDH	VERDADERA	3	NO	HCP	NO	NO
cg23328404	ChGn	FALSA	8	NO	LCP	NO	NO
cg16142218	CHMP7	FALSA	8	NO	HCP	NO	NO
cg10978355	CKMT2	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg13152535	CLEC11A	VERDADERA	19	NO	ICP	NO	NO
cg12973651	CNFN	VERDADERA	19	SI	HCP	NO	NO
cg05157725	COL21A1	VERDADERA	6	NO	ICP	NO	NO
cg09949775	COMP	VERDADERA	19	SI	UD	NO	NO
cg24335895	COX7A1	VERDADERA	19	NO	HCP	NO	NO
cg19885761	CPLX2	VERDADERA	5	NO	LCP	NO	NO
cg03544320	CRMP1	VERDADERA	4	SI	HCP	NO	NO
cg13315147	CYP2E1	VERDADERA	10	NO	UD	NO	NO
cg27067618	CYP4F3	FALSA	19	UD	LCP	NO	NO
cg05420896	DCC	VERDADERA	18	SI	HCP	NO	NO
cg00399483	DCC	VERDADERA	18	SI	HCP	NO	NO
cg10758292	DEFA1	FALSA	8	NO	LCP	NO	NO
cg23213217	DEGS1	VERDADERA	1	NO	HCP	NO	NO
cg00619207	DENND2D	FALSA	1	NO	LCP	NO	NO
cg12335708	DPP4	VERDADERA	2	SI	UD	NO	NO
cg11832722	DSC3	VERDADERA	18	NO	HCP	NO	NO
cg21296676	EYA4	VERDADERA	6	SI	HCP	NO	NO
cg00201234	FBLN2	VERDADERA	3	NO	HCP	NO	NO
cg15543551	FGF12	VERDADERA	3	NO	ICP	NO	NO
cg23219570	FGF23	FALSA	12	NO	HCP	NO	NO
cg11254522	FGR	FALSA	1	SI	UD	NO	NO
cg03251655	FLJ10260	FALSA	17	UD	ICP	NO	NO
cg11126134	FLJ14834	VERDADERA	13	NO	ICP	NO	NO
cg25484904	FLJ21511	VERDADERA	4	NO	HCP	NO	NO
cg25500444	FLJ23514	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg09076077	FLJ33860	VERDADERA	20	NO	LCP	NO	NO
cg23418591	FLJ90166	VERDADERA	20	SI	HCP	NO	NO
cg25044651	FLJ90650	VERDADERA	5	NO	UD	NO	NO
cg24087944	GABRD	VERDADERA	1	NO	HCP	NO	NO
cg25681177	GAPDHS	VERDADERA	19	SI	HCP	NO	NO
cg03547797	GAS2	FALSA	11	UD	ICP	NO	NO
cg20279283	GATA4	VERDADERA	8	NO	HCP	NO	NO
cg01402255	GATAD2B	FALSA	1	NO	LCP	NO	NO
cg02844545	GCM2	VERDADERA	6	SI	HCP	NO	NO
cg00509616	Gcom1	VERDADERA	15	NO	HCP	NO	NO
cg14917512	GNA11	VERDADERA	19	NO	UD	NO	NO
cg18691434	GPC2	VERDADERA	7	NO	UD	NO	NO
cg02757432	GPR26	VERDADERA	10	SI	HCP	NO	NO
cg26252167	GPR6	VERDADERA	6	SI	HCP	NO	NO
cg10189695	GPR78	VERDADERA	4	NO	LCP	NO	NO
cg25148589	GRIA2	VERDADERA	4	NO	HCP	NO	NO
cg26316946	GRIK2	VERDADERA	6	NO	HCP	NO	NO
cg13749822	HHIP	VERDADERA	4	NO	HCP	NO	NO
cg10146929	HIST1H1A	VERDADERA	6	NO	LCP	NO	NO
cg06771126	HOP	FALSA	4	SI	ICP	NO	NO
cg00019495	HOP	FALSA	4	SI	ICP	NO	NO

cg26069745	HOXA2	VERDADERA	7	NO	HCP	NO	NO
cg22709192	HOXC11	VERDADERA	12	NO	HCP	NO	NO
cg19064258	HS3ST2	VERDADERA	16	NO	HCP	NO	NO
cg09486093	HSD17B4	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg27120999	HSPA2	VERDADERA	14	NO	HCP	NO	NO
cg11990309	HTR1E	VERDADERA	6	NO	HCP	NO	NO
cg23349790	IGSF21	VERDADERA	1	SI	HCP	NO	NO
cg21282997	IL18RAP	FALSA	2	NO	LCP	NO	NO
cg26105232	IL2RA	FALSA	10	NO	LCP	NO	NO
cg15433631	IRX2	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg26306976	ITGB1BP1	FALSA	2	NO	HCP	NO	NO
cg09582042	ITR	VERDADERA	13	NO	LCP	NO	NO
cg08126211	KAAG1	VERDADERA	6	NO	UD	NO	NO
cg06572160	KCNC3	VERDADERA	19	NO	LCP	NO	NO
cg01530101	KCNQ1DN	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg13234863	KIAA1944	VERDADERA	12	UD	LCP	NO	NO
cg20523861	KLHL1	VERDADERA	13	NO	UD	NO	NO
cg19774122	LAMA2	VERDADERA	6	NO	HCP	NO	NO
cg23696949	LAMC2	FALSA	1	NO	ICP	NO	NO
cg12022621	LAX1	FALSA	1	SI	HCP	NO	NO
cg12351433	LHCGR	VERDADERA	2	SI	HCP	NO	NO
cg06653796	LIME1	VERDADERA	20	NO	HCP	NO	NO
cg03665457	LOC158160	VERDADERA	10	NO	HCP	NO	NO
cg15261665	LTF	VERDADERA	3	NO	LCP	NO	NO
cg20134215	MCHR2	VERDADERA	6	NO	HCP	NO	NO
cg21517055	MGC11271	VERDADERA	19	NO	UD	NO	NO
cg21096915	MGC16291	VERDADERA	10	NO	ICP	NO	NO
cg02061229	MMP10	FALSA	11	NO	LCP	NO	NO
cg13603171	MOXD1	VERDADERA	6	NO	LCP	NO	NO
cg17959722	MRPL41	VERDADERA	9	UD	ICP	NO	NO
cg15473904	MRPL41	VERDADERA	9	NO	HCP	NO	NO
cg24840099	MSX1	VERDADERA	4	SI	HCP	NO	NO
cg26711820	MYF6	VERDADERA	12	SI	LCP	NO	NO
cg00040873	NDUFB10	VERDADERA	16	NO	HCP	NO	NO
cg13707560	NME5	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg21245372	NUP98	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg25133685	OR2W1	FALSA	6	NO	LCP	NO	NO
cg03138091	OSMR	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg14882700	OTOP1	VERDADERA	4	SI	HCP	NO	NO
cg27243140	OTOP3	VERDADERA	17	SI	HCP	NO	NO
cg15607672	OTX2	VERDADERA	14	SI	ICP	NO	NO
cg26861460	PARVG	FALSA	22	NO	LCP	NO	NO
cg19352038	PAX3	VERDADERA	2	NO	UD	NO	NO
cg12845808	PCDH12	FALSA	5	NO	ICP	NO	NO
cg20366906	PCDH8	VERDADERA	13	NO	HCP	NO	NO
cg26556719	PCDHA13	VERDADERA	5	NO	UD	NO	NO
cg06899976	PCDHB1	VERDADERA	5	NO	ICP	NO	NO
cg06327515	PCDHB14	FALSA	5	NO	LCP	NO	NO
cg11368643	PCDHB15	VERDADERA	5	NO	UD	NO	NO
cg02260587	PCDHB2	VERDADERA	5	NO	ICP	NO	NO
cg11647681	PCDHGA12	VERDADERA	5	NO	LCP	NO	NO
cg00911351	PCDHGB4	VERDADERA	5	UD	UD	NO	NO

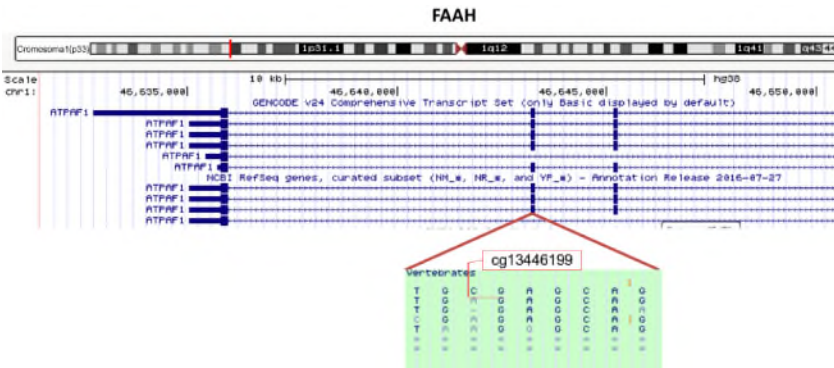
cg17861230	PDE4C	VERDADERA	19	SI	ICP	NO	NO
cg14473924	PDZRN3	VERDADERA	3	NO	HCP	NO	NO
cg20674577	PHACTR3	VERDADERA	20	SI	HCP	NO	NO
cg14056644	PITX2	VERDADERA	4	UD	HCP	NO	NO
cg24199834	POU4F2	VERDADERA	4	NO	UD	NO	NO
cg27114120	PROKR2	VERDADERA	20	NO	LCP	NO	NO
cg17788832	PSKH2	VERDADERA	8	NO	LCP	NO	NO
cg07612655	PTGIS	FALSA	20	NO	ICP	NO	NO
cg06971096	PTPRN	VERDADERA	2	NO	HCP	hsa-mir-153-1	NO
cg21935083	RAD50	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg09503974	RARRES1	VERDADERA	3	NO	HCP	NO	NO
cg13099330	RBP1	VERDADERA	3	UD	ICP	NO	NO
cg04378886	RCN3	VERDADERA	19	NO	UD	NO	NO
cg07300408	RNASE11	FALSA	14	NO	HCP	NO	NO
cg06417962	RNH1	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg15517609	RYR1	FALSA	19	NO	ICP	NO	NO
cg16421285	SAE1	VERDADERA	19	NO	HCP	NO	NO
cg26929536	SCG3	FALSA	15	NO	ICP	NO	NO
cg16954341	SCGN	VERDADERA	6	NO	LCP	NO	NO
cg21604042	SCUBE3	VERDADERA	6	SI	UD	NO	NO
cg04435420	SGCD	FALSA	5	NO	HCP	NO	NO
cg17398595	SH3GL2	VERDADERA	9	SI	HCP	NO	NO
cg21992250	SLC15A3	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg09547224	SLC5A1	VERDADERA	22	NO	HCP	NO	NO
cg10141715	SLC5A8	VERDADERA	12	NO	HCP	NO	NO
cg04005701	SMYD4	VERDADERA	17	NO	ICP	NO	NO
cg17607231	SP140	FALSA	2	UD	HCP	NO	NO
cg25802093	SPAG6	VERDADERA	10	NO	ICP	NO	NO
cg19502744	SRD5A2	VERDADERA	2	SI	HCP	NO	NO
cg02164046	SST	VERDADERA	3	NO	HCP	NO	NO
cg17586860	SSTR4	VERDADERA	20	UD	HCP	NO	NO
cg00564163	STEAP4	VERDADERA	7	SI	HCP	NO	NO
cg23326689	STMN2	VERDADERA	8	SI	LCP	NO	NO
cg04845579	SULF1	FALSA	8	NO	LCP	NO	NO
cg21053323	SUMO3	VERDADERA	21	NO	HCP	NO	NO
cg22136365	TAT	FALSA	16	NO	HCP	NO	NO
cg13282837	TCL1A	VERDADERA	14	UD	HCP	NO	NO
cg00386408	TGFBI	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg15551881	TRAF1	FALSA	9	NO	LCP	NO	NO
cg08804892	TRAK1	FALSA	3	SI	HCP	NO	NO
cg16832407	TRPM3	FALSA	9	NO	LCP	hsa-mir-204	NO
cg00186701	TSPYL5	VERDADERA	8	NO	HCP	NO	NO
cg15747595	TSPYL5	VERDADERA	8	NO	HCP	NO	NO
cg23317501	UGT3A1	FALSA	5	NO	LCP	NO	NO
cg20616414	WNK2	VERDADERA	9	NO	HCP	NO	NO
cg22533573	WT1	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg05222924	WT1	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg25782229	WT1	VERDADERA	11	NO	HCP	NO	NO
cg14456683	ZIC1	VERDADERA	3	NO	ICP	NO	NO
cg05250458	ZNF177	VERDADERA	19	NO	ICP	NO	NO
cg03355526	ZNF454	VERDADERA	5	NO	HCP	NO	NO
cg03975694	ZNF540	VERDADERA	19	NO	HCP	NO	NO

cg22341310	ZNF541	VERDADERA	19	SI	HCP	NO	NO
cg16731240	ZNF577	VERDADERA	19	NO	LCP	NO	NO
cg26209676	ZNF581	VERDADERA	19	NO	HCP	NO	NO
cg18267381	ZNF659	VERDADERA	3	NO	LCP	NO	NO
cg16708981	ZNF677	VERDADERA	19	UD	LCP	NO	NO
cg08446111	ABCC11	FALSA	16	NO	ICP	NO	NO
cg11879188	ABO	VERDADERA	9	NO	HCP	NO	NO
cg02812142	ACMSD	FALSA	2	NO	LCP	NO	NO
cg14367014	ALS2CR14	FALSA	2	NO	HCP	NO	NO
cg14123992	APOE	FALSA	19	NO	HCP	NO	NO
cg08828036	ATP10A	VERDADERA	15	NO	UD	NO	NO
cg18917378	BCAS1	FALSA	20	NO	HCP	NO	NO
cg01560871	C10orf27	FALSA	10	NO	LCP	NO	NO
cg16512727	C12orf4	FALSA	12	NO	HCP	NO	NO
cg27202708	C1orf65	VERDADERA	1	NO	HCP	NO	NO
cg22477971	C1QB	FALSA	1	NO	UD	NO	NO
cg01531431	C20orf149	VERDADERA	20	NO	HCP	NO	NO
cg12438037	C9orf116	VERDADERA	9	NO	UD	NO	NO
cg27495908	C9orf79	FALSA	9	NO	LCP	NO	NO
cg01999333	CASP14	FALSA	19	NO	LCP	NO	NO
cg14894216	CATSPER1	FALSA	11	NO	LCP	NO	NO
cg07251788	CLTCL1	VERDADERA	22	NO	HCP	NO	NO
cg00174500	CMTM5	FALSA	14	NO	UD	NO	NO
cg17412560	CSEN	FALSA	2	NO	ICP	NO	NO
cg23679724	CTSZ	FALSA	20	NO	HCP	NO	NO
cg00744433	CXADR	VERDADERA	21	NO	HCP	NO	NO
cg20727362	CYB5R3	VERDADERA	22	NO	HCP	NO	NO
cg22740835	DDR2	FALSA	1	NO	HCP	NO	NO
cg03938043	DTL	FALSA	1	NO	ICP	NO	NO
cg19682367	FAM79B	FALSA	3	NO	HCP	NO	NO
cg19954000	FGF1	FALSA	5	NO	HCP	NO	NO
cg15475323	FLJ36070	FALSA	19	UD	ICP	NO	NO
cg04329454	FLJ43752	VERDADERA	6	NO	ICP	NO	NO
cg20114394	FSTL1	VERDADERA	3	NO	HCP	NO	NO
cg12229387	GAST	FALSA	17	NO	HCP	NO	NO
cg11692021	GNB3	FALSA	12	NO	LCP	NO	NO
cg24751129	GNMT	VERDADERA	6	NO	HCP	NO	NO
cg13185177	GP5	FALSA	3	SI	HCP	NO	NO
cg07785936	GPR39	VERDADERA	2	SI	UD	NO	NO
cg13131015	GUCY2C	FALSA	12	NO	HCP	NO	NO
cg04304130	HERV-FRD	VERDADERA	6	UD	UD	NO	NO
cg09152089	IL22RA1	FALSA	1	NO	ICP	NO	NO
cg16609872	KCNQ1	VERDADERA	11	NO	LCP	NO	NO
cg15901783	KCTD12	VERDADERA	13	NO	HCP	NO	NO
cg26259865	LOC124220	FALSA	16	NO	LCP	NO	NO
cg15784615	LTBR	FALSA	12	NO	ICP	NO	NO
cg05949660	MICAL1	VERDADERA	6	NO	LCP	NO	NO
cg03905144	MPDZ	FALSA	9	NO	HCP	NO	NO
cg25167447	NAV1	VERDADERA	1	NO	HCP	hsa-mir-1231	NO
cg22580512	NCOR2	VERDADERA	12	NO	HCP	NO	NO
cg19524009	NEK3	FALSA	13	NO	UD	NO	NO
cg16825000	PLA2G2E	FALSA	1	NO	HCP	NO	NO

cg16505550	PPAP2B	FALSA	1	NO	UD	NO	NO
cg08157292	PPP1R7	FALSA	2	NO	HCP	NO	NO
cg26200585	PRX	FALSA	19	NO	LCP	NO	NO
cg18468844	PTAFR	FALSA	1	SI	HCP	NO	NO
cg16177163	PTDSS1	FALSA	8	NO	UD	NO	NO
cg21063899	SCEL	FALSA	13	NO	LCP	NO	NO
cg03387723	SCMH1	VERDADERA	1	NO	LCP	NO	NO
cg08632701	SETD4	VERDADERA	21	NO	LCP	NO	NO
cg05254747	SLC39A14	VERDADERA	8	NO	HCP	NO	NO
cg26751195	SPN	VERDADERA	16	NO	LCP	NO	NO
cg13968390	SULT1C1	FALSA	2	NO	HCP	NO	NO
cg04230060	SUSD1	VERDADERA	9	NO	HCP	NO	NO
cg12188860	TOP1MT	VERDADERA	8	NO	HCP	NO	NO
cg20625138	UTS2	FALSA	1	SI	HCP	NO	NO
cg25766774	ZDHHC3	FALSA	3	NO	HCP	NO	NO

ANEXO 3. Figura 16 resultados.

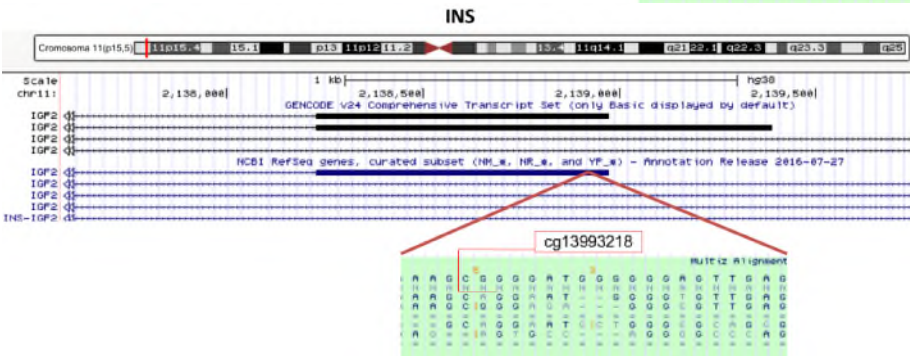
a.



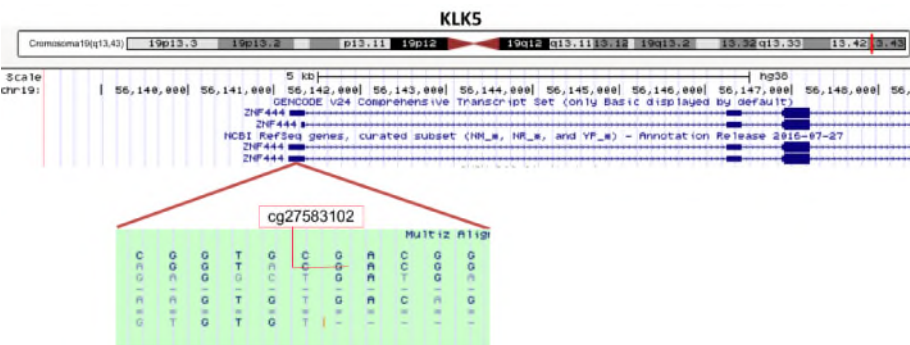
b.



c.



d.



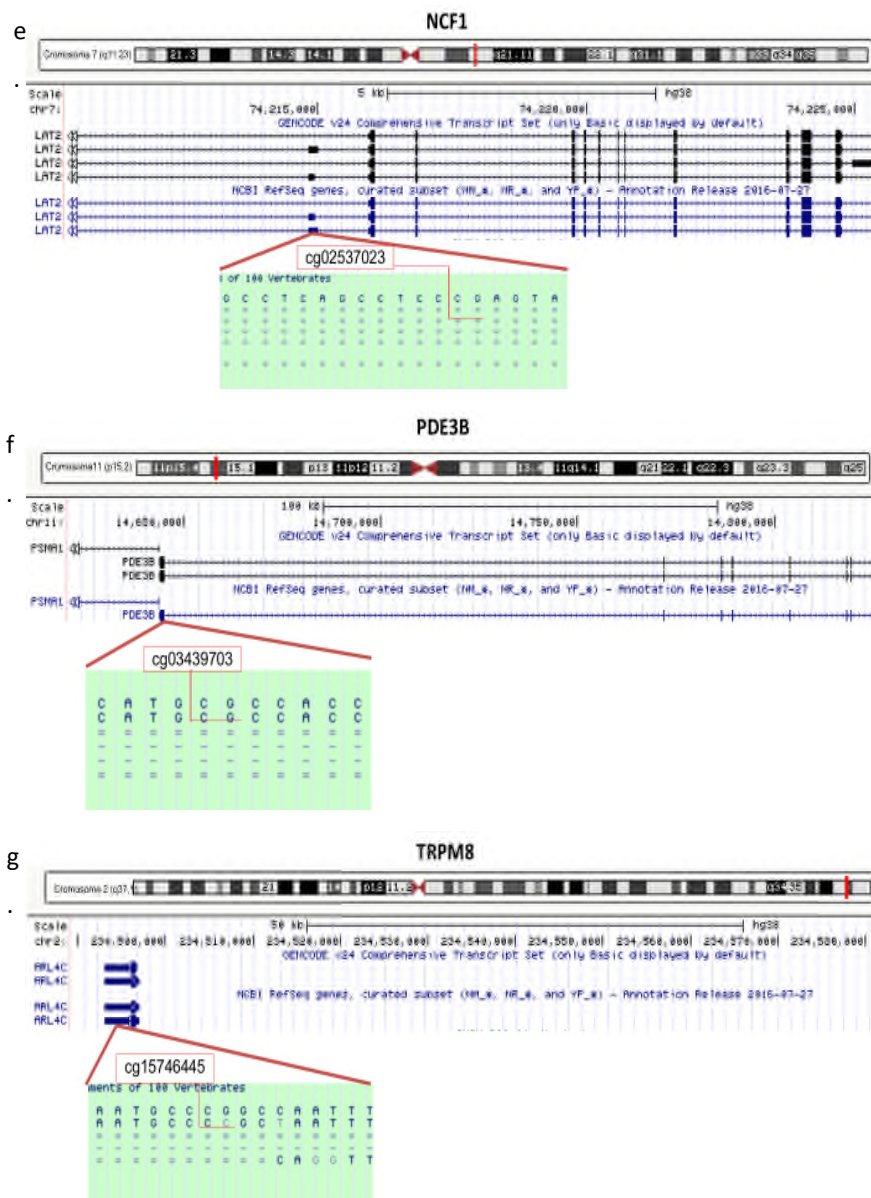
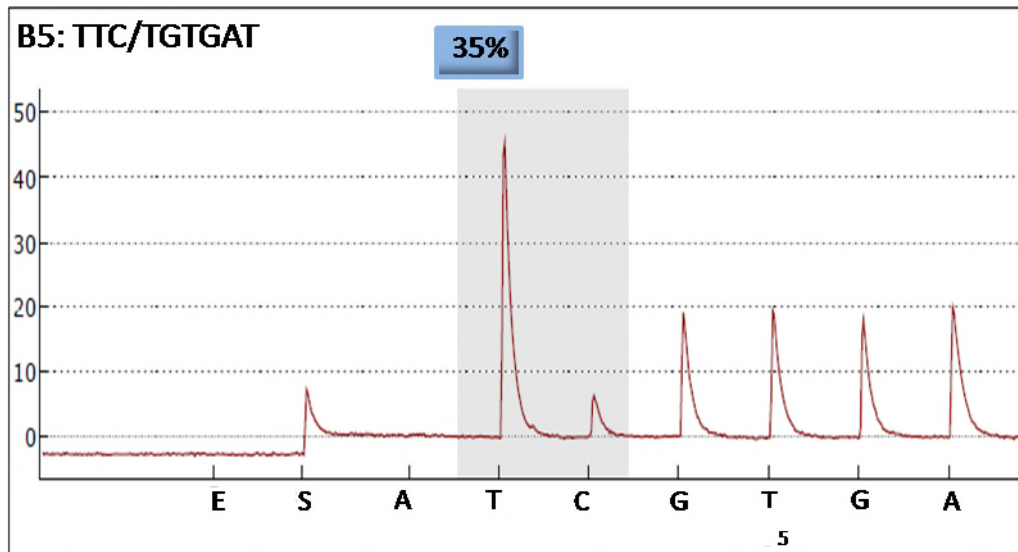


Figura 16: Esquema de la localización del resto de dinucleótidos CpG estudiados. a) La figura muestra parte del cromosoma 1 donde se localiza el gen *FAAH* y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg13446199) del gen *FAAH*. b) La figura muestra parte del cromosoma 19 donde se localiza el gen *FUT3* y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg17471102) del gen *FUT3*. c) La figura muestra parte del cromosoma 11 donde se localiza el gen *INS* y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg13993218) del gen *INS*. d) La figura muestra parte del cromosoma 19 donde se localiza el gen *KLK5* y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg27583102) del gen *KLK5*. e) La figura muestra parte del cromosoma 7 donde se localiza el gen *NCF1* y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg02537023) del gen *NCF1*. f) La figura muestra parte del cromosoma 11 donde se localiza el gen *PDE3B* y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg03439703) del gen *PDE3B*. g) La figura muestra parte del cromosoma 2 donde se localiza el gen *TRPM8* y se amplía la zona intrónica donde se encuentra localizado el dinucleótido CpG (cg15746445) del gen *TRPM8*.

ANEXO 4. Correspondiente a la **Figura 21** del apartado de resultados.

a)



b)

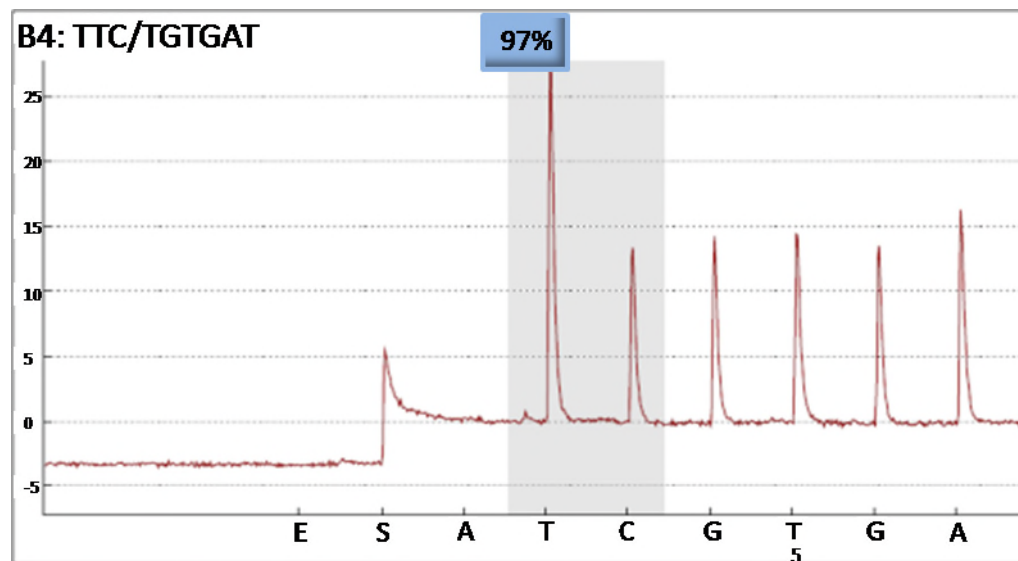


Figura 11. Representación gráfica obtenida con el software de Pirosecuenciación de Quiagen®. **a)** Pirograma correspondiente a un paciente con diagnóstico de LMMC transformado a LMA, pirosecuenciación del CpG de interés en el gen PDE3B. **b)** Pirograma correspondiente a un paciente diagnosticado de LMMC no transformado, se muestra la secuenciación del CpG del interés en el gen PDE3B. En ambas imágenes se representa, en la parte superior izquierda la posición de la muestra a estudiar y la secuencia que se espera según la secuencia original del gen tras la modificación con bisulfito, salvo por la posibilidad C/T ya que tras la modificación las Citosinas metiladas serán Timinas y las no metiladas permanecerán como Citosinas. El porcentaje resaltado en azul significa la idoneidad del estudio (código de colores por parte de la casa comercial, azul: valor muy fiable; amarillo: valor fiable; rojo: valor menos fiable). Los picos representan los haces de luz emitidos tras la acción de la luciferasa al coincidir con la secuencia predeterminada (A, T, C, G), E= enzima y S= sustrato.

Anexo 5. ../ARTICULOS/TET2CRIS