



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Aplicaciones Traslacionales en Neoplasias
Mieloides de la Secuenciación de Nueva
Generación de ARN: Nuevas Dianas
de Letalidad Sintética e Inmunoterapia**

D^a Ana María Hurtado López

2018



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Aplicaciones Traslacionales en Neoplasias Mieloides de
la Secuenciación de Nueva Generación de ARN:
Nuevas Dianas de Letalidad Sintética e Inmunoterapia

D^a Ana María Hurtado López

2018

Directores:

Dra. Vanessa Roldán Schilling

Dr. Andrés Jerez Cayuela

Gracias a todas las personas que han hecho posible este trabajo, así como mi crecimiento personal y profesional durante esta etapa.

Gracias a todos

***A mi padre,
A mi madre,
Mi equilibrio perfecto***

ÍNDICE

INDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	5
1. Síndromes mielodisplásicos, síndromes mielodisplásicos/neoplasia mieloproliferativa y leucemia aguda mieloide: estado del arte	5
1.1 Síndromes mielodisplásicos y leucemia mielomonocítica crónica	5
Epidemiología	5
Patogénesis: <i>Arquitectura citogenética y mutacional, microambiente medular, supresión de la inmunidad e inflamación</i>	5
Diagnóstico y Clasificación.....	15
Pronóstico	16
Tratamiento.....	20
1.2 Leucemia Aguda Mieloide	22
Epidemiología	22
Patogénesis: <i>Arquitectura citogenética y mutacional</i>	22
Diagnóstico y Clasificación.....	26
Pronóstico	28
Tratamiento.....	29
2. RNA-SEQ: método global de análisis del transcriptoma.....	30
2.1 Aspectos metodológicos del RNA-seq.....	31
2.2 Tipos de RNA-seq: Global o dirigido.....	34
3. LETALIDAD SINTÉTICA EN CÁNCER.....	35
3.1 Noción histórica	35
3.2 Vías de reparación de ADN	36
3.3 Aplicaciones en cáncer de la letalidad sintética	41
3.4 Letalidad sintética en neoplasias hematológicas	43
4. ANTÍGENOS TESTICULARES TUMORALES	45
4.1 ATTs en neoplasias hematológicas.....	46

4.2	ATTs como potenciales dianas terapéuticas.....	47
4.3	Combinación con hipometilantes.....	48
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
	CAPÍTULO 1	55
1.1	Introducción.....	56
1.2	Pacientes, material y métodos	56
	<i>Pacientes y variables clínicas.....</i>	56
	<i>Secuenciación de nueva generación de ARN.....</i>	57
	<i>Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR), Selección de células CD34+ y análisis por citometría de flujo.....</i>	57
	<i>Análisis de la metilación de ADN por pirosecuenciación</i>	58
	<i>Secuenciación dirigida del ADN.....</i>	58
	<i>Análisis del espliceosoma.....</i>	59
	<i>Bases de datos públicas</i>	59
	<i>Análisis estadístico.....</i>	60
1.3	Resultados.....	60
	<i>Expresión Global de los Genes de Reparación de ADN en LMMC.....</i>	60
	<i>Comparación con el transcriptoma de las vías de reparación de ADN de otras enfermedades mieloides: El estudio MILE.....</i>	61
	<i>Genes diferencialmente expresados en LMMC candidatos a dianas terapéutica: validación y comportamiento a través del espectro mieloides.....</i>	65
	<i>Expresión de PARP1, CDKN1A, BAP1, en LMMC SMD y controles en CD34+.</i>	67
	<i>La expresión diferencial de los genes de reparación de ADN en LMMC no está mediada por una metilación aberrante del promotor.....</i>	68
	<i>Mutaciones recurrentes en LMMC y su asociación con genes diferencialmente expresados en las vías de reparación de ADN.....</i>	69
	<i>Las mutaciones adquiridas en SRSF2 inducen la aparición de anomalías en el splicing en los genes de reparación de ADN en LMMC.....</i>	71
	<i>Asociaciones clínico biológicas de los genes de reparación de ADN de en LMMC....</i>	73
1.3	Discusión.....	73
1.5	Conclusiones	76
	CAPÍTULO 2	77

2.1. Introducción.....	78
2.2 Pacientes, material y métodos	78
<i>Pacientes y variables clínicas.....</i>	78
<i>Secuenciación de nueva generación de ARN dirigida</i>	80
<i>Secuenciación de nueva generación de ARN global.....</i>	82
<i>Secuenciación dirigida del ADN.....</i>	82
<i>Western Blot.....</i>	82
<i>Análisis estadístico.....</i>	83
2.3 Resultados.....	84
<i>Características de los pacientes tratados con azacitidina</i>	84
<i>Perfil de expresión de los ATTs al diagnóstico en SMD y LMMC.....</i>	85
<i>Expresión diferencial de los ATTs entre las muestras pre-tratamiento y post-tratamiento</i>	87
<i>Comportamiento individual y por grupos de respuesta de la expresión de TFDP3, DDX53 y PRAME.....</i>	92
<i>Mutaciones recurrentes somáticas y su asociación con respuesta al tratamiento y expresión de antígenos testiculares tumorales.....</i>	93
2.4 Discusión.....	94
2.5 Conclusiones	97
CONCLUSIONS.....	99
REFERENCIAS	101
SUMMARY	123
RESUMEN	127
ANEXO I	131
ANEXO II	137

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxorribonucleico
- alo-TPH:** Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
- aNHEJ:** Vía alternativa de reparación por unión de extremos no homólogos (*del inglés: Alternative non homologous end joining*)
- AR:** Anemia refractaria
- AREB:** Anemia refractaria con exceso de blastos
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- ARSA:** Anemia refractaria con sideroblastos en anillo
- ATT:** Antígeno tumoral testicular
- B.Auer:** Bastones de Auer
- BER:** Reparación por escisión de bases (*del inglés: Base excision repair*)
- cDNA:** ADN complementario
- CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad
- cNHEJ:** Vía clásica de reparación por unión de extremos no homólogos (*del inglés: Classical non homologous end joining*)
- CpG:** Regiones citosina-fosfato-guanina
- CPM:** Lecturas por millón (*del inglés: Counts per million*)
- CPSS:** Sistema pronóstico específico de la LMMC (*del inglés: CMML specific prognostic scoring system*)
- CRDM:** Citopenia refractaria con displasia multilínea
- DE:** Diferencialmente expresado
- Del:** Deleción
- DM:** Displasia multilínea
- DR:** Reparación directa (*del inglés: Direct repair*)
- DTT:** Ditiotreitól
- DU:** Displasia unilínea
- EB:** Exceso de blastos
- ELN:** *Del inglés: European LeukemiaNet*
- FAB:** Franco-Americano-Británico
- FC:** *Del inglés: Fold change*
- FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*del inglés: US Food and drug administration*)
- FISH:** Hibridación fluorescente in situ (*del inglés: Fluorescent in situ hybridation*)
- FPKM:** *Fragments per kilobase million*
- g/dL:** Gramos/ decilitro
- GEO:** *Del inglés: Gene Expression Omnibus*
- Hb:** Hemoglobina
- HR:** Recombinación homóloga (*del inglés: Homologous recombination*)
- i/inv:** Inversión

- ICL:** Reparación de entrecruzamientos intercatenarios (*del inglés: Interstrand crosslink*)
- IPSS:** Sistema pronóstico internacional (*del inglés: International prognostic scoring system*)
- IPSS-R:** Sistema pronóstico internacional revisado (*del inglés: International prognostic scoring system-revised*)
- ITD:** Duplicación interna en tándem (*del inglés: Internal tandem duplication*)
- IWG-MD:** *International Working Group for the Prognosis of MDS*
- LAP:** Leucemia aguda promielocítica
- LDH:** Lactato deshidrogenasa
- LLC:** Leucemia linfática crónica
- LLGG-T:** Leucemia de linfocitos T grandes granulares
- LMA:** Leucemia mieloide aguda
- LMA-CN:** Leucemia mieloide aguda con cariotipo normal
- LMA-CX:** Leucemia mieloide aguda con cariotipo complejo
- LMC:** Leucemia mieloide crónica
- LMMC:** Leucemia mielomonocítica crónica variante mieloproliferativa
- LMMC-MD:** Leucemia mielomonocítica crónica variante mielodisplásica
- LMMC-MP:** Leucemia mielomonocítica crónica variante mieloproliferativa
- logFC:** Logaritmo del *fold change*
- miARN:** microARN
- MM:** Mieloma múltiple
- MMEJ:** Reparación por extremos dependientes de microhomología (*del inglés: Microhomology-mediated end joining*)
- MMR:** Reparación por Mismatch (*del inglés: Mismatch repair*)
- MO:** Médula ósea
- NER:** Reparación por escisión de nucleótido (*del inglés: Nucleotide excision repair*)
- NGS:** Secuenciación de nueva generación (*del inglés: Next generation sequencing*)
- NHEJ:** Unión de extremos no homólogos (*del inglés: Non homologous end joining*)
- NMP:** Neoplasia mieloproliferativa
- NOS:** Sin diagnóstico específico (*del inglés: Not otherwise specified*)
- NR:** No respondedores
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- pb:** Pares de bases
- PCR:** *Reacción en cadena de la polimerasa* (*del inglés: Polymerase chain reaction*)
- PMN:** Células polimorfonucleares
- RC:** Respuesta completa/Remisión completa
- RIN:** Número de integridad del ARN (*del inglés: RNA integrity number*)
- RIQ:** Rango intercuartílico
- RNA-seq:** Secuenciación de ARN (*del inglés: RNA sequencing*)

- RP:** Respuesta parcial/Remision parcial
- RPKM:** Lecturas por kilobase por millón (*del inglés: Reads per kilobase per million*)
- RT-qPCR:** *Reverse transcription quantitavie polymerase chain reaction*
- SA:** Sideroblastos en anillo
- SDS:** Dodecilsulfato sódico (*del inglés: Sodium dodecyl sulfate*)
- SEER:** *Del inglés: Surveillance, Epidemiology, and End Results*
- SG:** Supervivencia global
- SMD:** Síndrome mielodisplásico
- SNP:** Polimorfismo de nucleótido único (*del inglés: Single nucleotide polymorfism*)
- SSA:** Apareamiento en cadena sencilla (*del inglés: Single strand annealing*)
- t:** Translocación
- TLS:** Síntesis de translesión (*del inglés: Translesion synthesis*)
- TMZ:** Temozolomida
- TPM:** *Transcritos por millón (del inglés: Transcript per million)*
- Tregs:** Linfocitos t reguladores
- VCM:** Volumen corpuscular medio

INTRODUCCIÓN

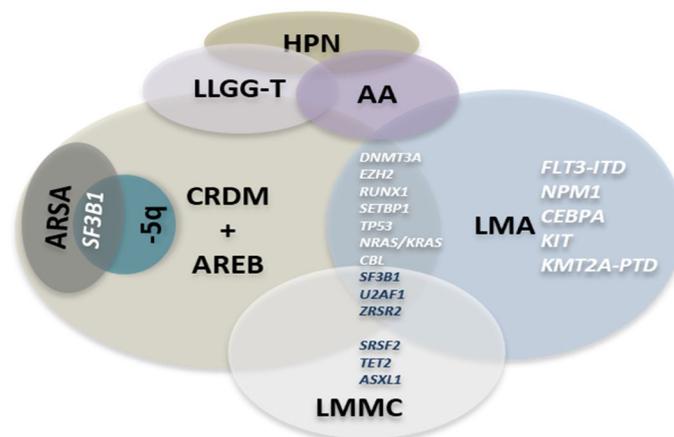
INTRODUCCIÓN

1. Síndromes mielodisplásicos, síndromes mielodisplásicos/neoplasia mieloproliferativa y leucemia aguda mieloide: estado del arte

Las neoplasias hematológicas constituyen un grupo amplio y heterogéneo de enfermedades malignas que derivan de la expansión clonal de células formadoras de los componentes sanguíneos y del sistema inmune. Ello determina, fundamentalmente, la alteración de la función de la médula ósea (MO), de la sangre y del sistema inmunológico. Una primera división, siguiendo la última revisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2016 en función del principal linaje celular que se ve afectado, nos lleva a discriminar entre neoplasias mieloides y neoplasias linfoides.^{1,2}

En la actualidad, las neoplasias mieloides las clasificamos siguiendo los criterios establecidos por la OMS en su revisión del 2016. Esta última edición representa, más que una nueva clasificación, un intento en incorporar los datos clínicos, pronósticos, morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos más relevantes que han sido descritos desde la última versión de 2008. En lo que se refiere a los datos genéticos, se ha incluido la identificación de biomarcadores específicos de entidad, determinados a partir de estudios de expresión genética y la secuenciación de nueva generación.¹ Las manifestaciones clínicas de las neoplasias mieloides no dejan de ser un reflejo de su heterogeneidad patogénica, incluyendo una constelación de síntomas y signos entre los que destacan los derivados de la gravedad de las citopenias. Tanto clínica como patogenia muestran cierto solapamiento entre buena parte de las categorías incluidas (**Figura 1.1**).

Figura 1.1: Esquema representativo el solapamiento fenotípico y genético de las neoplasias Mieloides



HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna, LLGG-T: Leucemia de linfocitos grandes granulares, AA: Anemia aplásica, ARSA: Anemia refractaria con sideroblastos en anillo, CRDM: citopenia refractaria con displasia multilinea, AREB: anemia refractaria con exceso de blastos, LMMC: leucemia mielomonocítica crónica, LMA: leucemia mieloide aguda

1.1 Síndromes mielodisplásicos y leucemia mielomonocítica crónica

Los síndromes mielodisplásicos (SMD), dentro de las neoplasias hematológicas, son un grupo muy heterogéneo de desórdenes de la célula madre hematopoyética, tanto a nivel fenotípico como genotípico. Se caracterizan por la presencia de displasia de una o más líneas mieloides con una hematopoyesis ineficaz y en muchos casos se considera un estado pre-leucémico por la alta tasa de evolución a leucemia aguda mieloide (LMA). El curso natural de la enfermedad también es muy variable, desde formas indolentes hasta rápidas transformaciones a LMA.

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) solapa características clínicas y patológicas tanto de enfermedad mieloproliferativa como mielodisplásica, por ello la OMS separó esta entidad de los SMD en su clasificación de 2001, perteneciendo actualmente a la categoría de neoplasias mieloproliferativas/mielodisplásicas. Se caracteriza por monocitosis absoluta ($>1 \times 10^9/L$) en SP con hallazgos de displasia medular, citopenias y/o hepatoesplenomegalia.

Epidemiología

Los SMD son un grupo de enfermedades propios de edades avanzadas, con una edad media al diagnóstico en torno a los 71 años y con un predominio de pacientes varones. El registro de pacientes con cáncer americano (SEER) calculó una incidencia anual entre 2011 y 2015 de nuevos diagnósticos de SMD en 20.934 casos de media por año. Sin embargo, el registro de casos sigue siendo variable entre los estados incluidos en el SEER y algunos autores han propuesto como más fiable una incidencia de entre 30.000 y 40.000 casos anuales, basándose en los registros de seguros médicos en EEUU.^{3,4}

En el caso de la LMMC, la edad mediana al diagnóstico oscila entre 71 y 74 años, con un leve predominio del género masculino (2-3:1).^{5,6} La incidencia exacta de la LMMC no se conoce, pero se estima en 4 casos por 100.000 por año.^{7,8}

Se espera que en los próximos años aumente el número de nuevos diagnósticos tanto de SMD como de LMMC debido al envejecimiento de la población y al incremento en la incidencia de casos secundarios por la mayor supervivencia que se está alcanzando los pacientes que reciben tratamiento para otros tipos de cáncer.

Patogénesis: *Arquitectura citogenética y mutacional, microambiente medular, supresión de la inmunidad e inflamación*

Hasta hace unos años, el mecanismo que subyace en la patogénesis de los SMD y la LMMC era poco conocido y, a pesar de que no se ha desvelado del todo, en la última década ha habido un gran avance en el conocimiento, procedente, en su mayoría, de la genómica y sus técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS): secuenciación del

exoma completo, el estudio de los perfiles del transcriptoma, así como de los *SNP-array* de alta resolución.

Inicialmente, se consideraba que las mutaciones en los pacientes con SMD y LMMC aparecían solamente en una minoría y casi siempre determinaban un perfil de alto riesgo. Sin embargo, con las nuevas técnicas diagnósticas y de investigación, actualmente podemos encontrar alteraciones genéticas (mutaciones y/o anomalías citogenéticas) hasta en un 90% de los pacientes.^{9,10}

Se detectan alteraciones citogenéticas hasta en un 50% de los SMD diagnosticados *de novo* y en aproximadamente un 70% en los SMD relacionados con la terapia previa.^{11,12} Sin embargo, la citogenética convencional puede resultar no-informativa (por falta de crecimiento de metafases en cultivo) en el 20% de los casos. Cuando se combinan los estudios citogenéticos y moleculares (FISH y *SNP-arrays*), la detección de aberraciones cromosómicas recurrentes alcanza a cerca del 80% de los casos, lo que permite estratificar mejor la predicción del riesgo y la precisión del diagnóstico.^{13,14} En general, la pérdida de regiones génicas como la delección del brazo largo del cromosoma 5 [del(5q)] y la delección del brazo largo del cromosoma 7 [del(7q)] son las lesiones más frecuentes, mientras que dentro de las ganancias de material cromosómico destaca la trisomía del cromosoma 8 (+8). Debido al conocimiento acumulado en cuanto al valor pronóstico estas alteraciones cromosómicas, ocupan un lugar destacado en la estratificación del riesgo dentro del IPSS.^{15,16}

La alteración cromosómica más frecuente detectada en mielodisplásicos es la del(5q), presente aproximadamente en un 15% de los casos.^{17,18} La región comúnmente delecionada contiene 40 genes, con la mayoría de ellos siendo expresados en los progenitores hematopoyéticos.¹⁹ En los casos con del(5q) aislada, el fenotipo clínico se origina como resultado de la haploinsuficiencia de los genes delecionados, dado que las mutaciones adquiridas recurrentes se han detectado en un porcentaje muy pequeño de pacientes. Así, la haploinsuficiencia del gen *RPS14* altera la activación de los ribosomas, siendo responsable, al igual que ocurre en la anemia de Shwachman-Diamond, de la anemia macrocítica y de la diseritropoyesis.²⁰ En un estudio reciente, utilizando secuenciación de nueva generación, se han encontrado mutaciones recurrentes en el gen *CSNK1A1*, localizado en la región comúnmente delecionada del 5q. Este gen codifica para una serina/treonina/kinasa y su haploinsuficiencia en modelos murinos resulta en una expansión de los progenitores hematopoyéticos que podría explicar el origen y la expansión del clon fundador en el SMD del(5q).²¹

Además, recientemente se ha demostrado que la lenalidomida, fármaco indicado para los SMD con delección del(5q) aislada induce la degradación de la proteína codificada por *CSKN1A1*, lo que provoca que la célula, ya *CSKN1A1* haploinsuficiente, no pueda tolerarlo y entre en apoptosis, lo que constituye un ejemplo de letalidad sintética.²² La

haploinsuficiencia de los microARN 145 y 146a, también localizados en la región comúnmente delecionada del brazo largo del cromosoma 5, ha mostrado ser responsables en modelos murinos de la trombocitosis y la displasia megacariocítica, a través de la activación de la señalización inmune innata y de mecanismos proinflamatorios.²³⁻²⁵

Las consecuencias patogénicas de otras alteraciones cromosómicas recurrentes en mielodisplasia no están tan claras, posiblemente porque no suelen encontrarse estas alteraciones de manera aislada como sí ocurre en el caso de la del(5q). En el caso del cromosoma 7, también la haploinsuficiencia se postula como el principal mecanismo patogénico. Presenta dos regiones comúnmente delecionadas en el brazo largo. La región que incluye la banda 7q22 tiene como principal candidato patogénico al gen *CUX1*, que ha sido descrito como un gen supresor tumoral que contribuye a la expansión clonal de las células alteradas.²⁶ También en esta banda se encuentra *MLL5*, una metiltransferasa de histonas que ha demostrado asociarse con una disfunción de los neutrófilos y una eritropoyesis anormal.²⁷ En la región comúnmente delecionada más distal destaca la presencia en la banda 7q36 de *EZH2*, un regulador de la cromatina, cuya patogenicidad se apoya, además, en presentar mutaciones adquiridas recurrentes en patología mieloide.²⁸

En el caso de la LMMC, las alteraciones citogenéticas son menos frecuentes que en SMD, estando presentes en un 20-30% de los pacientes.⁹ Las lesiones más comunes son la trisomía 8, -Y, anomalías del cromosoma 7, trisomía 21 y los cariotipos complejos.²⁹

En el 90% de los pacientes con SMD y LMMC se detecta, al menos, una mutación adquirida no sinónima en región codificante. Los genes que adquieren mutaciones son comunes a ambas entidades, aunque las frecuencias son diferentes. Así, en los pacientes con LMMC son más frecuentes las mutaciones en *TET2* (60%), *SRSF2* (50%), *ASXL1* (40%), y en los oncogenes de la vía RAS (30%).³⁰

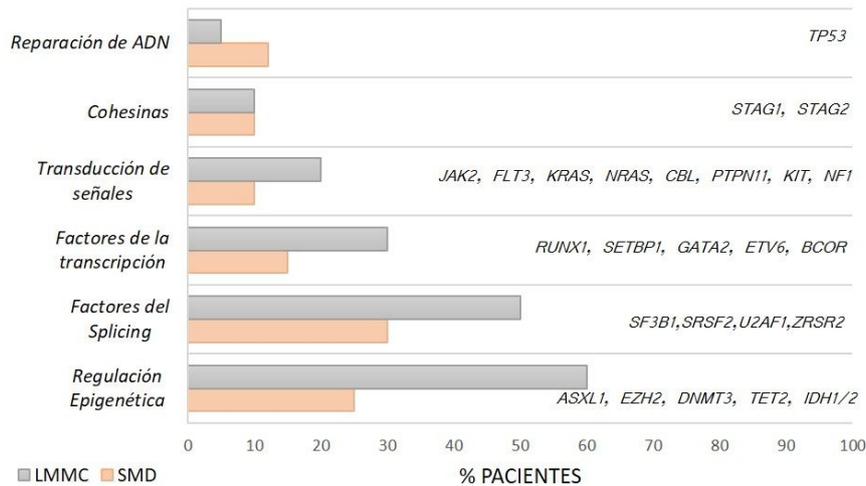
Los genes recurrentemente mutados en ambas entidades pueden organizarse en vías funcionales: factores del *splicing* (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF1*); reguladores epigenéticos (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *EZH2*), miembros del grupo de las cohesinas (*STAG2*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG1*); factores de la transcripción (*RIMX1*, *SETBP1*, *GATA2*, *ETV6*, *BCOR*); genes que participan en la transducción de señales (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL*, *JAK2*, *MPL*, *NF1*, *KIT*, *FLT3*) y *TP53* como gen multifunción con papel preponderante en la reparación del daño celular (**Figura 2**).³¹

Mutaciones en el espliceosoma

Las mutaciones más frecuentes en los SMD son aquellas que se producen en genes que codifican para proteínas clave del complejo del espliceosoma, lo que conduce a un *splicing* anómalo del ARN y, por lo tanto, a una síntesis y/o función anormal de estas proteínas. La mutación en el gen *SF3B1* es la mutación somática más frecuente en

pacientes con SMD y la primera mutación en esta vía descubierta en este tipo de pacientes.^{32,33}

Figura 1.2: Genes recurrentemente mutados en SMD y LMMC. Genes mutados recurrentemente (a la derecha) agrupados en categorías biológicas en SMD (naranja) y LMMC (gris). Las frecuencias estimadas se han extraído de Montalban-Bravo G *et al.*, *Oncotarget* 2018, Kennedy JA *et al.*, *J Clin Oncol* 2017 y Papaemmanueil E *et al.*, *Blood* 2013.^{31,34,35}



Las mutaciones en *SF3B1* son mucho más frecuentes en caso de presencia de sideroblastos en anillo, ya sean los subtipos de anemia refractaria o de displasia multilinea, donde se acumulan un 81% de los casos mutados.³³ Se ha confirmado que las mutaciones en *SF3B1* se originan ya en el compartimento de células madre hematopoyéticas, donde la maquinaria del espliceosoma alterada da lugar a una ventaja en la supervivencia del clon afectado.³⁶ Además, la mutación en *SF3B1* ha sido asociada con alteraciones en el *splicing* de un transportador intracelular del hierro, lo que ocasionaría su acúmulo en las mitocondrias.^{37,38} Sin embargo, estudios posteriores no pudieron replicar que las mutaciones en *SF3B1* fueran condición suficiente para desarrollar un SMD con sideroblastos en anillo. Las mutaciones en *SF3B1* se asocian a una menor severidad de las citopenias, mejor SG y predicen de manera independiente una supervivencia libre de enfermedad más prolongada.³³ Un modulador oral del complejo *SF3B1*, que ha mostrado eficacia en modelos murinos con xenotrasplante de neoplasia mieloide, portadora de mutaciones en el espliceosoma, se encuentran actualmente en ensayos clínicos fase II.³⁹

Las mutaciones en *SRSF2* se encuentran en el 12% de los pacientes y se asocian de manera independiente a una mayor presencia en pacientes con LMMC, donde han mostrado correlacionarse con una SG más corta y un aumento en la tasa de transformación a leucemia mieloide aguda.⁴⁰

Las mutaciones en *U2AF1* se encuentran en el 7–8% de SMD y se asociaron, en un estudio, con una menor supervivencia.^{41,42}

El cuarto gen mutado con mayor frecuencia, dentro del espliceosoma, es *ZRSR2* con un 3% de incidencia y, hasta el momento, sin asociaciones robustas con eventos clínicos.⁴³ En LMA *de novo* el más frecuente es *SF3B1* (2–3%), seguido de *U2AF1* (1–8%), *SRSF2* (1–3%) y *ZRSR2* (1%).

Mutaciones en reguladores epigenéticos

La regulación epigenética, a través de la cual las células aumentan o disminuyen la expresión génica de manera independiente de su secuencia, es un factor clave de una hematopoyesis normal. Las mutaciones en *TET2*, cuya proteína cataliza la demetilación de los sitios CpG en el ADN, es la mutación más común dentro de los genes implicados en la epigenética en patología mieloide.^{44,45}

Recientemente, un estudio demostró que el 26% de los casos que presentaban una mutación para *TET2*, presentaban una segunda mutación, lo que apoyaba la noción de que una pérdida bialélica de este gen contribuye a la patogénesis del síndrome mielodisplásico.⁴⁶ No se ha validado, hasta el momento, que *TET2* tenga un indudable valor pronóstico en mielodisplasia, pero la presencia de una mutación *TET2* (sobre todo en ausencia de una mutación concomitante en *ASXL1*) se asoció con una mejor respuesta a los inhibidores irreversibles de la metiltransferasa del ADN (azacitidina y decitabina).⁴⁷ Se detecta en un 10% de los pacientes con LMA.⁴⁴

DNMT3A es una enzima catalizadora esencial del proceso de metilación, cuya mutación inhibe el contacto adecuado entre esta enzima y los sitios CpG provocando zonas de hipometilación.⁴⁸

Las mutaciones en *DNMT3A* se detectan aproximadamente en el 8% de casos con mielodisplasia, estando presente, habitualmente, en todas las células mutadas, lo que sugiere que se trate de una mutación fundadora o *driver*.⁴⁹ Clínicamente, las mutaciones en *DNMT3A* se asocian con una supervivencia inferior y un incremento de transformación a LMA.⁵⁰ Las mutaciones en *DNMT3A* se encuentran hasta en un 25% de las LMA *de novo*.⁵¹

IDH1 e *IDH2* convierten el isocitrato en alfa-cetoglutarato en el citoplasma o en la mitocondria, respectivamente. Alfa-cetoglutarato es el principal mediador de la respiración celular y de la metilación del ADN.⁵² Las mutaciones en *IDH1/2* han sido identificadas en aproximadamente el 5% de los casos de SMD, y ensayos clínicos con enasidenib (ag-221) e ivosidenib (ag-120), inhibidores de *IDH1* e *IDH2* respectivamente, están actualmente en proceso de reclutamiento.

ASXL1 es un modificador de histonas cuyas mutaciones se detectan en un 11–14% de casos con SMD y cuya presencia se ha asociado a una peor supervivencia.⁴⁶ Wang *et*

al., mostraron, en modelos murinos, que la delección completa de *ASXL1* producía un fenotipo de SMD con niveles disminuidos de metilación en las histonas *H3K27* y *H3K4*, así como una expresión aberrante de proteínas implicadas en la apoptosis.⁵³ *EZH2* es una metiltransferasa de histonas que se encuentra mutada en el 6% de los pacientes con SMD.⁴⁶ Los pacientes con LMA mayores presentan mutaciones entre un 5–16% de los casos que se asocian con un mal pronóstico.⁵⁴

La regulación macro-epigenética también se ha sido implicada en la patogenia de los SMD al descubrirse mutaciones en el complejo de las cohesinas. Esta maquinaria es necesaria para una correcta cohesión de la cromátida hermana durante la replicación de ADN y, por lo tanto, la consecución de una adecuada mitosis. El complejo de las cohesinas también tiene un papel en estabilizar las roturas de doble cadena del ADN.⁵⁵ Las mutaciones en la subunidad *STAG2* del complejo de las cohesinas (y en mucha menor frecuencia de *STAG1*) se encuentran aproximadamente en un 7% de los casos de SMD, y se han asociado de forma independiente con una SG inferior.⁵⁶ En este último estudio también se describió como las mutaciones en las cohesinas aparecen durante el desarrollo de la enfermedad, determinando la expansión de subclones.

Factores de la transcripción y supresores tumorales

El destino final de los progenitores hematopoyéticos, como el de cualquier otra célula, esta finamente regulado por una estructura compleja que incluye factores de transcripción, supresores tumorales y muchos otros elementos de la señalización intracelular. El factor de transcripción *RUNX1* posee distintas isoformas con funciones diversas dentro de este entramado que regula el futuro de los progenitores hematopoyéticos. Estudios *ex vivo* han confirmado el efecto deletéreo dominante de la expresión de la isoforma alfa de *RUNX1* sobre el resto de isoformas y su influencia en la expansión del compartimento de progenitores alterados.⁵⁷ *RUNX1* se encuentra mutado entre el 5–9% de los pacientes con síndrome mielodisplásico.⁴⁶ *ETV6*, otro factor de la transcripción, se encuentra alterado en el 3–4% de los casos con SMD, fundamentalmente debido a una delección parcial.⁵⁸

El supresor tumoral y proteína multifuncional *TP53* es también un regulador de la transcripción con la tarea de preservar la pluripotencialidad de los progenitores hematopoyéticos mediante la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Las mutaciones en *TP53* están presentes en el 8–13 % de los pacientes con mielodisplasia, y se ha asociado con una SG y un tiempo hasta la progresión leucémica más cortos. También se ha relacionado con un mayor porcentaje de blastos, una enfermedad de riesgo mayor según el IPSS, o el IPSS-R, y con la presencia de cariotipo complejo.^{59–61} La presencia de mutaciones en *TP53* en LMA se encuentra hasta en un 70% de los pacientes que presentan cariotipo complejo⁶²

Las mutaciones en la familia de protooncogenes *RAS* son recurrentes en mielodisplasia. Estos genes codifican proteínas fundamentales en la regulación de la diferenciación y crecimiento celular. *NRAS* está mutado (provocando una ganancia de función) del 4 al 6% de los SMD mientras que las mutaciones en *KRAS* son menos frecuentes, alrededor de un 1 % de casos.⁴⁶ Las mutaciones en la vía RAS aparecen mutaciones hasta en el 25% de los casos de LMA.⁶³

SETBP1 es una proteína cuya interacción con la oncoproteína nuclear se inhibe el efecto de varios supresores tumorales y, consecuentemente, promueve la proliferación celular descontrolada.⁶⁴ Las mutaciones en *SETBP1* en SMD y LMMC suelen ocurrir junto a otras mutaciones somáticas o alteraciones citogenéticas, fundamentalmente mutaciones en *ASXL1* y deleciones del brazo largo del cromosoma 7, asociándose a una peor supervivencia y a un incremento de riesgo de transformación a leucemia.⁶⁵⁻⁶⁷

Las técnicas de secuenciación masiva y paralela han permitido un mayor conocimiento de cómo estas mutaciones aparecen y /o progresan a lo largo del curso de la enfermedad. La gran mayoría de clones fundadores se caracterizan por la presencia de alguna mutación somática, mientras que solo el 18% de los mismos poseen una anomalía citogenética.⁶⁸ La complejidad de la arquitectura clonal de los SMD ha dado lugar a que se diseñen estudios prospectivos, longitudinales, basados en el examen seriado de material hematopoyético y de secuenciación de alto rendimiento para definir la jerarquía clonal que determine un determinado fenotipo o un mayor riesgo de progresión a leucemia. El estudio pivotal en cuanto a arquitectura clonal en patología mielóide es del Walter *et al.*, que, secuenciando todo el genoma en muestras del mismo paciente al diagnóstico y tras progresión a leucemia, demostró que el 93% de todos los elementos de la MO eran clonales de manera independiente al porcentaje de blastos, y que el 100% de los pacientes presentaban en muestras previas un clon fundador (que podía portar hasta 600 mutaciones somáticas distintas). La media de clones detectados en las muestras de MO de SMD fue de 2,4, sugiriendo que, al menos uno de ellos, se desarrollaba de manera posterior al clon fundador.⁶⁹ Un estudio posterior del mismo autor mostró como los clones fundadores entre los pacientes se diferenciaban tanto en el tamaño como en el tipo de mutaciones somáticas que los definía, sugiriendo que no existe un umbral de tamaño tumoral que dé lugar a la aparición de subclones o progresión de la enfermedad.⁷⁰

Un estudio basado en el diseño de Walter, pero con un tamaño muestral mayor, validó estos hallazgos y, además, mostró como las mutaciones fundadoras eran en su mayoría las relacionadas con mutaciones en el espliceosoma.³⁵ Dos estudios prospectivos posteriores usando NGS en muestras seriadas a través del curso del SMD ha acabado por clarificar la naturaleza de la arquitectura y la evolución clonal de las mutaciones en SMD.

^{68,71}

Inflamación

Cada vez es más reconocido el papel en la patogenia de los mielodisplásicos del sistema de la inflamación e inmunidad.⁷² Las alteraciones en la producción de las citoquinas, en la MO de pacientes con mielodisplasia, contribuyen tanto a una hematopoyesis ineficaz como al escape del clon maligno a una potencial autoinmunidad. Así, la expresión de *TNF-alfa*, *TGF-beta*, *IFN-gamma*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-7*, e *IL-10* se ha mostrado alterada en muestras de pacientes con mielodisplasia.⁷³ *TNF-alfa* ha sido implicado en el incremento de las señales apoptóticas de las células madre hematopoyéticas de los pacientes con SMD, pero también en otros tipos de fallo medular adquirido.⁷⁴ *IL-10* es una citoquina inmunosupresora cuyos niveles se han mostrado elevados en los linfocitos T de SP en aquellos pacientes con SMD de alto riesgo.⁷⁵ Recientemente, un estudio incluyendo 215 pacientes con LMMC realizó un cribado global en cuanto al secretoma inflamatorio, encontrando una gran heterogeneidad de la expresión de las citoquinas a nivel plasmático y destacando, a nivel clínico, la relación entre una menor cantidad de *IL-10* y una supervivencia más corta.⁷⁶ En la última década se han identificado los componentes del nicho medular que contribuyen a esta producción alterada de citoquinas. Chen *et al.*, descubrieron que las células supresoras de estirpe mieloide estaban incrementadas en los pacientes con SMD y que era capaces de suprimir la hematopoyesis a través de *IL-10* y *TGF-beta*.⁷⁷

Por otro lado también están expandidas en la MO de pacientes con SMD y LMMC las células t reguladoras (Tregs) cuya capacidad para promover la tolerancia inmune podría ser crucial para permitir la expansión de los clones portadores de mutaciones somáticas.^{78,79} Un aumento en las señales proinflamatorias también han sido recientemente relacionado con una alteración en el destino de las células madre hematopoyéticas. Por un lado, *TLR4* esta sobre-expresado en los progenitores de SMD lo que se correlaciona y conduce a apoptosis y citopenias.⁸⁰ Por otro lado, alteraciones en otros TLR y en la quinasa inmunomoduladora *IRAK1* también se han descrito en los progenitores de SMD.⁸¹

Estudios de expresión génica

Un estudio inicial sobre perfil de expresión génica global, cuyo principal objetivo era usar estos perfiles para el diagnóstico de los SMD, mostró un decepcionante 49% de concordancia entre los perfiles de expresión génica y un diagnóstico correcto de SMD. Un 25% de las muestras de SMD fueron identificadas como propias, en cuanto a perfil génico, de leucemia aguda mieloide.⁸² Posteriormente, Pellagati *et al.*, llevaron a cabo un estudio de expresión global génica, exclusivamente en progenitores hematopoyéticos. Mostraron cómo la alteración del perfil de expresión de las vías de señalización de citocinas y apoptosis era propia de los pacientes con SMD de bajo riesgo, mientras que los pacientes con mielodisplasia de alto riesgo presentaban una expresión disminuida, fundamentalmente, de los elementos de respuesta y de control tras daño al ADN.⁸³ La sobreexpresión del

gen *NRAS* y del factor de transcripción *WT1* también ha sido comunicado en muestras de MO de pacientes con SMD, en los que una cantidad elevada de transcritos de *WT1* se correlacionaba con una progresión de la enfermedad de base.⁸⁴

Las vías de señalización cuya sobreexpresión en progenitores hematopoyéticos ha sido comunicada con mayor frecuencia son las relacionadas con el interferón, y las reportadas como infra reguladas más comúnmente son las que involucran a la señalización de la beta-catenina.⁸³

Determinados estudios de perfiles de expresión génica han intentado determinar si existe relación con el riesgo de transformación leucémica o supervivencia. La expresión disminuida de genes como *LEF1* y *CDH1*, y la elevada de genes como *WT1* se asociaron con una menor supervivencia.^{82,85} Un estudio posterior de Gerstung *et al.*, asoció el perfil transcriptómico con la presencia de determinadas mutaciones somáticas y anormalidades cromosómicas propias de los SMD. Así, se encontraron variaciones muy marcadas en el perfil de expresión génica global de los pacientes portadores de anomalías cromosómicas en el 5q y mutaciones en *DNMT3A* que fueron correlacionadas con una ausencia (en el primer caso) o exceso (en el segundo caso) de alteraciones genómicas añadidas, y por tanto de heterogeneidad patogénica.⁸⁶ Un estudio reciente, analizando el perfil de expresión génica de células de CD34+ de MO de SMD fue capaz de dividir a los pacientes en dos subgrupos con similares características genéticas y clínicas. Uno de los subgrupos, caracterizados por un incremento en la expresión génica en progenitores eritroides y megacariocíticos, se asoció con un fenotipo propio de presencia de sideroblastos en anillo y de la mutación en *SF3B1*; el segundo grupo, con un mayor porcentaje de blastos y de lesiones genómicas de alto riesgo, se caracterizó por un incremento en la expresión génica global en los progenitores hematopoyéticos y una regulación a la baja de las vías de reparación de ADN.⁸⁶

Los estudios de perfiles de expresión génica en LMMC son mucho menos frecuentes. En 2007 un estudio, utilizando *microarrays* de expresión analizó las células mononucleadas de MO en 15 pacientes de LMMC, alcanzando a distinguir un perfil génico característico de cada uno de los subtipos de la clasificación Franco–Americano–Británica (FAB).⁸⁷ Bou Samra *et al.*, determinaron la expresión génica de 93 genes, seleccionados por su relación con cáncer o con el ciclo celular, en células mononucleadas procedentes de SP de 32 pacientes con LMMC al diagnóstico. Establecieron un modelo pronóstico con la expresión de 5 genes (*TKT*, *G6PD*, *ELANE*, *PGD* y *CEACAM4*)⁸⁸

Microambiente

La MO se compone de células madre hematopoyéticas y su progenie junto a un entramado de células y moléculas que regulan la hematopoyesis bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Los componentes celulares del microambiente de la MO incluyen a osteoblastos, células endoteliales, células madre mesenquimales, monocitos y macrófagos.

Y sus interacciones con las células hematopoyéticas han demostrado ser partícipes en la patogénesis de los SMD. Por ejemplo, estudios genéticos en modelos murinos han mostrado que la manipulación del nicho osteoblástico es suficiente para promover los fenotipos de SMD y LMA. La delección de *DICER*, una endonucleasa tipo III de ARN esencial para la biogénesis de los miRNAs, en osteoblastos dio lugar al desarrollo de mielodisplasia y progresión a LMA.⁸⁹ Además de en modelos murinos de mielodisplasia, las células estromales de la MO derivadas de pacientes, han demostrado promover el comportamiento tumoral de células humanas de mielodisplasia *in vivo*. La inyección de células humanas de SMD junto a células mesenquimales aumentó considerablemente la tasa de injerto en ratones inmunocomprometidos, mientras que al inyectar solo células de SMD la tasa de injerto fue muy baja.^{90,91}

Recientemente, se ha definido un papel importante de la hipoxia y sus moléculas de señalización en la regulación del metabolismo y supervivencia de las células madre hematopoyéticas en la MO. En particular, *HIF1* está muy expresado en progenitores hematopoyéticos, donde regula su mecanismo glucolítico.⁹² Estudios en los que se inhibió la expresión de *HIF1* en células madre hematopoyéticas dio lugar a la pérdida de la quiescencia durante el ciclo celular y a una disminución en el número de progenitores hematopoyéticos al someter a la MO a condiciones de estrés, mielosupresión o envejecimiento.⁹³ En pacientes con SMD, la expresión de *HIF1* se correlaciona con una peor supervivencia y una mayor progresión de la enfermedad.⁹⁴ Y, aunque el papel funcional queda por dilucidar, el hecho de que ya existan ensayos clínicos en marcha que tengan *HIF1* como diana en los pacientes con requerimientos transfusionales derivados de la diseritropoyesis propia de los SMD, es una señal indirecta de la importancia de este mecanismo.

También se ha estudiado el transcriptoma en este contexto, con estudios que han evaluado el perfil de expresión génica de las células madres mesenquimales de MO, señalando también un incremento de la expresión de la señalización de los genes de interferón, dato que apoya la visión de que el microambiente de la MO en los SMD se caracteriza por un aumento de la inflamación y que ello podría promover el desarrollo de clones propios de mielodisplasia.⁹⁵

Estudios específicos sobre el microambiente en la LMMC han observado que células CD34+ derivadas de cordón umbilical humano co-cultivadas con células estromales de MO de pacientes con LMMC, presentaban una capacidad de formación de colonias muy disminuida junto a un sesgo a una mayor diferenciación mieloide.⁹⁶ Este mismo grupo comunicó recientemente que la secreción de múltiples citoquinas estaba reducida de manera significativa en las células estromales de LMMC frente a las células estromales de controles.⁹⁷

Diagnóstico y Clasificación

El diagnóstico de los SMD y de la LMMC se realiza en base a hallazgos del estudio de la SP y de la MO, interpretados dentro de un contexto clínico.

Los SMD se diagnostican en función de la presencia de tres características principales:

- Disminución cuantitativa (citopenias), sin otra causa identificada, de una o más de las líneas celulares de la sangre. Las citopenias se definen como: hemoglobina (Hb) <10g/dl, plaquetas <100000/ μ l, y neutrófilos <1800/ μ l.
- Evidencia citológica de displasia relevante ($\geq 10\%$ de los precursores eritroides, granulocíticos o megacariocitos) en SP y/o MO, en ausencia de otras causas de displasia. En los casos sin evidencia de displasia citológica, pero en los que existan una citopenia refractaria sin causa identificada junto a una alteración citogenética definitoria de SMD, se puede establecer el diagnóstico de presunción de SMD.
- El porcentaje de blastos debe suponer menos del 20% del total de células nucleadas de la MO y de la SP. Aquellos casos con un porcentaje mayor se considerarán LMA. Los casos en los que haya presencia de un sarcoma mielóide o determinadas alteraciones citogenéticas como la t(8;21), inv(16), o la t(15;17) serán consideradas LMA de manera independiente a que el porcentaje de blastos supere o no el 20%.

El diagnóstico de la LMMC requiere la presencia de una monocitosis persistente en SP ($\geq 1.10^9/L$ y $\geq 10\%$ del total de leucocitos), la presencia de displasia en, al menos, una línea hematopoyética y la exclusión de otras causas de monocitosis reactiva. Para el diagnóstico definitivo de LMMC se deben excluir otras neoplasias hematológicas mediante estudio citogenético y/o FISH: el reordenamiento BCR-ABL, los reordenamientos de los genes receptores de factores de crecimiento (*PDGFRA*, *PDGFRB* y *FGFR1*) y la presencia del gen de fusión *PCM1-JAK2*, si existe eosinofilia.

La clasificación revisada de la OMS de 2016 para los SMD incluye mejoras en la interpretación de los hallazgos morfológicos y evaluación de las citopenias y, además, incorpora la parte más relevante de los hallazgos genéticos que se han ido acumulando en los últimos años. La presencia de una citopenia sigue siendo una característica necesaria para el diagnóstico de un SMD. Sin embargo, debido a que en numerosos casos la línea celular que presenta una displasia morfológica significativa no siempre coincide con la citopenia específica más relevante,^{98,99} se han sustituido los términos generales de anemia refractaria (AR) o citopenia refractaria (CR) por “SMD” seguido de los modificadores oportunos: “displasia unilínea (DU) vs. multilínea (MU), presencia de sideroblastos en

anillo (SA), exceso de blastos (EB) o delección del brazo largo del cromosoma 5” (Tabla 1).

En 1976, el grupo Franco–Americano–Británico clasificó la LMMC dentro de los SMD. Posteriormente, la FAB distinguió dos subtipos de LMMC en base a la cifra de leucocitos en SP: LMMC– Mielodisplásica (LMMC–MD) y LMMC– Mieloproliferativa (LMMC–MP) con cifras de leucocitos $\leq 13 \times 10^9/L$ y $> 13 \times 10^9/L$ respectivamente.

Actualmente, el sistema de clasificación más utilizado en la práctica clínica, el de la OMS, considera la LMMC dentro de una categoría independiente que incluye, además, a la leucemia mielomonocítica juvenil, la leucemia mieloide crónica atípica, SMD/NMP con sideroblastos en anillo y trombocitosis (SMD/NMP–SA–T) y las neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas inclasificables.¹⁰⁰ Datos recientes han mostrado que se puede conseguir un pronóstico más preciso si se agrupan los casos de LMMC en tres categorías basándose en el porcentaje de blastos: LMMC–0 (<2% en SP y <5% en MO); LMMC–1 (2–4% en SP y/o 5–9% en MO); y LMMC–2 (5–19% en SP, 10–19% en MO, y/o presencia de bastones de Auer).

Pronóstico

En los pacientes con SMD y LMMC es posible que casos que compartan aspectos en común en el diagnóstico presenten un curso clínico divergente. La capacidad para predecir con precisión la evolución en el curso natural de la enfermedad de un paciente es el eje fundamental que orienta el tratamiento de los pacientes.

En la práctica clínica actual la escala más relevante para la determinación del pronóstico de los pacientes con SMD es la escala pronóstica internacional, en su versión revisada (IPSS–R) publicada en 2013.¹⁰¹ La mejora en su precisión radica en haberse generado a partir del estudio de 7012 casos con SMD en EEUU y Europa, lo que representa, con gran diferencia, la mayor serie de pacientes correctamente anotados desde el punto de vista clínico, estudiados hasta la fecha. Tan solo se incluyeron aquellos pacientes que en su evolución no hubieran recibido tratamiento modificador o curativo de la enfermedad.

El cambio más relevante de la versión revisada es la inclusión de un mayor número de categorías citogenéticas. El valor relativo proporcionado, dentro de la escala, a un porcentaje elevado de blastos en MO resulta atenuado en esta nueva versión. Sin embargo, la categoría de bajo porcentaje de blastos queda dividida en dos grupos (≤ 2 o $> 2\%$) con pronóstico distinto (Tabla 2). Cada citopenia es considerada ahora por separado, atribuyéndosele un riesgo mayor en función de su severidad.

El IPSS–R demuestra una mayor capacidad para discriminar el riesgo en los pacientes que el IPSS, un potencial predictivo mayor que se explica, en gran parte, por el hecho de inferir los datos de una cohorte 10 veces mayor que la del IPSS original. También presenta algunas limitaciones, es ligeramente más complicado de calcular y está a expensas de ser validado en función de la modalidad del tratamiento.

Tabla 1: Clasificación de las neoplasias mieloides de la OMS 2016. Adaptada de Arber et al. , Blood, 2016. ¹

Clasificación	Líneas displásicas	Citopenias	% de SA del total de elementos eritroides en la MO	Blastos en MO y SP	Citogenética por análisis convencional
SMD con displasia unilínea (SMD-DU)	1	1 ó 2	<15%/<5%**	MO <5%, SP <1%, No B.Auer	Cualquiera, a menos que cumpla criterios de SMD con deleción aislada del 5q
SMD con displasia multilínea (SMD-DM)	2 ó 3	1-3	<15%/<5%**	MO <5%, SP <1%, No B.Auer	Cualquiera, a menos que cumpla criterios de SMD con deleción aislada del 5q
SMD-SA con DU	1	1 ó 2	≥15%/≥5%**	MO <5%, SP <1%, No B.Auer	Cualquiera, a menos que cumpla criterios de SMD con deleción aislada del 5q
SMD-SA con DM	2 ó 3	1-3	≥15%/≥5%**	MO <5%, SP <1%, No B.Auer	Cualquiera, a menos que cumpla criterios de SMD con deleción aislada del 5q
SMD con deleción aislada de 5q	1-3	1-2	Cualquier %	MO <5%, SP <1%, No B.Auer	del (5q) aislada o con alguna alteración adicional, excepto -7 o del (7q)
SMD-EB-1	0-3	1-3	Cualquier %	MO 5-9% ó SP 2-4%, No B.Auer	Cualquiera
SMD-EB-2	0-3	1-3	Cualquier %	MO 10-19% ó SP 5-19% o B.Auer	Cualquiera
Con presencia de 1% de blastos en SP	1-3	1-3	Cualquier %	MO <5%, SP=1 [†] , No B.Auer	Cualquiera
Con displasia unilínea y pancitopenia	1	3	Cualquier %	MO <5%, SP <1%, No B.Auer	Cualquiera
Presencia de anormalidad citogenética definitoria de SMD	0	1-3	<15% [†]	MO <5%, SP <1%, No B.Auer	Anomalia definitoria de SMD
Citopenia refractaria de la infancia	1-3	1-3	No	MO <5%, SP <2%	Cualquiera

Las citopenias se definen como: hemoglobina (Hb) <10g/dL, plaquetas <100000/ μ L, y neutrófilos <1800/ μ L.

**Si presenta mutación en *SF3B1*

†1% de blastos en sp en al menos dos ocasiones distintas

† Casos con al menos un 15% de SA por definición tienen displasia eritroide significativa y se clasifican como SMD-RS-SLD

B.Auer: bastones de Auer, EB: exceso de blastos, DM: displasia multilínea, DU: displasia unilínea, MO: médula ósea, SA: sideroblastos en anillo, SMD: síndrome mielodisplásico SP: sangre periférica

Tabla 2: Categorías en el IPSS-R. Adaptado de Greenberg et al., Blood 2012. ¹⁵

Puntuación IPSS-R	≤1.5	>1.5-3	>3-4.5	>4.5-6	>6
Grupo de Riesgo	Muy Bajo	Bajo	Intermedio	Alto	Muy Alto

	PUNTUACIÓN						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Riesgo Citogenético**	Muy Bueno		Bueno		Intermedio	Pobre	Muy Pobre
Blastos en MO (%)	0-2		3-4.9		5-10	>10	
Hb (g/dL)	≥10		8-9.9	<8			
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	≥100	50-99	<50				
PMN (x10 ⁹ /L)	≥0.8	<0.8					

**Riesgo Citogenético	Anomalia Citogenética
Muy Bueno	-Y, del(11q) aisladas
Bueno	Normal, del(5q), del(12p) y del(20q) aisladas y anomalías dobles que incluyen del(5q)
Intermedio	del(7q), +8, +19, i(17q) aislada y cualquier otra anomalía única o doble independiente
Pobre	-7 e inv(3)/t(3q)/del(3q) aisladas, anomalías dobles que incluyen -7/del(7q) y anomalías complejas con 3 anomalías
Muy Pobre	Anomalías complejas con > 3 alteraciones

del: deleción; i: inversión; IPSS-R: sistema pronóstico internacional revisado, Hb: hemoglobina; g/dL: gramos/decilitro, MO: médula ósea, PMN: células polimorfonucleares; t: translocación

El IPSS-R sustituye a distintos modelos desarrollados durante los últimos 20 años. La incorporación en todos los centros en los que se cuida de pacientes con SMD del IPSS clásico, desde su creación en 1997, ha permitido la comparación de resultados entre diversos estudios y también motivó a distintos grupos a intentar refinar la estratificación del riesgo. Brevemente, el grupo de Pavia desarrolló una escala pronostica que incluía, entre las variables predictoras, el subtipo de la clasificación de la OMS, los requerimientos transfusionales y la presencia de alteraciones citogenéticas (WPSS) ¹⁰¹. Al igual que el IPSS, esta escala pronostica se beneficia de su sencillez y, como ventaja específica, de haber sido validado su valor pronostico considerando su cálculo durante la evolución del paciente.

El grupo de la MD-Anderson ha desarrollado dos modelos, uno específico para los pacientes de bajo riesgo según el IPSS (LR-PSS) ¹⁰² y una escala de aplicación global (MDA-CSS) ¹⁰³ a todos los pacientes, intentando solucionar las desventajas que había mostrado el IPSS, destacando la consideración de la severidad de la trombopenia.

Cada uno de estos modelos ha mostrado un comportamiento mejor en situaciones determinadas, pero ninguno alcanzó el nivel de uso global del IPSS, ni la capacidad discriminativa de su versión revisada.

Como en el caso de los SMD, también en la LMMC se han desarrollado diversos modelos pronósticos. El sistema pronóstico de la MD-Anderson específico para LMMC identificó el nivel de Hb <12g/dL, la presencia de blastos en SP, un conteo absoluto de linfocitos >2.5 x10⁹/L y ≥10% de blastos en MO como factores predictores de una menor SG (SG).¹⁰⁴

El sistema pronóstico específico para LMMC (CPSS) identificó cuatro variables con valor pronóstico tanto para la supervivencia global (SG) como para la progresión a LMA: los subtipos de la FAB y de la OMS de 2008, la presencia de dependencia transfusional de concentrados de hematíes y el riesgo citogenético.¹⁰⁵ Cada variable otorga un punto, con la excepción de la categoría de riesgo citogenético alto que concede 2 puntos; quedando definidos 4 categorías de riesgo: bajo (0 puntos), intermedio-1 (1), intermedio-2 (2-3) y alto riesgo (4-5) (Tabla 3).

Tabla 3: CPSS: Modelo pronóstico de la LMMC. Adaptado de Such et al., Blood, 2013.⁵

Puntuación CPSS	0	1	2-3	4-5
Grupo de Riesgo	Bajo	Intermedio-1	Intermedio-2	Alto

	PUNTUACIÓN		
	0	1	2
Categoría de la OMS	LMMC-1	LMMC-2	
Categoría de la FAB	LMMC-MD	LMMC-MP	
Dependencia transfusional	NO	SI	
Categoría Citogenética**	Bajo Riesgo	Riesgo Intermedio	Alto Riesgo

**Riesgo Citogenético	Anomalía Citogenética
Bajo	normal, -Y
Intermedio	otras alteraciones
Alto	+8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo

CPSS: sistema de pronóstico específico para la LMMC, FAB: clasificación Franco-Américano-Británica, LMMC: leucemia mielomonocítica crónica, MD: mielodisplasia, MP: mieloproliferativa, OMS: Organización Mundial de la Salud

El descubrimiento de mutaciones genéticas en la LMMC ha llevado al desarrollo de modelos pronósticos moleculares. Un estudio de la clínica Mayo, con 226 pacientes, analizó distintos parámetros, incluyendo las mutaciones en *ASXL1*. Los autores encontraron que, en análisis multivariante, los factores con riesgo independiente de una menor supervivencia eran una Hb<10g/dL, un conteo de plaquetas >100x10⁹/L, un conteo absoluto de monocitos >10x10⁹/L y la presencia de células inmaduras circulantes.¹⁰⁵ Las

mutaciones en *ASXL1* no tuvieron impacto ni en la supervivencia ni en la progresión a LMA.

El grupo francés de mielodisplasia sí encontró un efecto pronóstico adverso de las mutaciones en *ASXL1* en 312 pacientes con LMMC. Además, los otros factores que mostraron independencia pronóstica en el multivariante incluyeron una edad mayor de 65 años, unos leucocitos totales $<15 \times 10^9/L$, un conteo de plaquetas $<100 \times 10^9/L$ y unos niveles de Hb <10 g/dL en mujeres y <11 g/dL en varones.¹⁰⁶ El modelo francés asigna 3 puntos adversos para unos leucocitos $>15 \times 10^9/L$ y 2 puntos para cada uno de los otros factores, lo que da lugar a tres categorías de riesgo pronóstico: bajo (0-4 puntos), intermedio (5-7) y alto (8-12), con unas supervivencias medianas de 56, 27,4 y 9,2 meses respectivamente.

Tratamiento

No todos los pacientes con SMD requieren tratamiento inmediato. Los pacientes asintomáticos y de bajo riesgo pueden ser evaluados con hemogramas seriados y una actitud expectante. En otros casos, debido a la comorbilidad o fragilidad del paciente, el objetivo será ofrecer el mejor tratamiento de soporte. Este último puede incluir desde transfusiones de componentes sanguíneos al uso de factores de crecimiento o quelantes del hierro.

En el caso de que haya indicación de tratamiento específico, las guías actuales se dividen en pacientes de bajo riesgo (IPSS bajo e Intermedio 1, IPSS-R muy bajo, bajo e intermedio- $<3,5$) y en alto riesgo (IPSS intermedio 2 y alto, IPSS-R intermedio $>3,5$ alto y muy alto).

Tratamiento en bajo riesgo: La primera alteración citogenética que guía el manejo de los SMD es la presencia de una delección intersticial en el brazo largo del cromosoma 5. Recientemente, se ha demostrado como lenalidomida suprime de manera selectiva los clones portadores de esta del(5q) mediante la ubiquitinación de la *CSNK1A*.¹⁰² La indicación de lenalidomida en pacientes de bajo riesgo con del(5q) se produjo a raíz de la consecución en estos pacientes de un 67% de independencia transfusional y de un 45% de respuesta completa citogenética en un estudio multicéntrico con 148 pacientes.¹⁰⁷

En determinados casos de SMD de bajo riesgo con hipocelularidad medular, el empleo de globulina antitimocítica junto a ciclosporina ha mostrado alcanzar respuestas duraderas.¹⁰⁸ Recientemente, se ha comunicado como la ausencia de mutaciones en genes recurrentemente alterados en SMD se asoció a un mayor grado de respuesta a inmunosupresión.¹⁰⁹

Son varios los agentes en estudio que pueden alcanzar, a medio plazo, la indicación en los pacientes con mielodisplasia de bajo grado. Luspatercept y sotatercept, actuando sobre los receptores del factor de crecimiento transformante- β ($TGF-\beta$), regulan la eritropoyesis temprana y han demostrado mejorar la anemia en pacientes con SMD de bajo grado.^{111,112}

Los factores de crecimiento que actúan sobre el receptor de la trombopoyetina están siendo explorados en ensayos clínicos para determinar su posible beneficio en pacientes con bajo grado y trombopenia significativa. En 2017 se publicaron los resultados preliminares de un ensayo aleatorizado enfrentando agonistas de la trombopoyetina (eltrombopag) frente a placebo, en SMD de bajo riesgo que mantuviesen las cifras de plaquetas $<30.000 \mu\text{l}$. Se aleatorizaron 90 pacientes, alcanzándose una prometedora reducción de sangrados clínicos en el grupo tratado.¹¹³

Los estudios por los que se aprobó el uso de azacitidina y decitabina por la agencia americana de control de medicamentos (FDA) para SMD solo incluían 14 pacientes con LMMC en cada caso y, además, la tasa de respuestas específica de estos pacientes con LMMC no se comunicaron.^{110,111} Desde la publicación de esos estudios son varios los estudios fase 2 que han comunicado la evolución de los pacientes con LMMC tratados con hipometilantes. La tasa de respuesta global varía del 25 al 70%, con una supervivencia media que va desde los 12 a los 37 meses.¹¹²⁻¹¹⁴ Braun *et al.*, mostraron como la baja expresión de los genes *CJUN* y *CMIB* predecía de forma independiente una mayor SG en pacientes con LMMC tratados con hipometilantes.¹¹² Un estudio reciente en fase 1 ha mostrado una potencial eficacia y la seguridad del uso de ruxolitinib en pacientes con LMMC, lo que ha provocado que el estudio se expanda a una segunda fase.¹¹⁵ Otros inhibidores de *JAK-STAT* que están siendo investigados en LMMC en estadio preclínico incluyen monelotinib y pacritinib.¹¹⁵ Además, dada la especial sensibilidad al factor estimulante de colonias granulocito-monocito dependiente de *pSTAT5*, se están desarrollando anticuerpos monoclonales que sean capaces de modular su acción.¹¹⁵ Finalmente, tipifarnib, un inhibidor de la farnesiltransferasa, está siendo investigado en fases iniciales de ensayos clínicos en pacientes con LMMC.¹¹⁶

Al igual que en SMD, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos continúa siendo la única opción curativa en LMMC. La tasa de respuestas en estudios retrospectivos varía desde el 17 al 50%.^{117,118} En general, para pacientes jóvenes y con enfermedad de alto riesgo y sin comorbilidades, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) sigue siendo el tratamiento de elección.¹¹⁹ Con el desarrollo del acondicionamiento de intensidad reducida y fuentes de donación alternativas (haploidénticas y cordón umbilical) un mayor número de pacientes con LMMC son candidatos a alo-tph. El uso de acondicionamiento de intensidad reducida se asocia a una menor mortalidad asociada al procedimiento y a una mayor tasa de recaídas postrasplantes.¹²⁰

1.2 Leucemia Aguda Mieloide

La LMA es un proceso clonal de los precursores mieloides con una capacidad reducida de diferenciarse a elementos maduros. Como resultado, se produce una acumulación de formas inmaduras en la MO, la SP y, a veces, en otros tejidos con una disminución significativa en la producción de plaquetas, células rojas y granulocitos normales. El aumento de elementos inmaduros y la disminución de producción de células normales resulta en consecuencias sistémicas como anemia, sangrados y aumento del riesgo de infecciones.

Epidemiología

Aunque La LMA es la más común de las leucemias agudas en adultos, sigue siendo una enfermedad rara. Supone aproximadamente un 1% de las muertes por cáncer en adultos en los EEUU. La edad mediana al diagnóstico es de aproximadamente 65 años y la incidencia se incrementa con la edad. La ratio varón-mujer es aproximadamente de 5 a 3 y se ha descrito una mayor incidencia en blancos no hispanos que en otros grupos raciales y étnicos.¹²¹

La LMA se ha asociado con factores ambientales, por ejemplo, la exposición a sustancias químicas, radiación, tabaco, quimioterapia y anomalías genéticas (por ejemplo, la trisomía 21 o la anemia de Fanconi).¹²²

Patogénesis: *Arquitectura citogenética y mutacional*

A pesar de los avances en las técnicas de investigación, el proceso de leucemogénesis es complejo y todavía presenta muchos aspectos desconocidos. El inicio de la LMA parece estar originado por la transformación oncogénica de un precursor o célula madre hematopoyética que bloquea la diferenciación celular y adquiere capacidades de autorrenovación permitiéndole establecer y mantener el clon maligno.¹²³ Los precursores de los clones leucémicos experimentan eventos genéticos que tienen como consecuencia una heterogeneidad molecular y cariotípica en la población leucémica, con distintos clones coexistiendo y compitiendo en el mismo momento.¹²⁴⁻¹²⁶ Por ello, es improbable que un solo modelo de patogénesis pueda abarcar a todos los subtipos de LMA.¹²⁷

La patogenia de la LMA se asocia a anomalías cromosómicas que incluyen ganancias y/o pérdidas de partes de cromosomas, o de cromosomas enteros, además de la aparición de genes de fusión como consecuencia de determinadas translocaciones, que no se expresan en células normales. No solo aparecen anomalías cromosómicas, sino también alteraciones moleculares en forma de mutaciones puntuales y pequeñas duplicaciones o deleciones que no se detectan por la técnica de cariotipado.

Se han propuesto dos modelos de patogénesis que pretenden explicar las diferencias observadas a nivel molecular, fenotípico y clínico entre las distintas LMA, sin llegar a establecerse cuál de ellos se aproxima más a la realidad.

- 1) **La transformación a LMA ocurre en una de las etapas de maduración:** este modelo propone que cualquier célula de la jerarquía es susceptible de transformación leucémica, por lo que el fenotipo de la enfermedad es variable según que célula se haya visto implicada. La clasificación de la LMA distingue algunos subtipos según la etapa de diferenciación, lo que sustenta este modelo.
- 2) **La transformación a LMA ocurre en las células primitivas pluripotentes:** Este modelo propone que los eventos que llevan a la transformación leucémica ocurren solamente en la célula madre pluripotente primitiva, y que las diferencias fenotípicas dependen de las capacidades que adquiera la célula leucémica.

Mutaciones

La hipótesis del doble *hit* propone que el desarrollo de una LMA, es consecuencia de la asociación de al menos dos mutaciones. Esta teoría agrupa a las mutaciones en dos grupos de manera que para que se desarrolle la LMA tienen que coincidir una mutación de tipo I, que son las que confieren ventaja proliferativa (*FLT3-ITD*, *K-RAS*, *KIT*) y otra de tipo II, que altera la diferenciación celular y la apoptosis (*CEBPA*, *RUNX1*). Con los avances de la secuenciación masiva se han identificado nuevas mutaciones recurrentes en la LMA, que afectan principalmente a la regulación epigenética (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2*, *ASXL1*) y que no se incluyen en ningún grupo discreto en la teoría del doble hit.

128,129

Los genes mutados con más frecuencia en LMA son: *FLT3* (28%), *NPM1* (27%), *DNMT3A* (26%), *IDH1* or *IDH2* (20%), *NRAS* or *KRAS* (12%), *RUNX1* (10%), *TET2* (8%), *TP53* (8%) y *CEBPA* (6%). Hasta el 45% de los pacientes presentan un cariotipo normal, y la identificación de mutaciones ayuda al pronóstico y actitud terapéutica.¹³⁰ En la nueva clasificación de la OMS de 2016 se han modificado y añadido algunas categorías relacionadas con mutaciones. Se describe como entidad provisional la LMA con presencia de mutaciones en *RUNX1* y sin citogenética propia de SMD.

- **Mutaciones en *FLT3*:** *FLT3* codifica para un receptor tirosina quinasa con función en la hematopoyesis y participa en procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Se describen principalmente dos tipos de mutaciones en *FLT3*. La mutación más común en *FLT3* es una duplicación en tándem (*ITD* de sus siglas en inglés) entre los exones 14 y 15 y afecta al dominio yuxtamenbrana. La presencia de

esta mutación se asocia con alto conteo de blastos, recaídas y poca supervivencia. Es usual encontrarla junto a mutaciones en *NPM1* y *DNMT3*. Es más frecuente en pacientes con cariotipo normal. El Segundo tipo de mutación en *FLT3* se encuentra en el exón 20 y afecta al dominio tirosina quinasa, produciéndose una activación constitutiva por un cambio conformacional en la proteína que elimina su función autoinhibidora.¹³¹

- **Mutaciones en *NPM1*:** *NPM1* es un gen implicado en la biogénesis de los ribosomas, la reparación del ADN y la apoptosis. En los pacientes de LMA con *NPM1* mutado, la proteína se encuentra fuera de su localización normal. Las mutaciones en *NPM1* son más frecuentes en las LMA con cariotipo normal, hasta un 64% frente a un 35% en las LMA en general.¹³⁰
- **Mutaciones en *CEBPA*:** *CEBPA* es un factor de la transcripción implicado en la diferenciación neutrofílica. Son mutaciones específicas de LMA. Se detectan hasta en el 18 % de pacientes con cariotipo normal. Según las investigaciones una única mutación en *CEBPA* no tiene significado pronóstico, mientras que las mutaciones bialélicas se asocian a un buen pronóstico.¹³²

Citogenética

La presencia de una o más anomalías cariotípicas son comunes hasta en el 55 % de los pacientes con LMA.¹³⁰ En la LMA se producen reordenamientos estructurales específicos que se describen a continuación:

- **t(8;21) (q22;q22.1), *RUNX1-RUNX1T1*:** Translocación balanceada que aparece aproximadamente en el 7% de nuevos diagnósticos de LMA. La presencia de esta anomalía puede definir la LMA sin tener en cuenta la cantidad de blastos. En adultos su presencia determina un pronóstico favorable, pero en niños esta anomalía complica el pronóstico, agravándolo además si se asocia con una del(9q) o una trisomía del cromosoma 4. Las mutaciones en *RUNX1* tienen un impacto pronóstico diferente a la presencia de las lesiones cromosómicas que implican a *RUNX1*; t(8;21). Las mutaciones son asociadas a una peor situación mientras que las translocaciones son favorables.^{133,134}
- **t(15;17) (q24.1;q21.2) :** Translocación balanceada que resulta en el gen de fusión *PML-RARA*. Se detectada en un 13% de las LMA *de novo* y es específica de LPA. Al igual que la anterior, su presencia basta para el diagnóstico de LMA sin tener en cuenta la cifra de blastos.¹³⁵

- **inv(16) y t(16;16):** Aproximadamente el 7% de los pacientes presentan alteraciones en el cromosoma 16.¹³⁵ Predominan dos tipos de lesiones, la inv(16)(p13.1;q22) y la t(16;16)(p13.1;q22) que resulta en el gen de fusión *CBFB-MYH11*. Ambas tienen pronóstico favorable, que se pierde cuando la alteración en el cromosoma 16 no es ninguna de las anteriores. La presencia de cualquiera de estas dos lesiones es suficiente para el diagnóstico de LMA sin la cifra de blastos.
- **Reordenamientos del 11q23.3:** El 6% de los pacientes presentan este tipo de anomalías; este porcentaje aumenta hasta el 12% en el caso de niños.¹³⁵ Es una lesión característica de M5 y M5a.¹³⁶ En esta región hay hasta 100 tipos diferentes de reordenamientos y 64 tipos de translocaciones descritas. Las translocaciones están descritas tanto en leucemias linfoides como mieloides.¹³⁷
- **inv(3) y t(3;3):**— Estas dos alteraciones suman un 1% de los casos de LMA.¹³⁵ Se asocian con trombocitosis en SP y un aumento de megacariocitos atípicos en la MO.¹³⁸
- **t(6;9)(p23;q34.1):** El resultado de esta translocación es el gen de fusión *DEK-NUP214*, presente en un 1% de nuevos diagnósticos.¹³⁵ Se ha asociado a basofilia, pancitopenia y displasia.¹³⁹

Además de la presencia de translocaciones cromosómicas en mayor frecuencia que en SMD y LMMC, también hay características específicas del patrón de pérdida o ganancia de material cromosómico en los pacientes con LMA. Las alteraciones más frecuentes observadas en LMA fueron, la trisomía del cromosoma 8, la delección del cromosoma 7 y la delección del cromosoma 5. Las alteraciones en los cromosomas 5 y 7 son características de LAM relacionadas con la terapia previa.¹²⁰

Estudios de expresión génica

Son numerosos los estudios de expresión génica en LMA que tratan de determinar un patrón que aporte información para el diagnóstico, clasificación y pronóstico. Se han encontrado distintos perfiles moleculares en determinados subgrupos de pacientes. Un estudio con *microarrays* en LMA con cariotipo normal, que se clasifican en riesgo intermedio por su cariotipo, dividió a estos pacientes en dos subgrupos con distinto valor pronóstico.¹⁴⁰ También se han estudiado los patrones de expresión en subgrupos con cambios citogenéticos determinados, como la inv(16) y la t(8;21) donde se encontró una alteración en la expresión de los elementos implicados en el mecanismo antiapoptótico y en la señalización mTOR.¹⁴¹

La mayoría de los estudios que analizan el transcriptoma de manera global y sin supervisar han intentado correlacionar los distintos perfiles de expresión con los grupos diagnósticos o con el pronóstico de la enfermedad.^{125,142,143} Un trabajo relativamente reciente utiliza diferentes plataformas de *microarrays* de expresión génica en 499 pacientes con

distintos tipos de LMA, proponiendo una firma pronóstica determinada por el patrón de expresión de 24 genes como predictor independiente de una menor supervivencia.¹⁴⁴

Recientemente, otro estudio analizó la expresión génica en casos de LMA-M1 y M2 utilizando *microarrays*, RT-qPCR y PCR digital: entre otros hallazgos reportan que los niveles de expresión de *CAT* y *WT1* se relacionan con la respuesta a la terapia.¹⁴⁵

A pesar de que los estudios de expresión génica en LMA no se utilizan en la práctica clínica, son muy útiles a la hora de identificar dianas potenciales que puedan ser tratadas con agentes ya disponibles o impulsar el desarrollo de nuevos fármacos.¹⁴⁶ Un reciente estudio utilizando la metodología RNA-seq aportó el primer análisis integral sobre la expresión de receptores de superficie en LMA, identificando diversas dianas terapéuticas potenciales con fármacos ya desarrollados.¹⁴⁷

Diagnóstico y Clasificación

La confirmación diagnóstica de LMA y su clasificación adecuada, necesitan de información clínica, morfológica, inmunofenotípica y molecular, además del cariotipo. Para recopilar esta información se necesita un estudio medular y de SP.

- **SP:** habitualmente los pacientes se presentan con anemia y trombopenia de severidad variable. La mayoría de los pacientes tienen mieloblastos en circulación. La presencia de al menos 20% de blastos en sp también es criterio de diagnóstico de LMA, tanto si se ha hecho el conteo en médula como si no. El conteo de leucocitos es variable, la mayoría de los pacientes >15.0000 leucocitos por microlitro, pero también hay pacientes que presentan un conteo <de 5000 células por microlitro.
- **MO:** el diagnóstico de LMA exige, al menos, 20 % de blastos en el total de células del aspirado. La excepción a este criterio son leucemias que se consideran LMA en caso de presentar ciertas anomalías citogenéticas como t(8;21), inv(16), o una t(15;17).
- **Las células leucemias han** de tener un origen mielóide (presencia de bastones de Auer, positivas para mieloperoxidasa, definidas mieloides por su inmunofenotipo o con presencia de citogenética propia de células mieloides como t(1;22)(p13;q13).
- **Diagnóstico diferencial con otras entidades:** el conteo elevado de blastos podría deberse a una médula regenerativa tras un tratamiento quimioterápico o por factores de crecimiento. Es importante distinguir una crisis blástica en una leucemia mielóide crónica (LMC) de una LMA, por el beneficio que podría tener el uso de los inhibidores de tirosina quinasas en caso de que fuese LMC.

Al igual que ocurría en el caso de los SMD, también la LMA se puede considerar constituida por un grupo heterogéneo de enfermedades desde el punto de vista de su evolución. La clasificación OMS de 2016, con la incorporación de los últimos datos moleculares y genéticos pretende no solo ser un compendio de entidades, sino proporcionar orientación en cuanto al pronóstico y las posibilidades terapéuticas (**Tabla 4**).¹⁰⁰

Tabla 4: Clasificación de las leucemias agudas mieloides según la OMS 2016. *Adaptada de Arber et al. , Blood, 2016.*¹⁴⁸

LMA y neoplasias relacionadas	
LMA con anomalías genéticas recurrentes	
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T</i>	
LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	
LAP con <i>PML-RARA</i>	
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>	
LMA con t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	
LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>	
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>	
Entidad provisional: LMA con <i>BCR-ABL1</i>	
LMA con <i>NPM1</i> mutado	
LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEBPA</i>	
Entidad provisional: LMA con <i>RUNX1</i> mutado	
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	
Neoplasias mieloides relacionadas con terapia	
LMA sin diagnóstico específico (NOS)	
	Clasificación FAB
LMA con mínima diferenciación	MO
LMA sin maduración	M1
LMA con maduración	M2
Leucemia mielomonocítica aguda	M4
Leucemia aguda monoblástica/monocítica	M5
Leucemia eritroide aguda	M6
Leucemia megacarioblástica aguda	M7
Leucemia basófila aguda	
Panmielosis con fibrosis aguda	
Sarcoma mieloide	
Mieloproliferación relacionada con Síndrome de Down	
Mielopoyesis anormal transitoria	
Leucemia mieloide asociada a Síndrome de Down	

inv: inversión; LMA: leucemia aguda mieloide; LPA: leucemia aguda promielocítica; NOS: sin diagnóstico específico; t: translocación

En esta última revisión de la OMS se establecen 6 categorías principales.

- **LMA con anomalías genéticas recurrentes:** aproximadamente el 30% de las LMA pertenecen a esta categoría. Se distinguen nueve anomalías moleculares o estructurales que definen distintos subtipos, además de dos entidades provisionales.

- **LMA con cambios relacionados con mielodisplasia:** En este grupo se encuentran las LMA que cumplen criterios de diagnóstico con >20% de blastos en la MO, sin historia previa de terapia y que presentan citogenética característica de SMD (como la del(5q) o monosomía del 5, del(7q) o monosomía del 7), displasia multilinea o un SMD previo documentado.
- **Neoplasias mieloides relacionadas con terapia:** En esta categoría se agrupan los diagnósticos de aquellos pacientes que se han expuesto a agentes citotóxicos antes del diagnóstico de LMA, SMD o SMD/SMP. En esta categoría se excluye la LMA secundaria con un SMD previo, ya que es parte de la historia natural de esta enfermedad. Este grupo de pacientes con neoplasias relacionadas con terapia, tienen un peor pronóstico que aquellos pacientes con la misma enfermedad, pero *de novo*.
- **LMA sin diagnóstico específico (NOS):** Pacientes que no pertenecen a ninguno de los grupos anteriores. Esta subclasificación utiliza características morfológicas e inmunofenotípicas y se basa a la clasificación previa de la FAB.¹⁴⁹
- **Sarcoma mieloide:** más que un subtipo, es una manifestación clínica que puede aparecer en cualquier tipo de LMA; se trata de masas constituidas por blastos extramedulares que alternan la arquitectura normal del tejido en el que se localizan.
- **Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down:** se incluyen dos entidades que se desarrollan en presencia de la trisomía del 21. La mielopoyesis anormal transitoria, que ocurre en los primeros días de vida y se corrige, en la mayoría de los casos, en el plazo de 1 o 2 meses. Y la leucemia mieloide asociada a síndrome de Down, que aparece durante los 3 primeros años y puede tener o no una historia previa de mielopoyesis anormal transitoria.

Pronóstico

La LMA cuenta con varios factores pronósticos adversos como son la edad avanzada (>55, >60 o >65), anormalidades citogenéticas y moleculares en las células tumorales, antecedentes de exposiciones a agentes citotóxicos o radioterapia, SMD o NMP previos y el deterioro de la salud del paciente. Una edad >65, y un pobre estado general son los principales factores determinantes de muerte temprana.¹⁵⁰

La “European Leukemia Net (ELN)” propone una estratificación que integra las características citogenéticas y moleculares para dividir a los pacientes en tres grupos pronósticos (**Tabla 5**).¹⁵¹

Modelos posteriores han incorporado el valor pronóstico de las mutaciones somáticas recurrentes al ya recogido por la ELN. Así, Patel *et al.*, encontraron que las dosis altas

de daunorubicina beneficiaban de manera específica a aquellos pacientes que presentaran mutaciones en *DNMT3A*, *NPM1* o translocaciones *MLL*.¹⁵²

Tratamiento

Brevemente, el tratamiento de la LMA tiene, generalmente, como objetivo la consecución de la remisión completa. Para ello habitualmente el tratamiento se divide en dos fases: i) terapia de inducción: requiere la combinación de fármacos de citotoxicidad elevada, habitualmente antraciclinas y citarabina; ii) terapia tras la remisión completa: el espectro de posibilidades es amplio (quimioterapia de consolidación, terapias dirigidas, trasplante de progenitores hematopoyéticos) pero siempre con el objetivo de sostener la remisión completa y alcanzar una supervivencia libre de enfermedad prolongada.

La valoración de la respuesta al tratamiento en la LMA depende tanto de aspectos morfológicos, citogenéticos, moleculares y clínicos, tanto de la MO como de la SP, e incluye los términos: remisión completa, remisión completa con recuperación incompleta de neutrófilos o plaquetas, remisión parcial, enfermedad refractaria y recaída.

Tabla 5: Clasificación de la *European LeukemiaNet* de los pacientes con LMA en grupos pronóstico, según la citogenética y el perfil molecular de 2017. Döhner et al., Blood 2017. ¹⁵¹

Categoría de Riesgo	Anomalía citogenética
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD^{low}</i> Mutaciones bialélicas en <i>CEBPA</i>
Intermedio	<i>NPM1</i> mutado con <i>FLT3-ITD^{high}</i> <i>NPM1 wild type</i> sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD^{low}</i> (sin lesiones genéticas de riesgo adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Lesiones citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); reordenamiento <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1) -5</i> o del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complejo, cariotipo monosómico <i>NPM1 wild type</i> y <i>FLT3-ITD^{high}</i> <i>RUNX1 mutado</i> <i>ASXL1 mutado</i> <i>TP53 mutado</i>

inv: inversión; LMA: leucemia aguda mieloide; LPA: leucemia aguda promielocítica; NOS: sin diagnóstico específico; t: translocación

2. RNA-SEQ: método global de análisis del transcriptoma

Desde las primeras aplicaciones de la secuenciación profunda de ARN en 2008, los estudios del transcriptoma han experimentado un crecimiento exponencial, con la aplicación de las estrategias de secuenciación de alto rendimiento (RNA-seq).^{153,154} Hasta el momento, la técnica más empleada para el estudio del perfil de expresión génica eran los *microarrays*, pero la llegada del RNA-seq revoluciona este campo y ofrece ventajas llamativas. El estudio del transcriptoma por RNA-seq proporciona gran cantidad de información, tanto cuantitativa como cualitativa y presenta un coste asumible ya incluso para el estudio de un transcriptoma completo. Más allá de los niveles de expresión génica, los experimentos de RNA-seq permiten identificar nuevos transcritos, nuevas isoformas, sitios de *splicing* alternativos y la caracterización de transcriptomas *de novo*, sin genoma de referencia, ya que la tecnología de RNA-seq no se basa en transcritos conocidos que hibriden con sondas como en el *microarray* (Tabla 6).¹⁵⁵

Tabla 6: Comparación de las técnicas de RNA-seq y *microarrays*

	RNA-Seq	Microarray
Alta reproducibilidad	Si	Si
Capacidad de detectar sitios de <i>splicing</i> alternativo y nuevas isoformas	Si	No
Análisis de muestras <i>de novo</i> que no tienen genoma de referencia	Si	No
Datos re analizables	Si	No
Menor ruido de fondo	Si	No

La principal limitación que presenta el RNA-seq es la capacidad de procesar la gran cantidad de información y datos generados. En el caso de los *microarrays*, las sondas con las que hibridan las moléculas amplificadas emiten fluorescencia que es cuantificada; pero en el caso del RNA-seq, el análisis de los resultados es mucho más complejo y requiere de un mayor apoyo bioinformático. El tamaño de las lecturas es un factor a tener en cuenta en el diseño de los experimentos, ya que va a influir tanto en la cantidad de datos generados como en la tasa de error. Atendiendo a la longitud de la lectura, las plataformas disponibles se dividen en plataformas de lecturas largas (aquellas de >300 pb, Ion Torrent) y cortas (<300 pb, Illumina). Cuanto mayor sea la longitud de la secuencia, mayor será el área del genoma que cubre y, por lo tanto, el análisis bioinformático tendrá menos lecturas a solapar. Ello implicará una menor complejidad (menor tiempo y requerimientos) pero a expensas de una mayor tasa de errores en la identificación de los nucleótidos.¹⁵⁶ En cambio, si las lecturas son más cortas, el fragmento del genoma cubierto también es más pequeño. Sin embargo, habrá mayor

número de lecturas para su ensamblaje con el genoma de referencia, lo que implica más tiempo, mayor requerimiento bioinformático y mayor cantidad de datos generados.

2.1 Aspectos metodológicos del RNA-seq

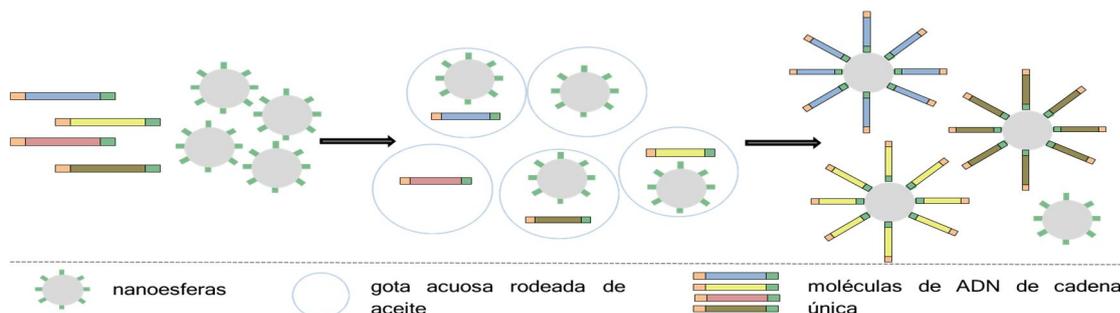
Hay distintas plataformas para el desarrollo de experimentos de secuenciación masiva. Tanto la primera fase (experimental, *in vitro*), como la segunda fase (análisis bioinformático) siguen metodologías distintas según la plataforma con la que se realice la secuenciación, pero todas siguen un esquema similar: generación de la biblioteca, amplificación, secuenciación y análisis de datos. Comentaremos brevemente las distintas técnicas centrándonos en la tecnología de Illumina (que empleamos en el capítulo 1 y 2 de este trabajo) y en la tecnología basada en chips semiconductores de Ion Torrent (empleado para el segundo capítulo de este trabajo).

1-Creación de la biblioteca

Hay varios métodos para preparar la librería, la elección de uno u otro depende de la plataforma en la que se va a realizar la secuenciación, pero todos cuentan con varios pasos comunes: i) aislamiento del ARN mensajero, ii) generación de fragmentos de tamaño apropiado para la secuenciación, iii) retrotranscripción de ARNm a ADNc de doble cadena, iv) unión de adaptadores, v) amplificación de la librería por PCR.

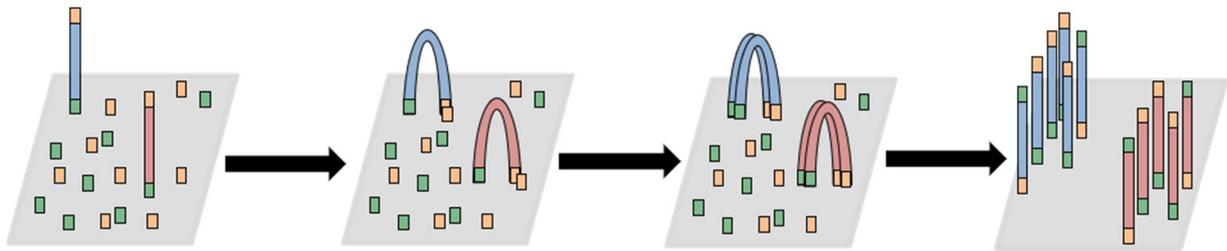
El paso de amplificación por PCR se realiza por emulsión en el caso de la utilizada por Ion Torrent, o por PCR puente, mecanismo propio de Illumina. En la PCR por emulsión de Ion Torrent, la amplificación se lleva a cabo en una emulsión aceite-agua con nanoesferas que aíslan un solo fragmento de material genético que va a ser amplificado, de manera que cada nanoesfera queda recubierta de miles de copias de la secuencia molde (Figura 3).

Figura 3: Esquema del proceso de PCR en emulsión. Los extremos de los fragmentos de ADN se unen a adaptadores, uno es el que sirve de unión a las nanoesferas y el otro es el complementario al cebador. Estos fragmentos se combinan con nanoesferas en una emulsión, formándose gotas acuosas recubiertas de aceite que contienen en su interior una nanoesfera, un fragmento de ADN. Cada gota actúa como un microreactor aislado de los demás, que contiene en su fase acuosa, los reactivos necesarios para que se lleve a cabo la amplificación. Tras la amplificación, cada nanoesfera queda recubierta por millones de fragmentos idénticos.



Illumina utiliza la PCR puente para la generación de *clusters*. La secuencia molde queda inmovilizada en una placa de vidrio, sobre la que están dispuestos adaptadores complementarios a los adaptadores anclados en las secuencias desnaturalizadas a secuenciar. Así, cada fragmento de ADN monocatenario se unirá por uno de sus extremos a uno de los oligonucleótidos complementarios presentes en la placa. Tras la acción de la polimerasa, que utiliza estos adaptadores como cebador, se sintetiza la cadena complementaria, quedando también inmovilizada. Seguidamente, tendrá un nuevo ciclo de desnaturalización, provocando que las hebras desnaturalizadas formen puentes gracias a la unión de su extremo libre con otro de los adaptadores inmovilizados en la placa. Este proceso se repite varias veces, hasta formar *clusters*, una agrupación de secuencias idénticas inmovilizadas sobre una superficie sólida (**Figura 4**).

Figura 4. Esquema del proceso de PCR puente. Los fragmentos de ADN unidos a adaptadores en sus extremos van a quedar inmovilizados en una superficie sólida recubierta de ambos adaptadores que permiten la unión. La ADN polimerasa sintetiza la nueva cadena. Las dos cadenas se desnaturalizan y este proceso repite hasta que se generan clúster de fragmentos clonados.



2-Secuenciación

En ambos casos, Ion Torrent e Illumina, se utiliza la secuenciación por síntesis. Ion Torrent, en su paso de secuenciación, utiliza la adición de un solo nucleótido (Single-Nucleotide Addition, SNA) de manera que cada vez que se incorpora un nuevo nucleótido a la cadena, en síntesis, se libera un protón (H^+), que modifica el pH. Los cambios de pH son detectados por la base del micro-pocillo del chip, que actúa como un pH-metro. En el capítulo 2 de este trabajo se utiliza un secuenciador *Ion Personal Genome Machine*™ (PGM™) capaz de generar lecturas de hasta 400 pb.

La secuenciación por síntesis de Illumina, tecnología empleada en el primer capítulo de este trabajo, se caracteriza por el uso de nucleótidos fluorescentes que bloquean de forma reversible la elongación de la cadena. De este modo, tras la detección de la incorporación del fluoróforo, y la eliminación del mismo, es posible continuar con un nuevo ciclo de adición de un nuevo nucleótido.

3-Análisis de datos

El elevado volumen de datos que se generan en un proyecto de RNA-seq supone un reto para su análisis. Los algoritmos para analizar los ficheros de lecturas tienen un elevado consumo de memoria RAM y CPU y, además, van a ir generando un ingente volumen de datos a lo largo del proceso. En el caso de experimentos de expresión diferencial que analicen varias réplicas biológicas con diversos tratamientos, el volumen de datos puede volverse inmanejable, a excepción de que se cuente con una infraestructura computacional adecuada.

Un flujo básico de análisis bioinformático de RNA-seq incluye los siguientes pasos: (1) pre-procesado de las lecturas de secuencias: estimación de su calidad, eliminación de adaptadores y de datos redundantes; (2) mapeo de las lecturas a un genoma/transcriptoma de referencia o ensamblaje *de novo* de los transcritos; (3) anotación funcional de los transcritos; (4) cuantificación de los niveles de expresión de los distintos transcritos generados, incluyendo la determinación de *splicing* alternativo; (5) análisis de expresión diferencial.

La normalización de los datos pre-procesamiento es un paso crítico para que el comportamiento biológico de las muestras pueda ser interpretado correctamente y permita la comparación entre ellas. Hay distintos métodos para llevar a cabo esta normalización que nos van a dar los valores de expresión medidos en FPKM / RPKM (fragmentos de transcrito por millón de secuencias mapeadas -para lecturas pareadas-/ lecturas por kilobase de transcrito por millón de secuencias mapeadas-para lecturas simples-), CPM (lecturas por millón) o TPM (transcritos por millón). La diferencia entre ellas radica en qué parámetros del experimento son considerados para normalizar los datos. Los principales parámetros a tener en cuenta son la profundidad de la secuenciación y la longitud del gen. Así, el mismo número de lecturas mapeadas en un gen más largo, puede llevarnos a estimar que su expresión es igual que en un gen más corto en el que se ha mapeado el mismo número de lecturas. En el caso de CPM solo tiene en cuenta la profundidad de la secuencia, TPM normaliza respecto a los valores tanto de profundidad como de longitud de transcrito, al igual que RPKM/FPKM. La diferencia entre estas dos últimas medidas se encuentra en el orden en el que usan los parámetros para normalizar. RPKM se expresa como el total de lecturas de la muestra entre un millón. A ese resultado se le denomina factor de escala que es utilizado como denominador para el número de lecturas obteniéndose las lecturas por millón (RPM), que al dividirse por la longitud del gen nos otorgan, finalmente, las RPKM. El cálculo de FPKM es similar al descrito para RPKM, pero teniendo en que dos lecturas pueden corresponder a un solo fragmento.

Puntos importantes a considerar en un análisis de RNA-seq:

- **Calidad de la muestra de ARN:** indispensable para que la preparación de la librería de cDNA sea exitosa. El número de integridad del ARN (RIN, de sus siglas en

inglés) determinado por el bioanalizador, es la medida más adecuada para conocer la calidad de nuestra muestra. Para los experimentos de RNA-seq se requiere un RIN ≥ 7 .

- **Cantidad de ARN necesario:** su cuantificación debe ser lo más precisa posible, teniendo en cuenta cierta tendencia a la sobreestimación en caso de la existencia de contaminantes que absorben luz UV próxima a los 260 nm (nucleótidos libres, restos de los compuestos orgánicos usados durante la extracción etc). El perfeccionamiento de la técnica desde su implantación ha permitido que se desarrollen protocolos para cantidades de ARN de pocos nanogramos, por lo que cada vez este paso es menos limitante.
- **Lecturas pareadas:** el coste de secuenciar lecturas pareadas es el doble frente a la secuenciación de lecturas simples, dado que se producen dos ficheros en lugar de uno. El uso de lecturas pareadas pertenecientes a la misma región genómica permite utilizar la posición de las mismas y su distancia entre ellas para mejorar la precisión del ensamblaje.
- **Cobertura:** tanto por ciento de la secuencia objetivo de la que se han conseguido lecturas.
- **Profundidad de secuenciación:** número medio de lecturas que se alinean a una secuencia de bases específica dentro de la muestra de ADN del genoma de referencia.

2.2 Tipos de RNA-seq: Global o dirigido

La longitud y el número de lecturas generadas va a tener una incidencia fundamental en la profundidad de secuenciación que, de acuerdo a la ecuación de Lander y Waterman (1988), es directamente proporcional a la longitud y número de lecturas e inversamente proporcional a la longitud del genoma. En estudios de RNA-seq, la profundidad de secuenciación es difícil de predeterminar, y se va a producir una heterogeneidad en los niveles de expresión para todos los *loci*; es decir, los genes que se expresan en mayor medida presentarán un mayor número de lecturas. De hecho, en un transcriptoma típico, un grupo discreto de transcritos muy frecuentes pueden llegar a representar hasta el 80% de todos los transcritos. Por otro lado, la gran mayoría de los transcritos están presentes sólo de 1 a 10 copias por célula e incluso por tejido. Muchos de estos transcritos escasos son de importancia crucial para el destino y funcionamiento de la célula, como por ejemplo receptores o factores de transcripción. Para identificar adecuadamente transcritos de baja y

media expresión, vía secuenciación, es necesario obtener una alta resolución del transcriptoma secuenciando la mayor cantidad de moléculas posibles.¹⁵⁷

La herramienta de RNA-seq dirigido proporciona la posibilidad de limitar la secuenciación a un grupo de genes determinado, bien por adquisición de paneles comerciales ya disponibles o haciendo un diseño personalizado. En el capítulo 2 de este trabajo, se realizó el diseño de un panel dirigido a 242 antígenos testiculares tumorales (ATTs). El motivo de elegir este tipo de RNA-seq partió del hecho de que son transcritos de los que esperábamos ninguna o muy escasa expresión.

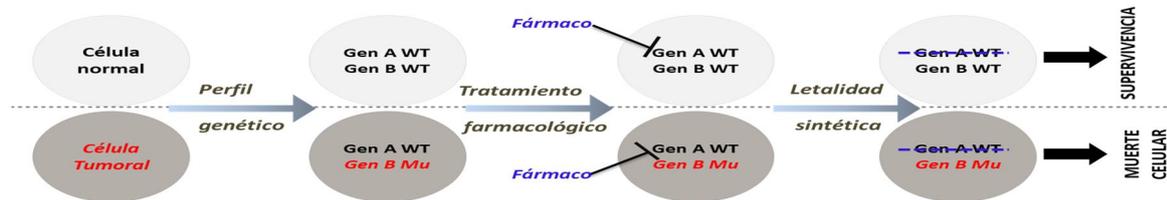
3. LETALIDAD SINTÉTICA EN CÁNCER

3.1 Noción histórica

El concepto de letalidad sintética fue descrito por primera vez en 1922 por el genetista Calvin Bridges. En sus estudios sobre las variaciones de los caracteres sexuales en *Drosophila melanogaster*, observó que la combinación de determinados genes no alélicos conferían letalidad al individuo, a pesar de que los padres homocigotos eran viables¹⁵⁸. Más tarde, en 1946, Theodore Dobzhansky fue quien acuñó el término de letalidad sintética para referirse al mismo fenómeno de interacción genética que había descrito ya Bridge, en poblaciones de *Drosophila pseudoobscura*. Por lo tanto, el término de letalidad sintética se define como el fenómeno en el que la concurrencia de dos eventos genéticos (dos mutaciones, por ejemplo) resultan en la muerte del organismo, o muerte celular, eventos que no son letales si ocurren individualmente.¹⁵⁹

En 1997, Hartwell *et al.*, llevaron el concepto de letalidad sintética a la farmacología, utilizando las vulnerabilidades de las células tumorales como base para el desarrollo de fármacos anticancerígenos.¹⁶⁰ En este trabajo se extendió el término de letalidad sintética a aquellos casos en los que la presencia de una mutación combinada con una droga causaba la muerte celular, mientras que la alteración o la droga, aisladas, permitían la viabilidad celular. La presencia de una mutación en una célula tumoral puede hacer a esta más sensible a un fármaco que inhiba la función de otro gen con el que tenga una relación letal-sintética, a la vez que “no afectaría” a las células normales (**Figura 5**).

Figura 5: Principio de letalidad sintética aplicado a tratamiento quimioterápico. Adaptada de Ferrari et al., Eur J Cancer, 2010.¹⁶¹ La célula normal se diferencia de la tumoral por la presencia de una mutación en el gen B. Si el gen A y el gen B tienen una relación letal-sintética, un fármaco que inhiba el gen A podrá dañar mortalmente a la célula tumoral que tiene el gen B mutado, sin afectar a la célula sana.



WT: wild type

Una de las aplicaciones más interesantes y con más opciones de la letalidad sintética es su uso en el contexto de la reparación del ADN. La reparación de ADN cuenta con distintos mecanismos, distintas vías que van a actuar en función del tipo y del momento de la lesión. La misma lesión puede ser reparada por más de una vía, en caso de que la vía de reparación de elección principal este dañada (por una mutación, p.ej.). Inhibiendo esta vía alternativa intacta se producirá la muerte celular. Son varios ya los fármacos que explotan la letalidad sintética con daño previo de la célula en la reparación de ADN, en distintos tumores.

3.2 Vías de reparación de ADN

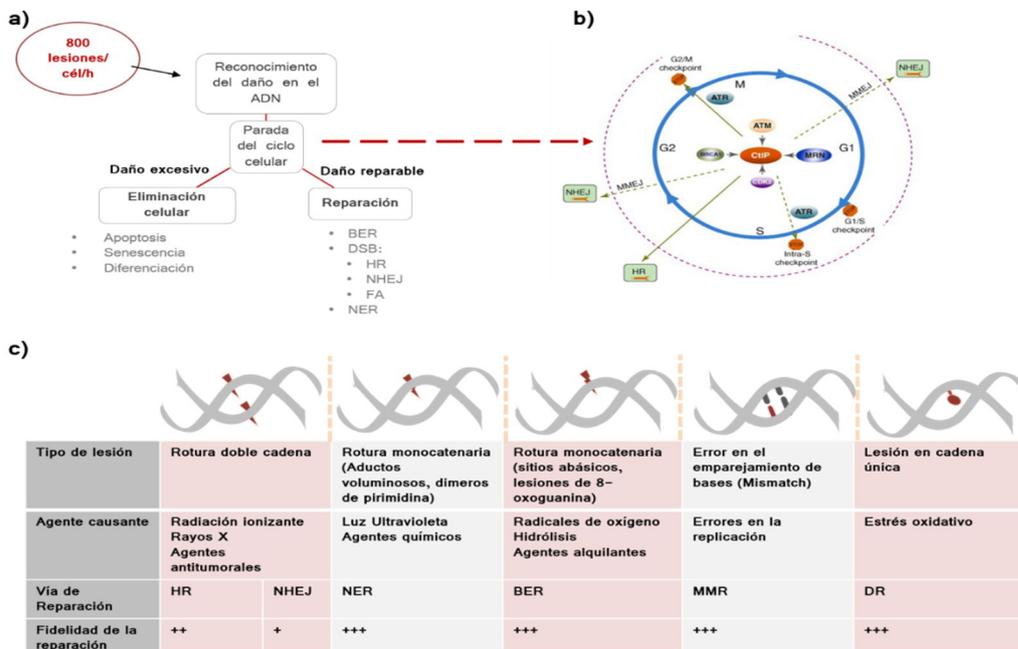
Es esencial que el ADN, la estructura que contiene toda la información genética que determina las funciones y características de un organismo, conserve su integridad. Mantener esta integridad es tarea de los mecanismos de reparación. Su respuesta deficiente determina inestabilidad genómica. Bajo condiciones normales nuestro genoma está expuesto de forma constante a agentes genotóxicos tanto internos (radicales de oxígeno y nitrógeno) como externos (radiaciones ionizantes y agentes alquilantes). Se estima una media de 800 lesiones por célula y por hora que van a tener que ser corregidas por estos mecanismos de reparación. El proceso incluye distintas etapas como la detección de la lesión, la parada del ciclo celular, apoptosis, senescencia, diferenciación y, si es posible, la reparación del ADN (Figura 6a).¹⁶²

El ciclo celular dispone de tres puntos de control integrados encargados de disminuir la propagación del daño en el ADN, que se encuentran en G1, S y G2, antes de la mitosis y distribución del material genético a las células hijas.¹⁶³ La activación de estos puntos de control al reconocerse una lesión en el ADN supone un retraso en la progresión del ciclo. Ello permite la reparación del ADN empleando los distintos mecanismos en función de la naturaleza y cantidad de daño, así como del momento del ciclo celular en el que se produce la lesión (Figura 6b y 6c).¹⁶⁴

Dentro de los mecanismos de reparación del ADN, la reparación directa (DR) es el más simple de los sistemas de reparación, ya que no requiere la eliminación de nucleótidos o bases, sino que ejerce su acción a través de la enzima MGMT, que revierte químicamente la guanina metilada formada por agentes alquilantes como la temozolomida (TMZ) a su forma original de guanina.¹⁶⁵ La actividad aumentada de MGMT es responsable de casos de quimio-resistencia, mientras que su inhibición sensibiliza a las células cancerosas a TMZ. También se ha descrito que la metilación del promotor de MGMT aumenta la sensibilidad a los agentes quimioterápicos y también la supervivencia de los pacientes, así como su baja expresión se asocia con una progresión tumoral lenta (Figura 7a).¹⁶⁶

Las lesiones de cadena única van a ser reparadas en función del tipo de alteración. Si una cadena sufre daños en sus bases por radicales de oxígeno, metilación, desaminación o reacciones hidrolíticas, el mecanismo que actúa es la reparación por escisión de bases (BER), donde la base dañada será retirada por una glicosilasa específica que dejará un hueco a rellenar por una ADN polimerasa.¹⁶⁷ La BER tiene dos vías de reparación. Que el daño en el ADN sea reparado por una u otra depende del agente causante, del tipo de lesión, del sitio abásico generado en el primer paso de la reparación y del momento del ciclo celular en donde se ha producido el daño (Figura 7b).¹⁶⁸

Figura 6. Resumen del proceso de reparación de ADN: a) Respuestas al daño celular, **b)** puntos de control del ciclo celular y **c)** tabla resumen de los tipos de lesiones, agentes causantes y vías de reparación capaces de reparar las lesiones.



BER: reparación por escisión de bases, DR: reparación directa, HR: reparación por recombinación homóloga, MMR: reparación por mismatch, NER: reparación por escisión de nucleótidos, NHEJ: reparación por unión de extremos no homólogos

Sí la zona dañada en la cadena no es una base, sino que se concentra en una zona de mayor longitud formando aductos que provocan distorsiones en la hélice (causados por las radiaciones ultravioleta o los tratamientos derivados del platino, p.ej) el proceso encargado de reestructurar la cadena es el de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Más de 30 proteínas participan en esta vía en distintos pasos que implican reconocer el daño, la acción de helicasas y nucleasas, seguidas de síntesis o ligación **(Figura 7c)**.¹⁶⁹

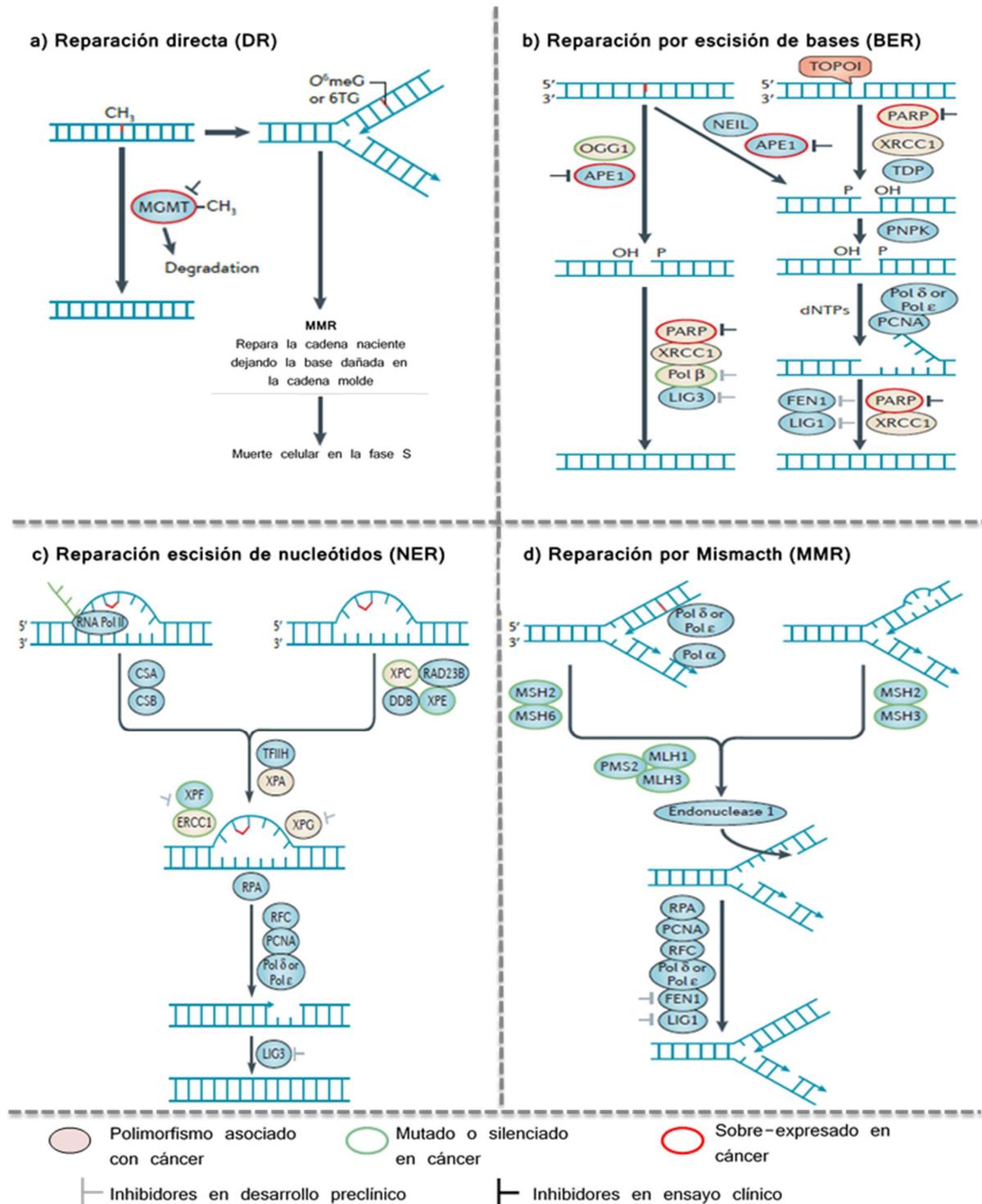
De forma más compleja, la reparación por *Mismatch* (MMR) interviene tras la replicación corrigiendo *loops* de bases mal apareados, que son resultado de deleciones o inserciones aberrantes en la cadena naciente. Hay dos complejos principales en esta vía, el formado por las proteínas codificadas por *MSH2* y *MSH6*, que se encargan de reparar los apareamientos erróneos más pequeños, y el formado por *MSH2* y *MSH3* que repara tanto los *loops* pequeños como los más grandes. El mal funcionamiento de esta vía aumenta considerablemente la tasa de mutaciones de la célula, predisponiéndola al desarrollo tumoral y a quimioresistencia **(Figura 7d)**.^{170,171}

Las lesiones de doble cadena son las más peligrosas para la célula porque pueden dar lugar a reordenamientos del genoma con pérdida de información genética, asociándose con translocaciones cromosómicas, muerte celular y carcinogénesis. Hay dos mecanismos principales de reparación de cadena doble: la reparación directa por recombinación homóloga (HR) y la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). La HR es la que se encarga de corregir las lesiones más complejas de doble cadena **(Figura 8)**. Opera principalmente durante la fase G2, lo que le permite encontrar una plantilla o área de homología en la cromátida hermana que va a usar como molde para resintetizar la parte dañada. El uso de la cromátida hermana es la principal diferencia con la NHEJ, en la que no hay molde, por ello la HR es una reparación mucho más eficaz y fiel. En la NHEJ, los extremos que se han roto, se vuelven a unir, sin molde, y da lugar a la pérdida de información, así como aberraciones cromosómicas si la rotura ha ocasionado pérdida de bases **(Figura 8)**. Dentro de la NHEJ hay dos vías. La clásica (cNHEJ), cuyas proteínas principales son XRCC6, XRCC5, DNA ligasa4/XRCC4 complex, y DNA-PK y que, en función de si los extremos son complementarios o no, realizan una pequeña reparación antes de proceder a la ligación.^{172,173} Se ha descrito que un defecto en la cNHEJ activa una segunda vía alternativa, más propensa a errores, denominada unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), en la que se van desechando nucleótidos en cada uno de los extremos hasta que se reconocen unas secuencias de 5 a 25 que sean complementarias y es ahí donde une los extremos.¹⁷⁴

Los daños producidos por entrecruzamientos entre las cadenas (ICL) son reconocidos por un complejo que pertenece a la vía de reparación de la anemia de Fanconi, en la que participan 16 genes que se han descrito mutados en ese cuadro de

anemia congénita (Figura 8). Algunas de estas proteínas se solapan con la HR y la NHEJ. 175,176

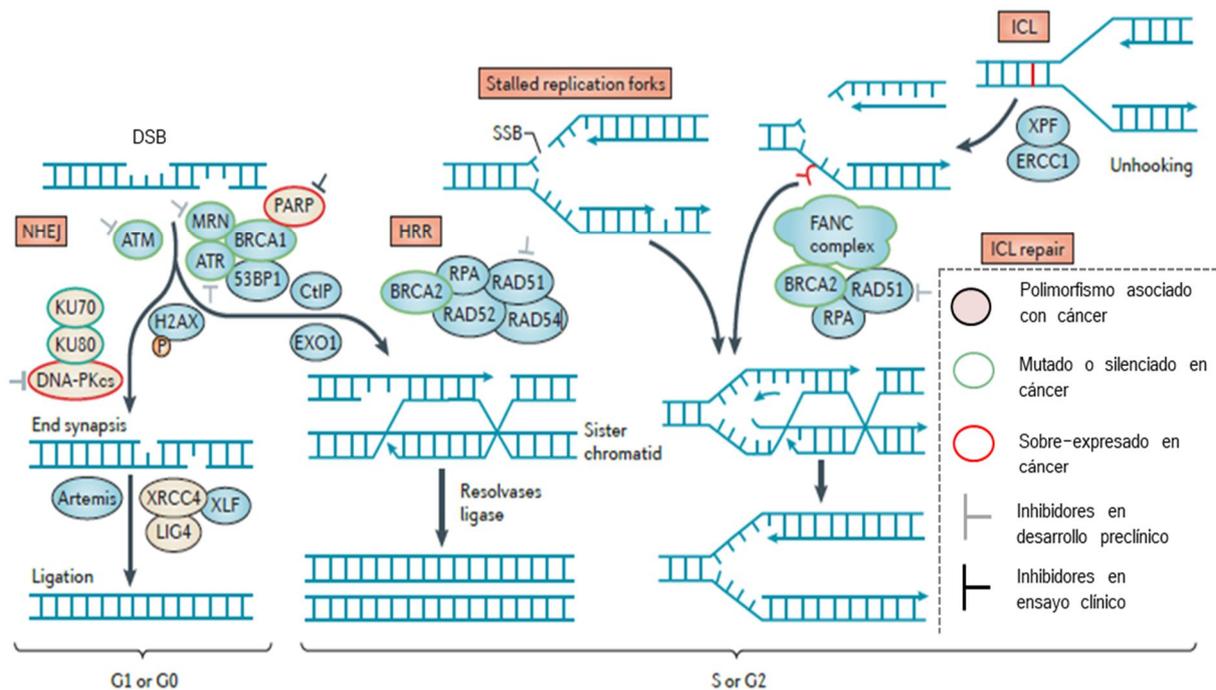
Figura 7. Vías de reparación de ADN en lesiones de cadena única, con sus principales proteínas. Adaptada de Curtin NJ. Nature Reviews, 2012.¹⁷⁷



Dentro de los mecanismos de reparación de doble cadena se suele incluir la síntesis de translesión (TLS), aunque su papel fundamental es de tolerancia al daño. La

TLS puede “saltarse” bloqueos en la replicación causados por varias lesiones permitiendo que la replicación se lleve a cabo sin que la célula entre en una muerte celular.

Figura 8. Vías de reparación de ADN en lesiones de cadena doble con sus principales proteínas. Adaptada de Curtin NJ. Nature Reviews, 2012.¹⁷⁷



Estas vías de reparación no son independientes, sino que cada vez hay más evidencias de que se solapan entre sí y que, si una vía falla al reparar una lesión, otra puede resolverlo. Además, numerosos estudios han confirmado que proteínas asociadas de forma inicial a una vía concreta, están también presentes en otras vías o procesos biológicos (Figura 10). Por lo tanto, se puede considerar a las vías como nodos interrelacionados entre sí, lo cual aumenta la complejidad del sistema y ayuda a mantener la estabilidad genómica. Sin embargo, el solapamiento de las vías y la multifunción de las proteínas favorece la quimioresistencia y complica la aplicación del concepto de letalidad sintética a la hora de identificar dianas terapéuticas.^{165,178,179}

Figura 9. Proteínas con multifunción en la reparación de ADN. Adaptado de Dietlein *et al.*, Trends Genet. 2014. ¹⁸⁰

	HR	NHEJ	SSA	FA	BER	NER	MMR
ATM	●	●	●				
ATR	●	●	●				
PAXIP	●	●					
RPA	●		●			●	
BRCA1	●			●			
BRCA2	●			●			
RAD51	●			●			
RFC					●	●	
XRCC1					●	●	
PCNA					●	●	●
PARP1		●			●		
ERCC1	●		●	●		●	
MSH3	●		●				●

● Primera vía con la que se asoció el gen ● Vías con las que se asoció posteriormente

BER: reparación por escisión de bases, FA: vía de reparación anemia de Fanconi HR: reparación homologa recombinante, MMR: reparación por mismatch, NER: reparación por escisión de nucleótidos, NHEJ: reparación por unión de extremos no homólogos, SSA: Reparación por alineamiento de cadena sencilla

3.3 Aplicaciones en cáncer de la letalidad sintética

La mayoría de los agentes quimioterápicos usados para tratar los distintos cánceres se caracterizan por su eficacia contra las células que proliferan, lo cual tiene efecto sobre las tumorales, pero también sobre aquellas que de forma normal están en continua división, como los precursores hematopoyéticos de la MO, las células del epitelio del estómago o las células de los folículos pilosos. Esta falta de selectividad hacia el tumor es una de las grandes causas de los fallos de las terapias anticancerígenas y es aquí donde la inestabilidad genómica, que subyace en casi todos los tumores humanos descritos, puede estar dándonos la clave de su vulnerabilidad. Como la inestabilidad genómica es un reflejo de un mal funcionamiento de los sistemas de reparación, podemos usar esta debilidad de las células tumorales para destruirlas de forma selectiva mediante letalidad sintética.

Los inhibidores de *PARP1* son las moléculas que lideran la aplicación de la letalidad sintética en cáncer desde 2005, cuando se comunicó su eficacia en líneas celulares deficientes en *BRCA*.¹⁸¹ Más tarde, en 2007, se presentaría el primer ensayo clínico con un inhibidor de *PARP1*, el olaparib, en monoterapia en pacientes deficientes en *BRCA*, con resultados positivos al finalizar el ensayo.¹⁸² Desde entonces, el estudio de los

inhibidores de *PARP1* ha ido en aumento, tanto para su uso en monoterapia como en combinación. *PARP1* tiene su actividad principal en la BER. La inhibición de *PARP1* compromete la eficacia de esta vía, resultando en la acumulación de daños de cadena única que se convertirán en lesiones de cadena doble en la fase S. En una célula sana, la vía HR repararía la rotura de doble cadena producida en la fase S, pero en una célula deficiente en *BRCA*, la HR no es capaz de reparar, ya que depende de la existencia de suficiente proteína *BRCA* funcional, y será la NHEJ quien intentará reparar la lesión de doble cadena.

El interés por la investigación y el desarrollo de ensayos clínicos utilizando inhibidores de *PARP* sufrió un contratiempo importante al no alcanzar los resultados esperados en 2011. No se consiguió aumentar la supervivencia en pacientes con cáncer de mama triple negativo en un ensayo clínico en fase III, a pesar de haber mostrado resultados esperanzadores en su fase II. Esto motivó que no se empezase un ensayo fase III de en cáncer hereditario de mama asociado a *BRCA1* y *BRCA2*.^{183,184} Sin embargo, en lugar de desplazar a los inhibidores de *PARP1* de la investigación, lo que supuso estos resultados negativos fue un incremento en el esfuerzo en conocer de manera más profunda los mecanismos de acción de la molécula y en diseñar los ensayos clínicos con una selección más adecuada de la población a estudio.

En la BER hay más proteínas que son motivo de investigación en cuanto a su potencial uso dentro del concepto de letalidad sintética. Por ejemplo, *APE1*, cuya sobreexpresión ha mostrado conferir quimio y radio-resistencia, además de peor pronóstico y menor tiempo hasta la progresión en cáncer de cabeza y cuello.^{185,186} Se ha descrito una acción letal-sintética al inhibir *STAT3* y *APE1*, lo que ha demostrado eficacia en el tratamiento de líneas celulares de glioblastoma y cáncer pancreático.¹⁸⁷ Otras dos proteínas estudiadas en esta vía desde una aproximación de letalidad sintética son la *Polβ* y la *FEN1*. Ambas se encuentran elevadas en algunos tipos de cánceres, y su bloqueo hace a las células tumorales más sensibles a los agentes alquilantes.^{188,189} Otros estudios celulares han encontrado una relación letal-sintética en el uso de inhibidores de *Polβ* en células deficientes en una proteína de la MMR, la *MSH2*.¹⁷⁰ En células deficientes en *MSH2* en cáncer colorrectal metastásico se inició también un ensayo clínico con metotrexato que favorece la acumulación de estrés oxidativo en la célula y tiene una relación letal sintética con las células tumorales deficientes en MMR.¹⁹⁰

XPA, *XPF* y *XPG* son 3 genes que codifican para proteínas exclusivas de la NER, que junto con *ERCC1* (que también participa en otras vías) y *RPA* son el centro del desarrollo de inhibidores de la NER.¹⁹¹ Se han estudiado dos inhibidores de *RPA*, uno reversible y otro irreversible que sensibilizan a las células frente a los agentes de platino¹⁹².

Los inhibidores testados en dianas de la HR son varios, pero casi todos presentan falta de especificidad como la mirina, que inhibe al complejo que reconoce el daño en la HR. La

mirina también inhibe a *ATM* y tiene una acción reguladora negativa sobre la NHEJ.¹⁹³ Las dianas más prometedoras en esta vía son *cAbl*, *HSP90* y *PARP1*. La inhibición de *cABL* y *HSP90* puede interrumpir el ciclo celular y desencadenar la apoptosis. Hay varios inhibidores de quinasas aprobados que actúan sobre *cABL*.¹⁹⁴ La inhibición de *HSP90*, una chaperona que ayuda al correcto plegamiento de numerosas proteínas, disminuye la actividad de *RAD51*, lo cual favorece la apoptosis^{193,195}.

La inhibición de la NHEJ va a forzar a la célula a que los errores en la doble cadena sean reparados por la HR, pero si esta última es defectuosa, se induce una acción letal-sintética.¹⁹⁶ En esta vía, la investigación se centra sobre todo en la inhibición de las subunidades catalíticas de las DNA-PKcs, que son esenciales para su funcionamiento^{197,198}.

3.4 Letalidad sintética en neoplasias hematológicas

El interés por el desarrollo de terapias dirigidas en las neoplasias hematológicas ha llevado a un incremento en la exploración de la aplicación de la letalidad sintética en este tipo de tumores.

PARP1 sigue siendo la molécula en la que se centran la mayor parte de los grupos de investigación. Recientemente, se ha visto que el uso de un inhibidores de *FLT3* sensibiliza a las células de LMA con mutaciones *FLT3-ITD* a los inhibidores de *PARP1* y, como consecuencia, se afectan las principales vías de reparación de roturas de doble cadena (HR y NHEJ).¹⁹⁹ En estas LMA con mutación de *FLT3*, también se han observado efectos positivos con la combinación de un inhibidor de *FLT3* junto con un inhibidor de *ATM* o de su efector, *G6PD*, induciendo apoptosis en las células leucemias de la LMA.²⁰⁰

Otras combinaciones estudiadas en LMA es el uso de inhibidores de *ATR* con citarabina. La inhibición de *ATR* induce una parada del ciclo celular potenciando la actividad de la citarabina.²⁰¹

La inhibición de *CHK1*, cuya sobreexpresión se asocia a mayor riesgo de recaídas y menor supervivencia en pacientes con LMA, mostró sensibilizar a las células leucémicas al tratamiento con citarabina.²⁰²

La combinación de inhibidores de *PARP1* y agentes hipometilantes a bajas dosis ha mostrado sinergismo, aumentando la toxicidad en las células tumorales de LMA.²⁰³ Otras moléculas, como los inhibidores de *BCL2* también han mostrado ser eficaces en las células leucémicas con presencia de mutaciones en *IDH*.²⁰⁴

En las células de leucemia linfática crónica (LLC) defectuosas en *ATM* o en TP53 la inhibición de *ATR* indujo un aumento de la muerte celular.²⁰⁵ Estas mismas células

tumorales defectuosas en *ATM* han mostrado una mayor sensibilidad a inhibidores de PARP1 que aquellas que expresan *ATM* de forma normal.²⁰⁶

En LMA la presencia de mutaciones en *IDH1* y *TET2* son mutuamente exclusivas. Los mutantes en *IDH1* reprimen la expresión de *ATM*, y muestran mayor sensibilidad a radiaciones ionizantes y daunorubicina que los mutantes en *TET2*.²⁰⁷

4. ANTÍGENOS TESTICULARES TUMORALES

Los antígenos testiculares tumorales (ATTs) son un grupo de genes que, en condiciones normales, se expresan fundamentalmente en células germinales, sobre todo en testículo, y su expresión está altamente silenciada en tejido normal. Estos ATTs se han descrito activados en multitud de cánceres y, además, su expresión aparece asociada con formas más agresivas de la enfermedad. Los ATTs se caracterizan por su capacidad inmunógena natural y esto, junto con su re-expresión en tejido tumoral adulto, hace de ellos unos candidatos potenciales tanto para inmunoterapia como biomarcadores de detección temprana de cáncer o de respuesta a tratamientos como los hipometilantes.²⁰⁸

El primer ATT identificado fue *MAGEA1*, de la familia de los genes MAGE, genes asociados a melanoma.²⁰⁹ Posteriormente, con el desarrollo de los estudios de perfiles de expresión génica en tejidos normales y tumorales se han ido describiendo un gran número de este tipo de antígenos. A diferencia de lo que ocurría con los primeros métodos de identificación (serológicos), los estudios de perfiles de expresión no dan información sobre sus propiedades inmunógenas.^{210,211}

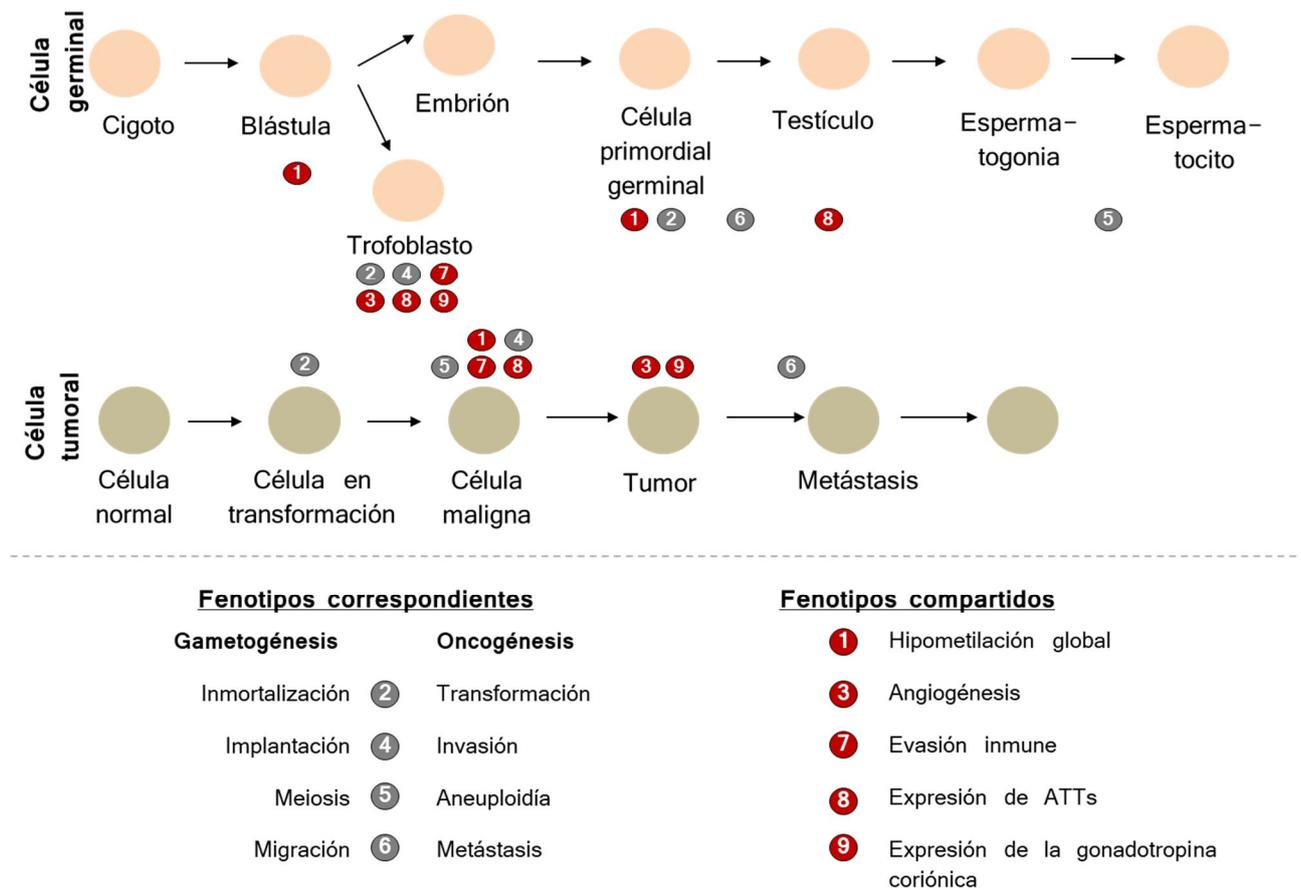
Los ATTs descritos se recogen en una base de datos que cuenta con más de 250 genes agrupados en más de 100 familias distintas (<http://www.cta.lncc.br>),²¹² Se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de su localización cromosómica: los que están codificados por genes del cromosoma X, y los que son codificados en autosomas. El grupo de ATTs del cromosoma X representa más del 10% de la secuencia codificante de este cromosoma y tienden a expresarse sobre todo en los estadios fetales del desarrollo de las células germinales, en la espermatogonia. Por otro lado los ATTs codificados por los autosomas se suelen expresar en estadios más tardíos de la diferenciación de la célula germinal como los espermatocitos.²¹³⁻²¹⁶ No todos los ATTs descritos tienen una expresión limitada a las células germinales. Un estudio en 2008 de Hofmann *et al.*, con perfiles de expresión génica, trató de poner en consenso una clasificación y definición más ajustada de los ATTs, clasificándolos en tres grupos, sin dejar de lado la clasificación según la localización cromosómica.

De manera interesante, 83 de los 153 genes estudiados por Hofmann se localizaban en el cromosoma X, y 35 de ellos presentaban expresión restringida en testículo, a diferencia del grupo que se encontraba en autosomas (70 genes) de los que solamente 4 tenían su expresión restringida a tejido testicular.²¹⁷

Las células cancerígenas y las células germinales comparten características ausentes en la mayoría de los otros tipos celulares. El esquema de transcripción de las células germinales fomenta la producción de factores que facilitan la movilidad, la invasión de tejidos, y proliferación, características también presentes en células tumorales.

Los antígenos tumorales testiculares confieren algunas de estas capacidades a las células cancerígenas, lo que sugiere que su re-expresión está implicada en la oncogénesis (Figura 10).^{218,219}

Figura 10. Características comunes en células germinales y tumorales. Adaptada de Simpson AJ et al., Nat Rev Cancer, 2005



4.1 ATTs en neoplasias hematológicas

Aunque los trabajos sobre ATTs se han centrado sobre todo en tumores sólidos, más recientemente han sido descritos también en neoplasias hematológicas.^{220,221} La expresión de ATTs en mieloma múltiple (MM) es la más caracterizada de todas las neoplasias hematológicas.²²¹⁻²²³ En MM se ha observado que algunos ATTs como *MAGEC1* aumentan con el avance de la enfermedad.²²⁴ En las células leucémicas de leucemia linfática crónica se ha caracterizado la expresión de ATTs como *SEMG1*, *SLLP1*, *PRM1*, *ROPN1*, y *SPANXB*, además, un estudio demostró cómo en LLC el tratamiento con hipometilantes re-expresaba un ATT inmunogénico como *NXF2*.²²⁵⁻²²⁵ En la leucemia mieloide crónica se ha descrito, en más del 50% de los pacientes, la expresión de ATTs como *HAGE*.²²⁶ En otras enfermedades mieloides, la falta de opciones terapéuticas ha llevado a poner el foco en la inmunogenicidad de los ATTs. Es el caso de los SMD

donde tras tratamiento hipometilante se ha observado un aumento en la expresión de *PRAME* y una expresión *de novo* de *NY-ESO-1* y *SSX2*.^{227,228} . En la **tabla 7** se resumen algunos de los ATTs descritos en neoplasias hematológicas.

Tabla 7: ATTs descritos en neoplasias hematológicas. Adaptada de Meklat *et al.*, British Journal of Haematology, 2007²²⁹

ATT	Localización cromosómica	Frecuencia de expresión descrita en enfermedades	Referencias
<i>SSX</i>	Xp11.23-p11.22	Linfoma	230
<i>SP17</i>	11q24.2	MM; LDCL	221,231
<i>ROPN1</i>	3q21.1	LLC; LMA; MM	232,233
<i>CT45</i>	Xq26.3	LDCL	234
<i>BAGE</i>	21p11.1	MM	222
<i>CAGE1</i>	Xp11.4-p11.2	MM	222
<i>MAGEA</i>	Xq28	MM	224
<i>MAGEC1</i>	Xq26-q27.2	MM	224
<i>NY-ESO-1</i>	Xq28	MM; SMD; LMA	223,235
<i>SLLP1</i>	17q11.2	LMA; LMC; LLC; MM	236
<i>SPANXB</i>	Xq27.1	MM; LMC; LLC; LMA	237
<i>SCP1</i>	1p13-p12	MM; LMC; LMA	238
<i>SEMG1</i>	20q12-q13.2	LMC; LLC; MM	239
<i>HAGE</i>	6q12-q13	LMC	226
<i>PRAME</i>	22q11.22	MM; LMA; LLA; LMC; LLC; SMD	240-243
<i>PASD1</i>	Xq28	LMA; LMC	244
<i>PRM1</i>	16p13.2	LLC	245

LDCL: linfoma difuso de célula grande, LLA: leucemia linfática aguda, LMA: leucemia mieloide aguda, LLC: leucemia linfática crónica, LMC: leucemia mieloide crónica, MM: mieloma múltiple, SMD: síndrome mielodisplásico

4.2 ATTs como potenciales dianas terapéuticas

Un antígeno tumoral, para constituirse en diana terapéutica, debería cumplir una serie de requisitos: i) que se exprese específicamente en las células tumorales y no en las sanas, ii) que se exprese de manera estable u homogénea en todas o la mayoría de las células tumorales, iii) que sea un elemento vital para la supervivencia de la célula tumoral y iv) que pueda ser diana de linfocitos t citotóxicos específicos de ese antígeno tumoral.²¹⁵ La expresión estable y específica de los ATTs en las células tumorales y su falta de expresión en tejido sano las hacen cumplir la primera condición del antígeno tumoral ideal. Basándose en la frecuencia de la expresión de ATTs en función del tipo tumoral, Chen *et al.*, clasificó los distintos tipos de cáncer en: i) asociados a alta expresión de ATTs, que incluye melanoma, cáncer de ovario, de pulmón y de vejiga; ii) asociados a expresión intermedia, cáncer de mama y de próstata y iii) asociados a baja expresión de ATTs, cáncer de colon, leucemia y linfoma.¹⁵²

La expresión de los ATTs en los tumores ha sido correlacionada con la presencia de respuestas específicas a estos antígenos por parte de los linfocitos B y T. Estudios en pacientes adultos han demostrado que células T específicas frente a *MAGEA1* y *MAGEA3* están presentes en casos de melanoma y que, además, este tipo de respuesta específica T puede incrementarse con el uso de una vacuna o con la estimulación *ex vivo*.^{246,247} También se ha comunicado una correlación en la detección de clones específicos de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra *MAGEA3* y la regresión del tumor en pacientes con melanoma.²⁴⁸

En el caso de neoplasias hematológicas, respuestas celulares T citotóxicas frente a *MAGE* y *NY-ESO-1*, se han comunicado en pacientes con LMA.²⁴⁹ Más allá de la inmunidad celular, a nivel serológico, se han detectado anticuerpos específicos frente a *NY-ESO-1* en pacientes con leucemia/linfoma T.²⁵⁰

Estos estudios indican que los ATTs, y más específicamente la familia *MAGE* y *NY-ESO-1* son inmunógenos y capaces de suscitar respuestas tanto T como B.

Se ha comunicado los resultados de ensayos clínicos utilizando vacunas basadas en células dendríticas, en la proteína completa o restringidas al epítipo que se une al HLA para aquellos tumores expresando *MAGEA1* y *MAGEA3*. Como ejemplo de vacuna basada en células dendríticas, MacKensen trató a 14 pacientes con melanoma con una vacuna de células dendríticas frente a *MAGEA1* y *MAGEA3*. Solo se observaron respuestas clínicas e inmunes en 2 pacientes.²⁵¹

Otro estudio utilizó la proteína completa de *NY-ESO-1* en 46 pacientes con tumores sólidos *NY-ESO-1* positiva completamente reseca. Estos investigadores encontraron un mayor título de respuestas de anticuerpos específicos, así como de linfocitos TCD8 Y CD4 frente a una amplia gama de epítopos de *NY-ESO-1*. En este trabajo los autores comunicaron una mayor supervivencia con menor tasa de recaídas en el grupo tratado con vacuna antitumoral.²⁵²

4.3 Combinación con hipometilantes

El éxito de la inmunoterapia depende en gran medida del reconocimiento de las células cancerígenas que expresan ATTs por parte de linfocitos t específicos de estos antígenos, lo que depende a su vez, de la expresión del antígeno y su interacción con el complejo principal de histocompatibilidad (CMH) tipo I y II. Las células tumorales, la hipermetilación de los promotores lleva a la regulación a la baja de los ATTs y también de las moléculas CMH.²⁵³ Ya que no todos los tumores expresan ATTs, un mecanismo para regular al alza su expresión (y la de las moléculas CMH) y por lo tanto incrementar la tasa de muerte de la célula tumoral vía linfocitos T citotóxicos específicos, podría ser revertir la hipermetilación usando agentes demetilantes. La decitabina es un potente inhibidor de la metilación del ADN, y las dosis requeridas para su acción hipometilante son

significativamente menores que aquellas requeridas para su citotoxicidad.²⁵⁴ Son varios los grupos que han demostrado que los agentes demetilantes regulan al alza la expresión de *MAGEA1*, *MAGEA3* y *NY-ESO-1* en líneas celulares de tumor, haciendo a estos cánceres más susceptibles a ser eliminados vía reconocimiento por parte de linfocitos T citotóxicos por parte de estos antígenos.²²⁷ Sigalotti *et al.*, trataron a 33 pacientes con SMD o LMA con decitabina y midieron la expresión de distintos ATTs por RT-qPCR.²⁵⁵ En 31 de los 33 pacientes que no presentaban expresión antes del tratamiento, se observó expresión *de novo* de *MAGEA1* y *NY-ESO-1* 15 días tras el tratamiento.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Aunque la inestabilidad genética es un sello distintivo de los trastornos mieloides, la ausencia de mutaciones somáticas patogénicas recurrentes en la maquinaria de reparación del ADN, ha hecho que el interés y el estudio de estas vías fuesen poco llamativos. Sin embargo, la reciente profundización en el proceso de leucemogénesis, que incluye defectos de *splicing*, influencia de anomalías epigenéticas, y la disponibilidad de la secuenciación de alto rendimiento, nos exige indagar en estas rutas de reparación a lo largo de las neoplasias hematológicas, y en este trabajo en concreto, centrándonos en el espectro mieloides. Con el escaso arsenal terapéutico disponible para estas neoplasias mieloides, los ATTs surgen como candidatos atractivos a ser estudiados para su uso en inmunoterapia.

Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

CAPITULO 1

- i) Estudiar mediante secuenciación masiva y global anomalías en el transcriptoma de los genes implicados en las distintas vías de reparación del ADN en pacientes con LMMC e identificar potenciales candidatos.
- ii) Validar la desregulación de los candidatos en una cohorte de extensión de LMMC, situándola en contexto clínico y genómico.
- iii) Evaluar el comportamiento de los candidatos a lo largo del espectro de las neoplasias mieloides.

CAPITULO 2

- iv) Extender el estudio de secuenciación del transcriptoma de una manera dirigida a los antígenos testiculares tumorales como indicadores de respuesta al tratamiento con agentes hipometilantes, y/o como nuevas dianas a tratar.
- v) Estudiar si los niveles de expresión de los ATTs tienen su reflejo a nivel proteico.
- vi) Comparar la sensibilidad de las aproximaciones global y dirigida de RNA-seq para detectar transcritos de baja expresión.

CAPÍTULO 1

Transcriptoma de los Genes de Reparación del ADN en Leucemia Mielomonocítica Crónica: Dianas de Letalidad Sintética

1.1 Introducción

La reparación defectuosa del ADN es un hecho común en el mayor tipo de cánceres. La presencia de mutaciones en genes que codifican para vías fundamentales en la reparación del ADN son frecuentes en distintos tipos de tumores, la mayor parte de ellos, sólidos.²⁵⁶ La LMMC se caracteriza por una monocitosis absoluta persistente en SP y características patológicas que se solapan entre los SMD y las neoplasias mieloproliferativas crónicas.² Comparada con los SMD y las LMA, la presencia de pérdidas de heterocigosidad debidas a alteraciones cromosómicas detectables por citogenética convencional son mucho menos frecuentes en la LMMC, mientras que las mutaciones puntuales son más comunes. Este hecho nos sugiere que pudieran existir diferentes defectos subyacentes entre las distintas neoplasias hematológicas que dieran lugar a distintos errores genómicos.^{28,29,257}

Las células tumorales que presentan determinados déficits en la reparación del ADN puede que depositen toda su capacidad de supervivencia en el buen funcionamiento de vías de reparación alternativas. Esta dependencia puede ser atacada para inducir letalidad sintética.^{181,258} La ausencia de mutaciones somáticas patogénicas y recurrentes en los componentes de las vías de reparación de ADN en las neoplasias mieloides ha alejado el interés de los investigadores en estos mecanismos.^{41,259,260} Sin embargo, estudios recientes ha revelado la necesidad de mantener un equilibrio preciso a la hora de estimular la maquinaria de reparación de ADN, que podría prevenir la aparición de nuevas mutaciones, pero que también podría evitar la extinción de las células cancerígenas por los agentes terapéuticos.²⁶¹ Anomalías en los factores del espliceosoma y en los microsatélites que alteran el mantenimiento de la integridad genómica, junto a la descripción del fundamento biológico para la combinación de inhibidores de *PARP1* y agentes hipometilantes son dos hallazgos muy recientes que están provocando que de nuevo se acerquen los campos del cáncer mieloides y la reparación de ADN.^{203,262-264}

1.2 Pacientes, material y métodos

Pacientes y variables clínicas

Se obtuvieron muestras de MO de 259 pacientes al diagnóstico y 15 donantes sanos entre los años 2008–2016. Las muestras procedían del Hospital Universitario de Salamanca y del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona (27 casos de LMMC, cohorte de descubrimiento), y del hospital universitario Morales Meseguer (cohorte de validación: 74 casos de LMMC, 70 SMD, 53 LMA y 25 de LMC). Los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2008 y 2016^{100,265} y en cada caso se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo a los protocolos aprobados por cada centro y a la Declaración de Helsinki. Las variables recogidas en los pacientes de LMMC se resumen en la **tabla 1.1**.

Tabla 1.1: Variables recogidas al diagnóstico en la cohorte de pacientes del estudio.

Demográficas	Tratamiento y evolución
<ul style="list-style-type: none"> • Sexo y número de historia clínica • Fecha de nacimiento, fecha de diagnóstico y edad al diagnóstico • Antecedentes oncológicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento específico • Hidroxiurea, dosis diaria, y tiempo de tratamiento. • 5-azacitidina, número de ciclos. • Requerimiento transfusional al diagnóstico. • Dependencia transfusional. • Progresión a LMA, fecha, tratamiento y respuesta. • Trasplante, tipo, acondicionamiento y respuesta. • Exitus, fecha • Tiempo de seguimiento
Clínicas	Clasificación
Antecedentes oncológicos Analíticas <ul style="list-style-type: none"> • Recuento leucocitario (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos) • Hemoglobina, plaquetas y volumen corpuscular medio (VCM) • Lactato deshidrogenasa (LDH), B2 microglobulina, ferritina al diagnóstico y máxima • Hepatomegalia, esplenomegalia Aspirado medular <ul style="list-style-type: none"> • Blastos MO • Blastos SP • CD34+ MO y SP • Disgranulopoyesis, diseritropoyesis, distrombopoyesis • Sideroblastos en anillo Citogenética y biología molecular	<ul style="list-style-type: none"> • OMS • FAB
	Pronóstico
	<ul style="list-style-type: none"> • CPSS • IPSS • IPSS-R

Secuenciación de nueva generación de ARN

El ARN extraído a partir de muestras de MO de los 27 pacientes con LMMC de la cohorte de descubrimiento y de 9 controles sanos se utilizó para secuenciación profunda de nueva generación de ARN (RNA-seq). Se utilizó una plataforma secuenciadora *HiSeq4000* (Illumina, San Diego, CA, EEUU) obteniéndose una media de 106 millones de lecturas por muestra. En cinco pacientes tratados con azacitidina, una segunda muestra de MO en el día +28 del tercer ciclo fue también secuenciada. Utilizamos el paquete estadístico LIMMA y EDGE-R en el análisis diferencial de expresión.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR), Selección de células CD34+ y análisis por citometría de flujo

Los genes expresados de manera diferencial en la cohorte de descubrimiento fueron validados mediante el uso de experimentos de expresión génica usando sondas Taqman™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Sondas comerciales utilizadas en el experimento de validación por RT-qPCR.

Gen	Sonda	Tamaño del amplicón
<i>CDKN1A</i>	Hs00355782_m1	66
<i>PARP1</i>	Hs00242302_m1	111
<i>BAP1</i>	Hs00184962_m1	82

<i>ERCC1</i>	Hs01012158_m1	55
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1	171

Los progenitores hematopoyéticos CD34+ fueron seleccionados tras descongelación de MO criopreservada, utilizando bolas magnéticas en un autoMACs® Pro Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany).

El compartimento granulomonocítico fue cuantificado en la cohorte de descubrimiento mediante la siguiente combinación de anticuerpo-fluorocromo: CD11b-FITC, CD13-PE, CD45-PerCP y CD34-APC, utilizando un citómetro de flujo FACSCanto™II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Análisis de la metilación de ADN por pirosecuenciación

Las secuencias de los cebadores fueron diseñadas para que hibridaran en las regiones libres citosina-fosfato-guanina (CpG) para confirmar la amplificación independiente de metilación (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Secuencias de los cebadores para el experimento de pirosecuenciación

Región CpG	Cebador en posición <i>forward</i>	Cebador en posición <i>reverse</i>	Cebador de se
<i>CDKN1A</i> _CpG_1	GGTGTAGGGAGATTGGTTTAATG	TAAACACCCCAACAAAACATCTTAA	ATTTTTTATTGTGAAAT
<i>CDKN1A</i> _CpG_2.3	AAGGGGGTTTATTTAATAGTGTT	CTTCCCTCCTCCCCAAT	AAAAAGTTAGATTGTGGT
<i>ERCC1</i> _CpG_1.1	TGGTTTTGGAGTTTAAGGAAAGAT	ACCAAATCCTCAAACCACATCT	GATTTTTGTATAATTTTTATGGT

La conversión por bisulfito de 500 ng de ADN de cada muestra se realizó usando el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research, Milán, Italia) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Tan solo aquellos valores medios de metilación dentro de la región analizada que presentaron un coeficiente de variación < 1 fueron aceptados como válidos. Controles que aseguraran una correcta conversión por bisulfito del ADN se incluyeron en cada experimento, así como controles en la secuenciación para confirmar la fidelidad de las medidas.

Secuenciación dirigida del ADN

Diseñamos un panel TruSeq Custom Amplicon (Illumina, San Diego, CA, EEUU) que incluía 18 genes recurrentemente mutados en neoplasias mieloides y que cubría 24975 bases. En algunos genes con regiones donde se concentran las mutaciones somáticas descritas, tan solo esas regiones “hotspot” fueron secuenciadas; en aquellos otros casos en los que las mutaciones descritas estaban ampliamente distribuidas a lo largo de toda la secuencia codificante se diseñó la cobertura de todos los exones (Tabla 1.4). El tamaño medio de cada amplicón fue de 151 pares de bases (pb) y aproximadamente el 99% de las regiones se cubrieron en ambos sentidos. La preparación de las librerías se realizó de

acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación (2x150 pb) de ambos extremos fue realizada con tecnología MiSeq V2.2, con una media de profundidad de 982 lecturas por base.

Tabla 1.4: Diseño de los amplicones de la secuenciación dirigida

GEN	Cromosoma	Exón/es	Amplicones
<i>TET2</i>	4	3–11	97
<i>SRFS2</i>	17	1	5
<i>ASXL1</i>	20	12–13	8
<i>CBL</i>	11	8–9	4
<i>KRAS</i>	12	2–3	4
<i>SETBP1</i>	18	4	4
<i>JAK2</i>	9	12, 14	3
<i>IDH2</i>	15	4	2
<i>U2AF1</i>	21	2, 6	4
<i>NRAS</i>	1	2–3	3
<i>IDH1</i>	2	4	3
<i>TP53</i>	17	2–11	15
<i>FLT3</i>	13	14, 15, 20	5
<i>SF3B1</i>	2	13–16	9
<i>DNMT3A</i>	2	1–23	38
<i>EZH2</i>	7	1–20	32
<i>RUNX1</i>	21	1–12	19
<i>ZRSR2</i>	X	1–11	19
TOTAL			274

Análisis del espliceosoma

Los sitios de *splicing* 3' y 5' alternativos, y las alteraciones en la retención o exclusión de exones, fueron cuantificadas utilizando rMATS utilizando el ensamblaje resultasen del uso del paquete estadístico STAR.²⁶⁶

Los resultados fueron filtrados empleando una tasa de falsos positivos <0.05 y destacando solo aquellas diferencias en cuanto a la inclusión que oscilaran entre >0.05 o <0.05. Los eventos de *splicing* alternativos fueron representados mediante gráficas tipo sashimi utilizando el software MISO.²⁶⁷

Los resultados fueron revisados y filtrados utilizando la herramienta informática Zegami (<http://zegami.com/>).

Bases de datos públicas

Analizamos el perfil de metilación de 22 muestras de MO de pacientes con LMMC y 4 controles sanos procedentes del uso de *microarrays* tipo HumanMethylation27 Beachip, hechos públicos a través del número de acceso Gene Expression Omnibus (GEO) GSE31600.²⁶⁸

Además, datos del transcriptoma obtenidos por *microarray* de los genes de reparación del ADN fueron extraídos de las bases de datos del estudio MILE, hechos públicos a

través de GEO con el número de acceso GSE13204.^{82,269}

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 21.0 Armonk, NY: IBM Corp). Se utilizó el test t-Student o U Mann-Whitney en las comparaciones de las variables cuantitativas entre dos grupos según procediera por el tamaño muestral y la distribución de la variable. Utilizamos el método de Kaplan Meier analizando la supervivencia entre grupos comparándola por el test Log-rank. Establecimos la significación estadística en un valor bilateral de 0.05, excepto para los valores de p en las comparaciones múltiples, donde aplicamos la corrección BonFerroni.

1.3 Resultados

Expresión Global de los Genes de Reparación de ADN en LMMC

Con el fin de investigar de manera detallada el perfil de expresión génica de los genes involucrados en los mecanismos de reparación del ADN, realizamos RNA-seq en muestras de MO de 27 pacientes con LMMC (la cohorte de descubrimiento y 9 controles sanos). Un 66% de la cohorte fueron hombres y la media de edad en los 27 pacientes era de 70 años (63-83).

Los pacientes fueron clasificados, según la OMS 2016, como LMMC-0 (42%), LMMC-1 (35%), LMMC-2 (23%). Con una mediana de seguimiento de 24 meses, se produjeron 16 fallecimientos (59%) y 4 progresiones a LMA (15%). Una descripción completa de las características clínicas y de laboratorio puede verse en la **tabla 1.5**.

Tabla 1.5: Características al diagnóstico de los pacientes con LMMC incluidos en la cohorte de descubrimiento de RNA-seq (n=27) y en la cohorte de validación (n=74).

Variable	Cohorte de descubrimiento (n=27)	Cohorte de Validación (n=74)	
Edad, años, (mediana, rango)	70 (63-83)	75 (44-91)	
Sexo, hombre/mujer, %	67/33	62/38	
Subtipo OMS 2016 %	LMMC-0	42	48
	LMMC-1	35	37
	LMMC-2	23	15
Subtipo FAB, %	LMMC-MD	54	63
	LMMC-MP	46	37
Leucocitos, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	17.5 (2.4-99)	12.5 (2.4-89)	
Monocitos, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	2.9 (1-15.6)	2.1 (1-13.8)	
Hemoglobina, g/dL (mediana, RIQ)	9.4 (7.7-15.6)	10.8 (6.9-16.8)	
Plaquetas, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	147(18-844)	150 (17-874)	

Enfermedad extramedular (%)	37	27
Citogenética, cariotipo anormal (%)	11	9
Blastos en MO (mediana, RIQ)	6 (1-19)	5 (1-19)
Seguimiento, meses (mediana, RIQ)	24 (2-156)	24 (1-156)
Muertes (%)	59	50
Transformaciones leucémicas (%)	15	15

FAB: clasificación Franco-americano-británica, LMMC-MD: leucemia mielomonocítica crónica variante mielodisplásica, LMMC-MP: leucemia mielomonocítica crónica variante mieloproliferativa, OMS: Organización Mundial de la Salud, RIQ: rango intercuartílico

De los 204 genes considerados en este análisis, en 30 de ellos encontramos diferencias en la expresión entre pacientes y controles, con 8 genes sobre-expresados y 20 infra-expresados en los casos comparado con los donantes (**Anexo I: Tabla 1.1**).

Defectos en genes que pertenecen exclusivamente a las vías de reparación de cadena única incluyeron a *NEIL1* y *OGG1* dentro de la vía BER, *XPA* y *MSS19* en la NER, y *RPA4* en la vía MMR. La sobre-expresión de *XRCC4* y *MSH8*, junto a la infra-expresión de *PRKDC* fueron los cambios significativos que se produjeron en componentes exclusivos de las vías de reparación de doble cadena. Los genes que codifican para proteínas multifuncionales, involucradas tanto en roturas de cadena simple como de cadena doble, incluyeron la infra-regulación de *PARP1*, *PNKP*, *LIG1*, *POLE*, *MSH2*, *MDC1*, *FANCD2*, *BLM*, *BAP1*, *POLH* y *MUSH81*; junto a la sobre-expresión de *ERCC1*, *TDP1* y *POLK*.

A continuación, investigamos si los genes que pertenecían exclusivamente a los puntos de control de daño de ADN estaban alterados en estos pacientes con LMMC. Encontramos la infra-expresión de dos sensores de daño de cadena única, *ATRIP* y *RAD9A*; de dos mediadores/efectores *MDC1* y *CDC25B*; y de un promotor del ciclo celular, *CDK2*. Dos inhibidores potentes de las quinasas dependientes de ciclo, *CDKN1A* (también conocida como *p21*) y *CDKN1C*, demostraron un incremento en la expresión de aproximadamente 5 y 2 veces respectivamente, comparado con individuos sanos (**Figura 1.1**). De manera destacada, no encontramos ninguna variante de nucleótido simple no sinónima en los exones (excluyendo a los polimorfismos conocidos) a partir de los datos procedentes de RNA-seq de los 204 genes de las vías de reparación del ADN incluidos en este estudio.

Comparación con el transcriptoma de las vías de reparación de ADN de otras enfermedades mieloides: El estudio MILE

Nos interesaba comparar si los cambios transcripcionales que habíamos identificado en nuestra cohorte de descubrimiento de LMMC estaban presentes también en enfermedades mieloides relacionadas. De tal manera que comparamos nuestros datos de RNA-seq con las bases de datos hechas públicas del estudio MILE,⁸² que comparaba la expresión génica en MO no fraccionada (como es el caso de nuestros experimentos de RNA-seq) mediante el uso de *microarrays* en una variedad de pacientes con neoplasias hematológicas y donantes sanos de MO. Así, extrajimos datos de expresión génica de los mismos componentes de las vías de reparación de ADN de 206 SMD, 351 LMA con cariotipo

normal (LMA-CN), y 48 LMA con cariotipo complejo (LMA-CX). Estos perfiles de expresión fueron comparados con los datos procedentes de 73 controles sanos. De manera sorprendente, las muestras de SMD procedentes del estudio MILE mostraban predominantemente una regulación al alza de la expresión de los genes de reparación de ADN, con 14 de los 20 genes mostrando una expresión más alta que los controles (Figura 2, Anexo I: Tabla 1.2).

Figura 1.1. Perfil del transcriptoma de los genes de la reparación de ADN: diferencias entre controles y pacientes con LMMC. En naranja los genes con sobre-expresión diferencial significativa y los infra-expresados en azul. Las cajas punteadas señalan aquellos genes implicados tanto en lesiones de una cadena como de doble cadena. a) Principales genes implicados en la reparación de lesiones de cadena única; b) genes que participan en los puntos de control; c) principales genes de la reparación de lesiones de cadena doble.

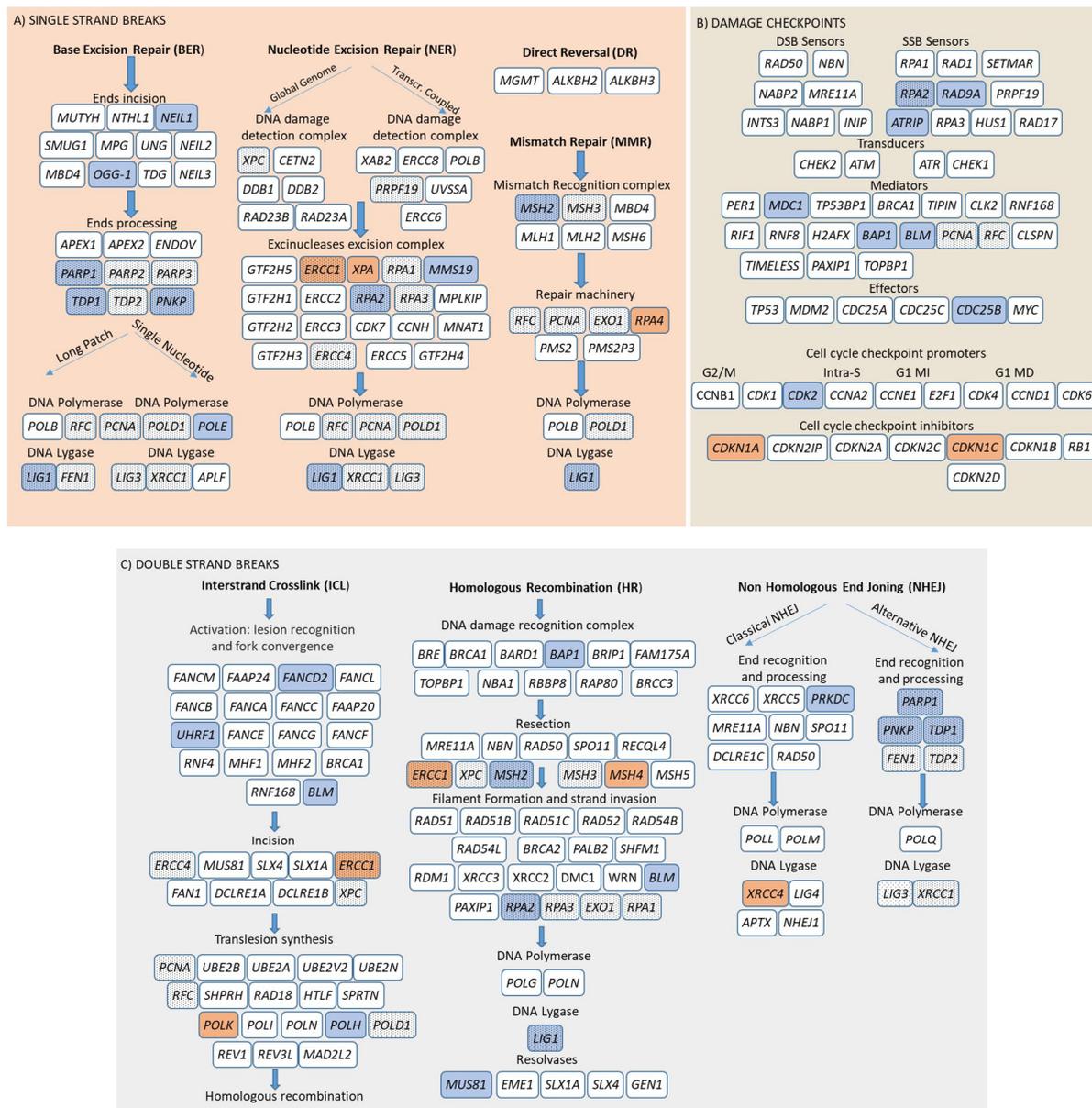
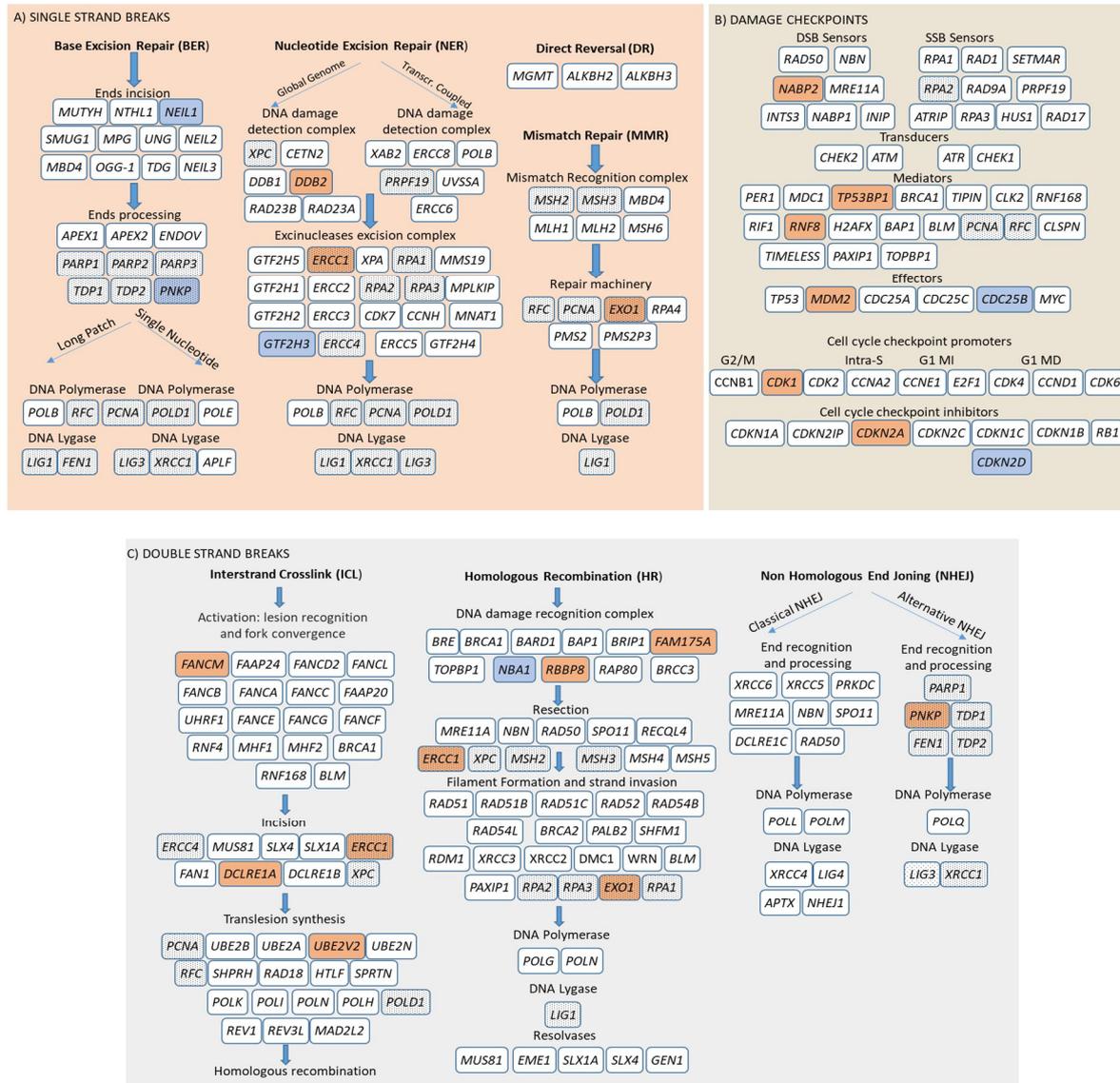
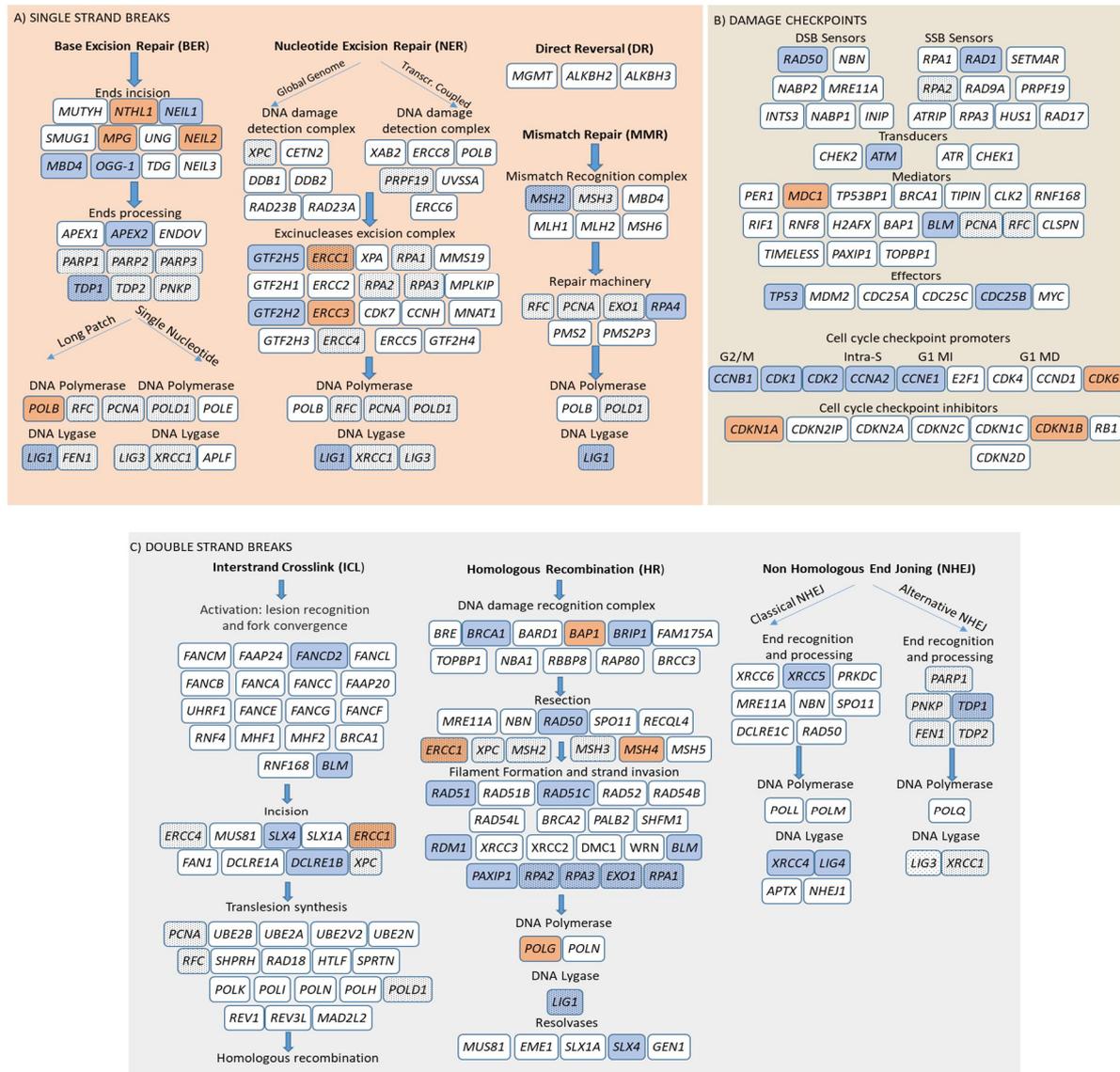


Figura 1.2. Perfil del transcriptoma de los genes de la reparación de ADN extraídos del estudio MILE: diferencias entre controles y pacientes con SMD. En naranja los genes con sobre-expresión diferencial significativa y los infra-expresados en azul. Las cajas punteadas señalan aquellos genes implicados tanto en lesiones de una cadena como de doble cadena. a) Principales genes implicados en la reparación de lesiones de cadena única; b) genes que participan en los puntos de control; c) principales genes de la reparación de lesiones de cadena doble.



Sin embargo, las LMA de cariotipo complejo mostraron un defecto global caracterizado por la infra-expresión de una mayoría de componentes de las vías de reparación de ADN (37 de los 50 genes expresados diferencialmente, estaban infra-expresados) (Figura 1.3, Anexo I: Tabla 1.3).

Figura 1.3. Perfil del transcriptoma de los genes de la reparación de ADN extraídos del estudio MILE: diferencias entre controles y pacientes con LMA-CX. En naranja los genes con sobre-expresión diferencial significativa y los infra-expresados en azul. Las cajas punteadas señalan aquellos genes implicados tanto en lesiones de una cadena como de doble cadena. a) Principales genes implicados en la reparación de lesiones de cadena única; b) genes que participan en los puntos de control: c) principales genes de la reparación de lesiones de cadena doble.

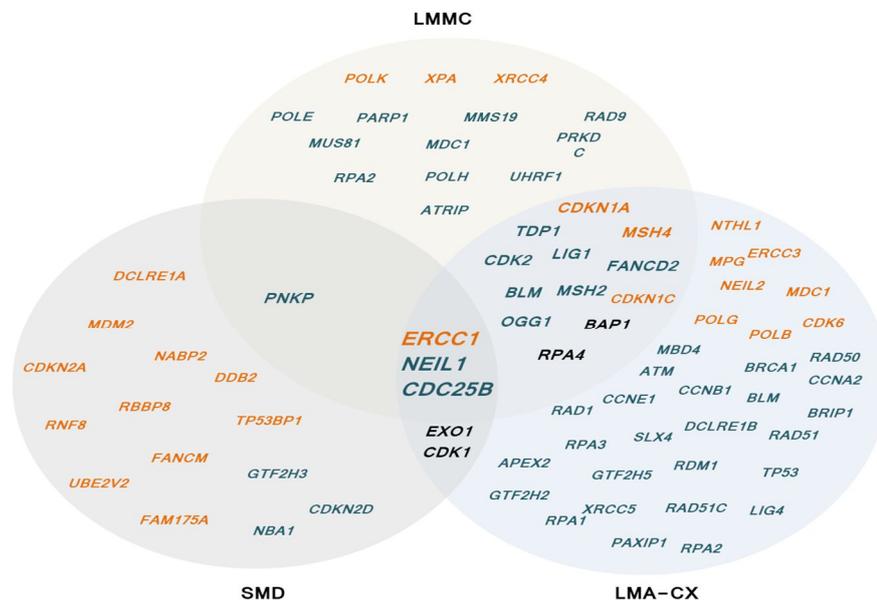


De la comparación de los patrones de expresión de nuestra serie de pacientes con LMMC y de las cohortes con SMD y LMA-CX del estudio MILE, encontramos que tres genes estaban desregulados en el mismo sentido de manera simultánea en las tres cohortes: la sobreexpresión de *ERCC1* y la regulación a la baja de *NEIL1* y de *CDC25B*.

A destacar, varios genes mostraban una expresión diferencial opuesta en función de la enfermedad de base: *BAP1* se encontraba sobre-expresada en la LMA de cariotipo complejo e infra-expresada en los casos de LMMC; mientras que *CDK1* y *EXO1* mostraban

estar sobre-expresadas en mielodisplasia frente a un efecto opuesto entre los casos con LMA-CX. Estos hallazgos sugieren diferencias específicas en el papel patogénico de los defectos en el transcriptoma de los componentes de reparación de ADN dentro de estas entidades clínico patológicas, relacionadas, pero distintas (**Figura 1.4**).

Figura 1.4. Diagrama de Venn mostrando el solapamiento de los genes desregulados entre LMMC, SMD y LMA-CX. El análisis se realizó comparando nuestros datos de LMMC de RNA-seq con los datos extraídos del estudio MILE para los casos de SMD y LMA-CX. Los genes sobre- e infra-regulados aparecen en naranja y azul respectivamente. Los genes en negrita aparecen desregulados en dos entidades pero en direcciones opuestas: *CDK1*(↑ SMD; ↓ LMA-CX), *EXO* (↑SMD; ↓ LMA-CX), *BAP1* (↑LMA-CX; ↓ LMMC) y *RPA4* (↑ LMMC; ↓ LMA-CX). En los pacientes con LMMC se incluyeron aquellos genes expresados diferencialmente con un valor $p \leq 0.05$. Los genes con expresión diferencial entre LMA-CX o SMD y controles se incluyeron si $p \leq 0.01$.



Genes diferencialmente expresados en LMMC candidatos a dianas terapéutica: validación y comportamiento a través del espectro mielóide

Seleccionamos 9 de los 30 genes diferencialmente expresados en el experimento de RNA-seq para ser validados en una cohorte de LMMC independiente y, además, para caracterizar su expresión a través del espectro de neoplasias mieloides. Los genes candidatos para validación se seleccionaron fundamentalmente por criterios clínicos, eligiendo aquellos en los que pudiéramos predecir un alto potencial traslacional o que pudieran completar aproximaciones terapéuticas actualmente en desarrollo. Las categorías seleccionadas fueron : i) oncogenes modulables por farmacoterapia y expresados al alza de manera significativa en nuestros pacientes con LMMC (*CDKN1A*, *ERCC1*), ii)

oncogenes infra-expresados pero con moléculas inhibitorias testadas ya en el ámbito del cáncer (*PARP1*), ²⁰³ y iii) genes infra-expresados cuyas alteraciones han sido previamente relacionadas con la patogénesis en LMMC (*BAP1*). ²⁷⁰

La cohorte de validación de LMMC incluyó a 74 pacientes, cuyas características principales al diagnóstico quedan reflejadas en la **tabla 1.5**. Los niveles de expresión génica para los cuatro genes candidatos fueron cuantificados por RT-qPCR y comparados con los datos de expresión de 9 médulas de donantes sanos. Confirmando los hallazgos en nuestra cohorte de descubrimiento, encontramos una desregulación estadísticamente significativa y concordante en cuanto a la dirección de la misma de los 4 genes candidatos, *CDKN1A*, *ERCC1*, *PARP1* y *BAP1* en la cohorte de validación LMMC independiente sometida a experimentos de RT-qPCR. *CDKN1A* mostró una sobreexpresión de 3 veces mayor que los controles ($p=0.01$), y también se validó la sobreexpresión de *ERCC1* (1.8 logFC frente a controles, $p<0.001$). La infra-expresión de *PARP1* y *BAP1* también mostro significación estadística en el experimento de RT-qPCR en la cohorte de validación comparada con controles (*PARP1*, -0.5 logFC, $p=0.047$; *BAP1*, -0.6 logFC, $p=0.008$) (**Figura 1.5**).

Se podría argumentar que la expresión diferencial en células procedentes de MO en LMMC de nuestros genes candidatos podría ser una característica distintiva del compartimento monocitoide, tanto sano como leucémico, y las diferencias que encontramos se deben, simplemente, a una mayor proporción de células monocíticas en esta enfermedad. Para poner a prueba esta hipótesis medimos mediante citometría de flujo el compartimento mieloide, monocitoide, CD34+ y linfoide en 18 muestras de MO de la cohorte de descubrimiento. El porcentaje mediano del compartimento granulomonocítico era de un 82% que se dividía en un 59% de granulocitos, 22% de monocitos y 0.8% de células CD34+ mieloides. No encontramos ninguna correlación entre el tamaño de estos compartimentos y los niveles de expresión de *CDKN1A*, *ERCC1*, *PARP1* y *BAP1* (**Tabla 1.6**).

Tabla 1.6: Tamaño de los distintos compartimentos celulares en muestras de MO de LMMCs de la cohorte de descubrimiento y análisis de su potencial relación con la expresión de nuestros 4 principales candidatos.

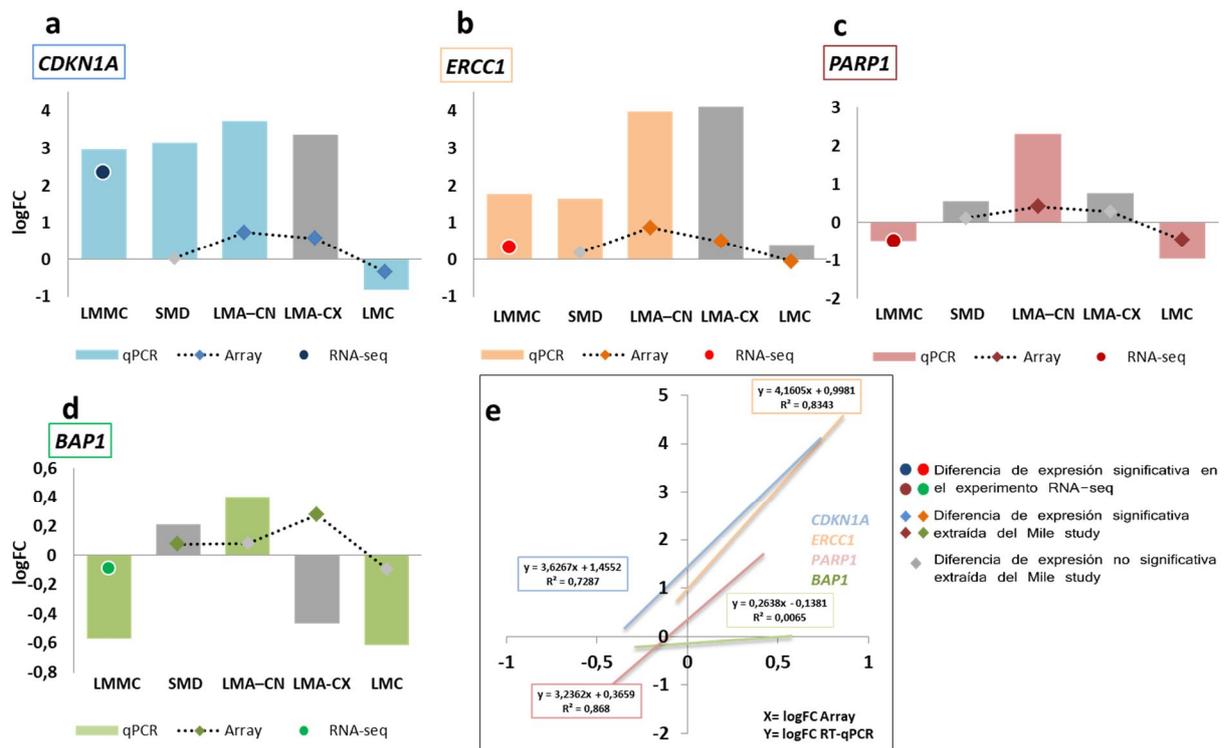
% Compartimento MO (Mediana; RIQ)	<i>CDKN1A</i>		<i>ERCC1</i>		<i>PARP1</i>		<i>BAP1</i>	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
Linfocítico (6.59; 2.7-10)	0.67	0.791	0.03	0.906	0.106	0.675	0.119	0.639
Monocítico (19.4; 9.59-32.38)	0.075	0.766	-0.009	0.971	-0.43	0.075	-0.381	0.119
Mieloide (61.1; 49.6-71.36)	-0.125	0.622	0.154	0.542	0.236	0.345	-0.137	0.587
CD34+ (0.47; 0.33-0.977)	0.098	0.699	-0.055	0.829	0.102	0.687	-0.311	0.21

RIQ: rango intercuartílico, r_s : coeficiente de correlación de Spearman

A continuación, extendimos el análisis de la expresión génica por RT-qPCR de los cuatro genes candidatos a nuestra serie de pacientes con SMD (n=70), LMA (N=53) Y LMC (n=25) (Figura 1.5).

De manera similar a lo que ocurría en los pacientes con LMMC, *ERCC1* mostró estar sobre-expresada en estos otros tres tipos de neoplasias relacionadas, mientras que *CDKN1A* mostro resultados similares con la excepción de la LMC, donde no encontramos diferencias. De manera interesante, *PARP1* y *BAP1* mostraron un sentido distinto de desregulación en LMMC y LMC (infra-expresados) versus SMD o LMA (sobre-expresados). Los datos procedentes del estudio de *microarrays* MILE reprodujeron de forma fiel el sentido de la desregulación encontrada para *PARP1*, *CDKN1A*, *ERCC1* y *BAP1*, en cada una de las entidades analizadas.

Figura 1.5. La desregulación de *CDKN1A*, *ERCC1*, *PARP1* y *BAP1* validada en una cohorte independiente de LMMC y su comportamiento a lo largo de las neoplasias mieloides replicado tanto por una técnica directa como global. Las columnas en cada gráfica muestran los valores de RT-qPCR en logFC en la cohorte de validación, en gris se representan los valores no significativos, en color los significativos (a-d). e) Relación entre RT-qPCR (eje Y) and *microarray* (X) para cada gen.

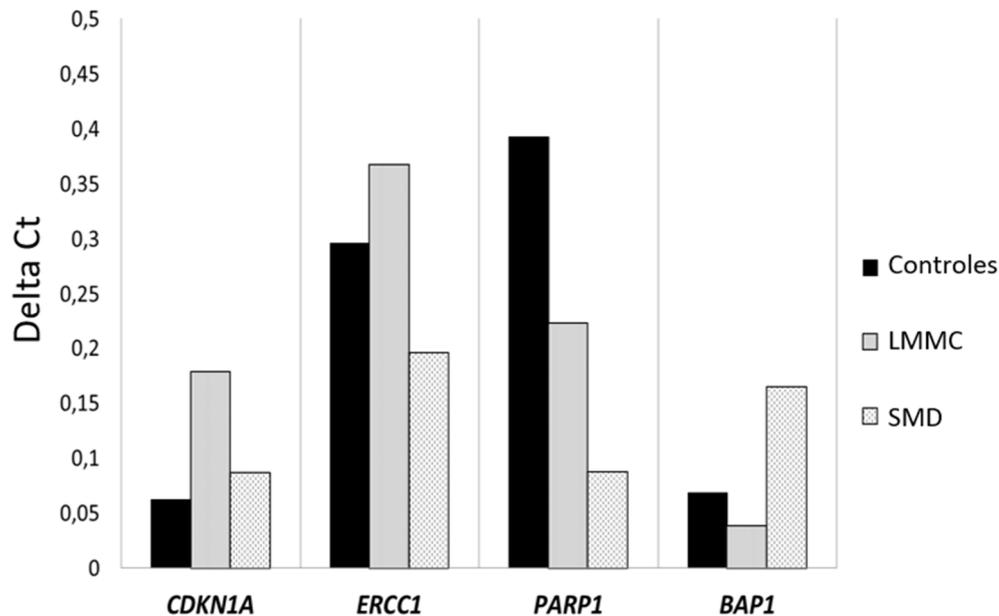


Expresión de *PARP1*, *CDKN1A*, *BAP1*, en LMMC SMD y controles en CD34+.

El ARN total extraído de células CD34+ de MO (con una media de pureza del 95%) de 15 pacientes con LMMC, 15 pacientes con SMD y 15 donantes sanos fue analizado por RT-qPCR. Comparando con células CD34+ de MO de controles confirmamos la

regulación al alza de *CDKN1A* en LMMC (1.5 logFC. p=0.03) y *ERCC1* (0.3 logFC. p=0.04) y la infra-regulación de *PARP1* (-0.6logFC. p=0.02) y de *BAP1* (-0.3log. p=0.04) (Figura 1.6).

Figura 1.6. CD34+ de MO: Expresión de *CDKN1A*, *ERCC1*, *PARP1* y *BAP1* por RT-qPCR en 12 LMMCs, 15 SMD y 15 donantes.



La expresión diferencial de los genes de reparación de ADN en LMMC no está mediada por una metilación aberrante del promotor.

Nos planteamos la hipótesis de que un perfil de metilación del promotor diferente podría explicar las diferencias observadas en cuanto a los genes diferencialmente expresados en LMMC. Para explorar esto cuantificamos el estado metilacional del ADN en 48 sitios CpG, localizados en las regiones promotoras proximales de 26 de los 30 genes diferencialmente expresados en nuestro experimento de RNA-seq. Estos datos fueron extraídos de 22 muestras de LMMC y 4 controles sanos mediante el uso del Human Methylation 27 Beat chip (Anexo I: Tabla 1.4).²⁶⁸ Consideramos un locus génico como no metilado cuando su valor beta era inferior a 0.02. De manera sorprendente, con la excepción de la hipermetilación observada en *MSH4*, cualquier CpG en cualquiera de los otros genes de reparación de ADN analizados, se encontraba no metilada.

Confirmamos por pirosecuenciación el estado no metilado de nuestros candidatos principales para una aproximación letal-sintética: los genes *ERCC1* y *CDKN1A*, considerados fundamentales en la fidelidad de la reparación de las roturas de doble cadena, y que nosotros habíamos encontrado sobre-expresados. La falta de metilación en sus promotores podría añadir otra razón biológica a su potencial incorporación a las drogas utilizadas

actualmente en el tratamiento de estos pacientes, los agentes hipometilantes. El diseño de los experimentos de pirosecuenciación cubría dos regiones en el promotor de *CDKN1A* (incluyendo 5 CpG) y una región en el promotor de *ERCC1* (incluyendo 3 CpG). En consonancia con los datos obtenidos a partir de los datos de *microarray*, todos los CpG analizados mediante pirosecuenciación mostraron encontrarse no metilados tanto en muestras de MO de 56 casos de LMMC como en 16 controles (**Tabla 1.7**).

Tabla 1.7. Estado metilacional de sitios CpG dentro de las regiones promotoras de *ERCC1* y *CDKN1A* por pirosecuenciación en pacientes con LMMC

Sitio CpG	A) Valor β en LMMC (n=56)	B) Valor β en controles (n=16)	p (B vs. A)
<i>CDKN1A_CPG_1</i>	5.472142857	11.548125	0.000
<i>CDKN1A_CPG_2.3</i>	1.154444444	1.73	0.057
<i>CDKN1A_CPG_2.1</i>	1.904081633	2.151538462	0.208
<i>CDKN1A_CPG_2.2</i>	3.171956522	5.28	0.001
<i>CDKN1A_CPG_2.4</i>	1.587142857	1.6	0.973
<i>ERCC1_CPG_1.1</i>	0.974181818	1.124666667	0.034
<i>ERCC1_CPG_1.2</i>	0.182592593	0.46	<0.001
<i>ERCC1_CPG_1.3</i>	0.4125	0.599230769	0.008
MEDIA_REGIÓN_ERCC1	0.521090909	0.805777778	<0.001
MEDIA_REGIÓN_CDKN1A_2	2.002295918	3.001410256	0.007

De esta manera, la metilación de los promotores no parecía ser un mecanismo por el cual los genes de reparación de ADN presentarían una expresión distinta en LMMC frente a los controles. Apoyando estos hallazgos, los pacientes tratados con el agente hipometilante azacitidina por tres ciclos nos mostraron ninguna corrección significativa de la expresión aberrante en ninguno de los genes que habíamos identificado diferencialmente expresados dentro de las vías de reparación de ADN (**Figura 1.7**). Este era el caso tanto para los respondedores como los no respondedores desde un punto de vista clínico.

Mutaciones recurrentes en LMMC y su asociación con genes diferencialmente expresados en las vías de reparación de ADN

A continuación, investigamos si los genes de las vías de reparación de ADN en LMMC se encontraban asociados a un patrón particular de mutaciones recurrentes. Para ello diseñamos un panel de secuenciación de nueva generación dirigido a 18 genes recurrentemente mutados en LMMC y se lo aplicamos a 57 muestras de la cohorte de validación. Encontramos un total de 147 variantes somáticas no sinónimas (**Figura 1.8**), incluyendo las mutaciones y frecuencias típicas asociadas a LMMC: *TET2* (n=82, 77% de los casos mutados), *SRSF2* (n=15, 26%), *ASXL1* (n=9, 16%).

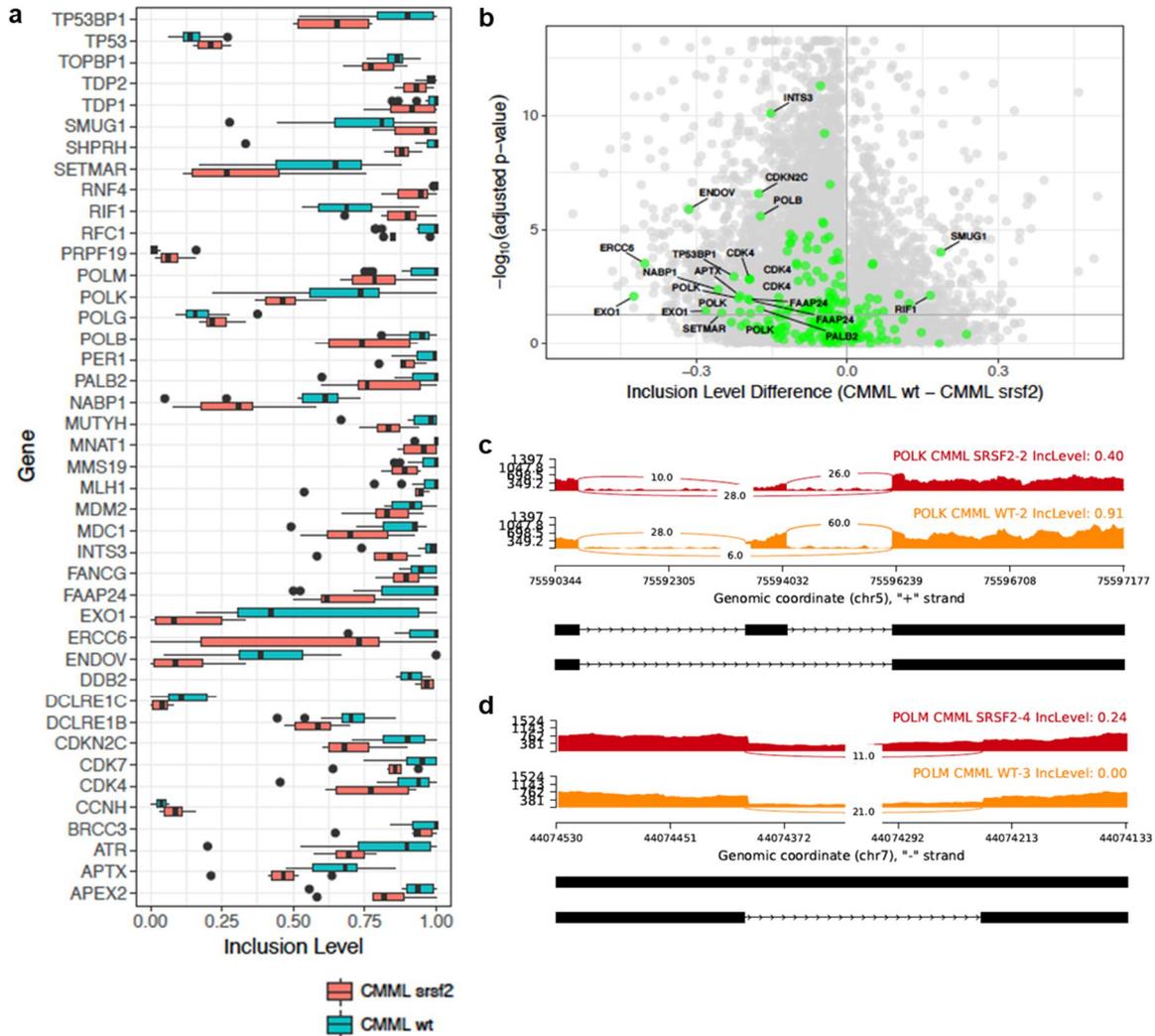
(*ASXL1* y *EZH2*). Encontramos una disminución significativa en la expresión de *PARP1* en aquellos casos mutados para *TET2* ($-0.069 \logFC$, $P=0.02$), y tanto de *CDKN1A* ($-2.5 \logFC$, $p=0.01$) como de *BAP1* ($-0.02 \logFC$, $p=0.04$) en los casos mutados para reguladores de la cromatina. La presencia de una mutación en un factor del espliceosoma no se asoció con ningún perfil de expresión específica para nuestros genes candidatos.

Las mutaciones adquiridas en SRSF2 inducen la aparición de anomalías en el splicing en los genes de reparación de ADN en LMMC

Dado que las mutaciones en los componentes específicos del espliceosoma presentan un impacto distinto en el *splicing* final y que las mutaciones en *SRSF2* son, de lejos, las más comunes de la LMMC,²⁷¹ nos centramos en el análisis de nuestros pacientes con LMMC que portaran la mutación recurrente en *SRSF2* (Pro95) ($n=7$). Comparado con los pacientes sin mutaciones en ninguno de los factores del espliceosoma ($n=13$), al menos 1 evento de *splicing* aberrante y significativo (inclusión mayor o igual de 0.05; $FDR < 0.05$) fue observado para 48 de los 204 genes de reparación de ADN considerados en este estudio (**Figura 1.9**).

La **figura 1.9** nos muestra en su panel **a**) los 42 genes dentro de la reparación del ADN en los que encontramos, de manera estadísticamente significativa, diferencias en los eventos de “salto de exón” al comparar la media de estos eventos en pacientes con LMMC mutados para *SRSF2* ($n=7$; diagrama de cajas rojos) frente aquellos pacientes que no presentaban ninguna mutación en los genes del espliceosoma ($n=14$, diagramas de cajas azules). Se consideró como evento significativo de salto de exón sí tenía lugar con una diferencia en los niveles de inclusión del exón $\geq 0,05$ y una tasa de descubrimiento falso $< 0,05$. Cuando en un mismo gen tenían lugar múltiples eventos de salto de exón afectando a exones diversos, solo el exón afectado con la mayor magnitud de diferencia fue el considerado. Los diagramas de cajas representan el rango intercuartílico y la mediana de los niveles de inclusión del exón. El panel **b**) muestra una gráfica de volcán ilustrando todos los eventos de salto de exón significativos al comparar los casos de LMMC mutados para *SRSF2*, frente a los no mutados para ningún gen del espliceosoma. Los eventos de salto de exón que involucraban a los genes de reparación de ADN están destacados en verde; y aquellos genes afectados de manera significativa han sido etiquetados. Finalmente, en los paneles **c**) y **d**) mostramos las figuras de Sashimi comparando las lecturas procedentes de RNA-seq a lo largo de los sitios de unión del *splicing* para dos pacientes con LMMC, con el objetivo de ejemplarizar dos tipos de eventos de *splicing* alternativo: **c**) evento de salto de exón en *POLK* y **d**) retención intrónica en *POLM*.

Figura 1.9. *Splicing* aberrante de genes de la reparación de ADN en pacientes de LMMC mutados para *SRSF2*.



Los saltos de exón fueron el evento aberrante más común apareciendo en 42 genes, muchos de los cuales mostraban este tipo de alteraciones en múltiples exones. Otros eventos que aparecían de manera significativa incluían: la presencia de exones mutuamente excluyentes ($n=16$ genes), sitios de ajuste alternativos 3' ($n=8$), 5' ($n=1$) y retención de intrones ($n=1$).

Tan solo una minoría de estos eventos aberrantes en el *splicing* ocurrieron en genes diferencialmente expresados en nuestra cohorte de descubrimiento con LMMC: salto de exón en *MDC1*, *POLK* y *TDP1*; exones mutuamente excluyentes en *MDC1* y *POLK*; y sitios de ajuste alternativo en 3' en *POLH* y *XRCC4*. Además, eventos aberrantes del *splicing* con potencial para influir aguas abajo se encontraron en 43 genes de reparación de ADN en los que no habíamos encontrado diferencias en expresión en el experimento RNA-seq.

Asociaciones clínico biológicas de los genes de reparación de ADN de en LMMC

Investigamos las asociaciones de estos genes DE con varios parámetros clínicos en la cohorte de validación de 74 pacientes con LMMC (**Anexo I: Tabla 1.5**). En este sentido los casos con una sobreexpresión e *CDKN1A* se caracterizaron por una menor presencia de anomalías citogenéticas de manera significativa ($p=0.033$).

Se ha descrito previamente que *PARP1* se requiere para la generación de translocaciones cromosómicas.²⁷² Como era esperable, dada su infrarregulación en casos con LMMC, solo en 1 de los 101 casos de nuestras cohortes de descubrimiento y validación se demostró la existencia de una translocación balanceada; este caso era atípico en nuestra cohorte porque fue una de los pocos que presento una sobreexpresión de *PARP1* al compararlo con los controles.

Al extender nuestro análisis a los pacientes con SMD y LMA la expresión de *PARP1* era significativamente superior en los pacientes con translocaciones $n=14$ frente aquellos que no las presentaban $n=97$ ($p=0.03$; tablas suplementarias 16 y 17). Los pacientes con LMA que no alcanzaron remisión completa tras inducción quimioterápica mostraron de manera significativa una mayor expresión de *CDKN1A* (22 FC frente a 11 FC; $P=0.02$) y *ERCC1* (25 FC vs 14 FC, $P=0.03$), comparado con aquellos que alcanzaron de manera exitosa la remisión completa.

1.3 Discusión

Las diferencias en el tipo de lesiones cromosómicas y genómicas a través del espectro de neoplasias mieloides pueden ser el resultado de una diversidad en los defectos subyacentes de la maquinaria de reparación de ADN, lo que podría apuntar a la existencia de dianas específicas dentro de estas enfermedades relacionadas. En este capítulo hemos identificado una serie de genes con expresión desregulada y candidatos a ser diana terapéutica mediante el uso de secuenciación profunda de ARN en una cohorte de descubrimiento de pacientes con LMMC. De manera destacada el patrón de expresión global de los componentes de reparación de ADN en LMMC se diferencia significativamente del que hemos extraído de casos previamente publicados en cohorte de SMD y LMA. Hemos validado los candidatos que hemos seleccionado en células de MO CD34+ de pacientes con LMMC, en una cohorte independiente, y hemos comparado su comportamiento en diferentes enfermedades relacionadas mediante el uso de una técnica directa de RT-qPCR. Más allá de cambios en la expresión del transcriptoma, también observamos la recurrencia de anormalidades en el espliceosoma en pacientes con LMMC, dentro de la vía de reparación del ADN en el caso de que portaran mutaciones adquiridas en el componente del espliceosoma *SRSF2*.

Independientemente de su función como control del ciclo celular, *CDKN1A* ha mostrado ser un regulador del que depende la precisión de los sistemas de reparación de daños de doble cadena y por tanto el mantenimiento de la estabilidad cromosómica.⁴⁰ Nuestros resultados indican una regulación al alza relevante y significativa en la expresión de este

gen en pacientes con LMMC, sin ser específica de esta enfermedad ya que se replica a lo largo del espectro de neoplasias mieloides. Esta sobreexpresión no se correlacionó con la presencia de lesiones en *TP53*, el principal mediador de *CDKN1A*²⁷³ ni por mutaciones ni por alteraciones en la expresión. Así, modular este gen fundamental en la fidelidad de la reparación de doble cadena, a través de su actividad independiente de p53 en células que por otro lado tienen relativamente preservada la vía de reparación de doble cadena, emerge una aproximación factible de tratar la LMMC y otros cánceres mieloides bajo el concepto de letalidad sintética.

ERCC1, que inicialmente se situó dentro de los componentes fundamentales de la vía NER, presenta un papel ubicuo dentro de la respuesta al daño del ADN. Sus defectos son capaces de producir efectos deletéreos y lesiones complejas en el ADN.²⁷⁴ De hecho, la demostración de una mayor sensibilidad a agentes inductores de la vía de reparación de ICL y su papel fundamental en eliminar los extremos no homólogos de los puntos de rotura previamente a que sean conectados de nuevo, establece una función predominante de *ERCC1* en la maquinaria de reparación de las lesiones de doble cadena.²⁷⁵²⁷⁶ En nuestro estudio, el nivel de expresión de *ERCC1* resultó estar incrementado de manera significativa y relevante en pacientes con LMMC y SMD comparado con controles sanos; y este aumento fue incluso superior en los pacientes con LMA. De manera interesante como ocurría con *CDKN1A*, la sobreexpresión de *ERCC1* en los pacientes con LMA se asoció de manera significativa a la no consecución de remisión completa tras quimioterapia de inducción.

La hipermetilación focal del ADN dentro de un contexto de hipometilación global es una característica propia de las neoplasias mieloides, pero estas anomalías en la metilación no son homogéneas a lo largo de las distintas entidades.^{277,278} En nuestra cohorte de pacientes con LMMC, con la excepción de *MSH4*, todos los sitios cPGs en los promotores de los genes que habían demostrado estar diferencialmente expresados en nuestro experimento de RNA-seq presentaron un estatus de no metilación. Además, no observamos una corrección significativa de los cambios en expresión génica tras tres ciclos de azacitidina en una serie limitada de pacientes con LMMC, de manera independiente a que respondieran o no desde el punto de vista clínico. Este hallazgo apoya el hecho de los genes diferencialmente expresados en la maquinaria de reparación de LMMC no dependen de manera exclusiva y directa de este mecanismo de control epigenético, y orienta a que su modulación puede ser una aproximación a tener en cuenta en combinación con los agentes hipometilantes. De hecho, confirmamos mediante estudios de pirosecuenciación de nuestra cohorte el estatus demetilado de los promotores de *ERCC1* y *CDKN1A*.

Recientemente se demostró que los componentes de la vía alternativa de NHEJ son necesarios para que se produzcan translocaciones cromosómicas.²⁷⁹ *PARP1*, el elemento iniciador y limitante de esta vía, es un factor fundamental en el mecanismo molecular que guía a este proceso y su inhibición o represión anula de manera completa la generación

de translocaciones.²⁷² Nuestros hallazgos apoyan estas observaciones básicas: el sentido de la desregulación en la expresión de *PARP1* resultó ser opuesta en los pacientes con SMD y LMA (donde se encontraba sobre-expresado; entidades en las que las translocaciones están presentes en una proporción significativa de casos) comparado con lo que ocurría en nuestra cohorte de LMMC (infra-expresado; ausencia de translocaciones). Estas diferencias específicas de entidad patológica podrían explicar de manera parcial la diferente distribución de las lesiones genómicas observadas, pero, además, subraya la necesidad de que la aproximación terapéutica de estas neoplasias sea también específica de la subentidad a tratar. En 2016, un trabajo *in vitro* estableció los fundamentos biológicos para la combinación de inhibidores de *PARP1* y agentes demetilantes en enfermedades mieloides.²⁰³ Nuestros hallazgos indican que las respuestas a la modulación de *PARP1* podrían ser heterogéneas a lo largo del espectro de neoplasia mieloides, potencialmente menos efectivas en LMMC que aquellos efectos descritos en modelos celulares de SMD y LMA.²⁸⁰

En nuestro estudio detectamos y validamos la infra-expresión significativa de *BAP1* en muestras de pacientes con LMMC; algo que solo compartían los pacientes con LMC a lo largo del espectro de enfermedades mieloides estudiadas. Esta deubiquitinasa se encuentra mutada en varios cánceres de naturaleza hereditaria y su delección se ha asociado con la aparición de características mielodisplásicas/mieloproliferativas.²⁷⁰ La función de *BAP1* está íntimamente relacionada con la de *ASXL1*, gen mutado de manera recurrente en LMMC, y se ha mostrado recientemente que la interacción entre *ASXL1* y *BAP1* se recuperaba en experimentos en los que se corregían los efectos de la mutación de *ASXL1*.²⁸¹ En consonancia con estos estudios, nuestros casos de LMMC mutados para *ASXL1* se caracterizaron por una menor dosis génica de *BAP1*, que alcanzo la significación estadística cuando se combinaron esos casos, con los mutados para *EZH2*, el otro modulador de la cromatina recurrentemente mutado en LMMC. Además, la reducción en el número de transcritos en los pacientes con LMC replica los hallazgos recientemente comunicados.²⁸² A pesar de que el compartimento granulomonocítico representaba, de media, el 82% de las células nucleadas en las muestras de MO que utilizamos en nuestro experimento RNA-seq en la cohorte de descubrimiento LMMC, se podría argumentar que los cambios detectados en la expresión génica pudieran deberse a un reparto anormal de las distintas estirpes celulares. Hemos demostrado, sin embargo, que las alteraciones detectadas mediante el experimento de RNA-seq fueron también validadas en los progenitores hematopoyéticos CD34+ de pacientes con LMMC comparado con controles sanos.

Las mutaciones en los componentes del espliceosoma son comunes dentro de las neoplasias mieloides, pero su papel en la patogénesis no ha sido del todo definido.⁴¹ Hay datos recientes que nos muestran que las mutaciones en *SRSF2*, el factor del espliceosoma más frecuentemente mutado en LMMC, promueve la aparición de alteraciones en el *splicing* y la degradación de los transcritos de *EZH2* en modelos murinos y líneas celulares.²⁸³ Al comparar dentro de nuestra cohorte, aquellos casos mutados para *SRSF2*

frente aquellos no mutados para ningún factor del espliceosoma, solo una minoría de las aberraciones en el *splicing*, afectaban a los genes que habíamos descrito como diferencialmente expresados y, de hecho, no encontramos diferencias en el *splicing* que afectaran a *CDKN1A*, *ERCC1*, *BAP1* y *PARP1*. Sin embargo, en lo que concierne a los genes que no encontramos en nuestro experimento de expresión diferencial, fueron tres componentes de las vías de reparación de cadena única, *EXO1*, *ENDOV* y *ERCC6*, los que mostraron una mayor tasa de salto de exón (más allá de -0.3) en los casos mutados para *SRSF2*, lo que apunta a una preferencia por los defectos deletéreos en los mecanismos de reparación de cadena única en los pacientes con LMMC.

Además, encontramos distintos patrones de desregulación en los genes de reparación del ADN al comparar nuestra cohorte de LMMC con la de SMD y LMA de cariotipo complejo proporcionadas por los investigadores del estudio MILE. Quizás no sorprende, que la alteración global cuantitativa mayor de estas vías de reparación se observara en los pacientes de LMA-CX, donde destacaba una alteración en la expresión de gran parte de los componentes de la vía de recombinación homóloga. Sin embargo, no nos esperábamos una regulación al alza en la expresión génica como principal alteración en la cohorte de pacientes con SMD, que siempre se ha considerado la enfermedad prototípica con hipermetilación.

1.5 Conclusiones

- El perfil de expresión de los genes de reparación de ADN de la LMMC difiere del de la LAM y SMD, con mayor preservación de los genes de reparación de doble cadena.
- Validamos, en una cohorte independiente de LMMC y con técnica distinta, el sentido y desregulación de los principales candidatos: sobreexpresión de *CDKN1A* y *ERCC1* e infra-expresión de *PARP1* y *BAP1*.
- En la extensión de la validación a otras neoplasias mieloides, destacamos la relación de la sobreexpresión de *CDKN1A* y *ERCC1* con quimioresistencia en LAM y la asociación entre la infra-expresión de *PARP1* y la ausencia de translocaciones cromosómicas.
- Los pacientes con LMMC y mutaciones en *SRSF2* presentaban, de manera significativa, un mayor número de anomalías del *splicing* en los genes pertenecientes a las vías de reparación de cadena única.

CAPÍTULO 2

Expresión de Antígenos Tumorales Testiculares al Diagnóstico y tras Azacitidina en Síndromes Mielodisplásicos y Leucemia Mielomonocítica Crónica: Nuevas Dianas de Inmunoterapia Identificadas mediante Secuenciación Dirigida de ARN

2.1. Introducción

La LMMC y los SMD son cánceres que se originan en la célula madre de la MO y que invaden la sangre. Ambas entidades se denominaban “pre-leucemias” durante buena parte del siglo XX y, aunque el término se abandonó por su inexactitud, describe con acierto la oportunidad de estudiar el “germen iniciador” y los posibles esquemas de tratamiento de las leucemias en estas dos entidades.^{284,285}

Fenaux *et al.*, en 2009, demostraron por vez primera, cómo un fármaco era capaz de mejorar la supervivencia en pacientes con LMMC y SMD. Ese fármaco era la azacitidina, un análogo del nucleósido citosina, que ejerce su efecto sobre un mecanismo patogénico predominante en estas enfermedades, la hipermetilación. Inmediatamente, las agencias europeas (EMA) y FDA de control de medicamentos autorizaron su uso en SMD y LMMC con menos del 30% de blastos. Sin embargo, ese estudio pivotal observó un problema práctico en el manejo de estos pacientes: sólo la mitad de los pacientes respondían y esas respuestas requerían de varios ciclos de tratamiento; de hecho, uno de cada cinco pacientes tratados mostraba mejoría hematológica a partir del cuarto ciclo de tratamiento. De manera que, incluso en aquellos pacientes que no se benefician de este tratamiento, se deben dar seis ciclos (seis meses) antes de detener su administración.²⁸⁶ Los ATTs son un grupo de proteínas que sólo se expresan en individuos sanos a muy bajo nivel en tejido testicular. En el resto de tejidos, su expresión ha quedado silenciada por hipermetilación. Sin embargo, muchos de ellos se vuelven a expresar en las células cancerígenas, siendo específicos de cada tumor.²⁸⁷ En LMA se ha demostrado la expresión de un determinado grupo de ATTs.²²⁷ Además, la expresión de estos antígenos se incrementa notablemente si el tumor se hipometila. Por lo tanto, disponemos de unas moléculas que sólo se expresan en las células de patología mieloide y cuyos niveles aumentan si esas células son hipometiladas eficazmente: *a priori*, constituyen los biomarcadores idóneos para predecir la respuesta a azacitidina en estos pacientes. No solo su uso como biomarcadores resulta interesante, también lo es su posible potencial como dianas terapéuticas a tratar en combinación con los agentes hipometilantes.

A pesar de que algunos ATTs sufren una re-expresión en células tumorales, sus niveles de expresión en un experimento de RNA-seq global pueden verse enmascarados, ya que la mayoría de las lecturas van a cubrir a los genes que se expresan en mayor medida.¹⁵⁷ La secuenciación de RNA-seq dirigida nos permite el diseño de un panel exclusivo dirigido a estos transcritos de baja expresión para detectarlos y cuantificarlos.^{288,289}

2.2 Pacientes, material y métodos

Pacientes y variables clínicas

Se obtuvo muestras de SP de 19 pacientes al diagnóstico y en el día +28 tras el

primer ciclo de tratamiento hipometilante con azacitidina en todos los casos, entre los años 2015–2017. Se reclutaron pacientes de los siguientes centros sanitarios: Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, Hospital Virgen del Castillo de Yecla, Hospital Rafael Méndez de Lorca y del Hospital Universitario Morales Meseguer. Los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2008 y 2016 y tratados siguiendo la indicación recogida en las guías de SMD y LMMC del grupo español de SMD (GESMD).^{100,265,290} Los criterios de respuesta son los establecidos por el *International Working Group for the Prognosis of MDS (IWG-MD)* en 2006 (**Tabla 2.1**).²⁹¹

Tabla 2.1. Criterios de respuesta establecidos por el IWG-MD 2006

Categoría	Criterios de respuesta (la respuesta debe durar al menos 4 semanas)
Remisión Completa (RC)	MO: ≤ 5% mieloblastos con maduración normal de todas las líneas celulares Pueden persistir rasgos displásicos SP: Hb≥11 g/dl, plaquetas ≥ 100 x 10 ⁹ /L, neutrófilos ≥ 1.0 x 10 ⁹ /L, blastos=0%
Remisión Parcial (RP)	Todos los criterios de RC si eran anormales antes del tratamiento excepto: -Una disminución de los blastos respecto antes del tratamiento de más de 50%, pero aún con más del 5% Celularidad y morfología no relevante
Respuesta Medular Completa (RC medular)	MO: ≤5% mieloblastos y disminución de ≥ 50% respecto a las cifras pretratamiento SP: En caso de mejora hematológica, debe ser notificada junto a la notificación de respuesta completa medular.
Enfermedad Estable (EE)	Fallo al alcanzar al menos respuesta parcial, pero sin evidencia de progresión durante más de 8 semanas
Fallo	Fallecimiento a lo largo del tratamiento o progresión de la enfermedad caracterizada por un empeoramiento de las citopenias, un aumento de los blastos en MO, o progresión a un subtipo más avanzado de la enfermedad según criterios de la FAB.
Recaída tras RC o RP	Al menos uno de los siguientes criterios: Volver al porcentaje de blastos en MO previo al tratamiento Disminución ≥ 50% del máximo alcanzado en la remisión en los niveles granulocitos o plaquetas Dependencia transfusional o una bajada en la concentración de Hb de ≥ 1,5 g/dL.
Respuesta Citogenética	Completa: Desaparición de las anomalías cromosómicas sin que aparezcan nuevas Parcial: al menos una disminución del 50% de las anomalías cromosómicas
Progresión de la Enfermedad	Para pacientes con: Menos del 5% de blastos: aumento de ≥ 50% respecto a los blastos pretratamiento, siempre que supongan >5% blastos 5%-10% blastos: aumento de ≥ 50% respecto a los blastos pretratamiento, siempre que supongan >10% blastos 10%-20% blastos: aumento de ≥ 50% respecto a los blastos pretratamiento, siempre que supongan > 20% blastos 20%-30% blastos: aumento de ≥ 50% respecto a los blastos pretratamiento, siempre que supongan >30% blastos Cualquiera de los siguientes: Disminución ≥ 50% del máximo alcanzado en la remisión en los niveles granulocitos o plaquetas Disminución de la concentración de Hb en ≥ 2g/dL Dependencia transfusional
Supervivencia	Global: fallecimiento por cualquier causa Libre de evento: fallo o muerte por otra causa Supervivencia libre de progresión: progresión de la enfermedad o muerte por SMD Supervivencia libre de enfermedad: tiempo hasta la recaída Causa específica de muerte: muerte relacionada con el SMD

EE: enfermedad estable, FAB: Franco-Americano-Británico, g/dL: gramos/decilitro, Hb: hemoglobina, MO: médula ósea, RC: remisión completa, RP: remisión parcial, SMD: síndrome mielodisplásico, SP: sangre periférica

En cada caso se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo a los protocolos aprobados por cada centro y a la Declaración de Helsinki. Las variables recogidas en los pacientes se resumen en la **tabla 2.2**.

En todos los pacientes, el esquema de administración de tratamiento de azacitidina fue el mismo: 5-2-2 (5 días consecutivos, seguidos de descanso el fin de semana, seguidos de dos días adicionales). El primer ciclo se administró a la dosis indicada de 75mg/m²/día y los ciclos se planificaron cada 28 días. En caso de toxicidad y/o más de un 50% de descenso en neutrófilos, Hb o plaquetas respecto al anterior ciclo (atribuibles a toxicidad y no a enfermedad de base) se redujo la dosis un 50% y/o se retrasó el siguiente ciclo 14 días.

Tabla 2.2: Variables recogidas al diagnóstico en la cohorte de pacientes del estudio.

<p>Demográficas</p> <ul style="list-style-type: none"> -Sexo -Fecha de nacimiento, fecha de diagnóstico y edad al diagnóstico <p>Clínicas</p> <ul style="list-style-type: none"> -Recuento leucocitario (leucocitos, neutrófilos, monocitos) -Plaquetas -Hb -%Blastos en MO y SP -Presencia y % de SA en MO -Citogenética -Dependencia transfusional de concentrados de hematíes -Dependencia transfusional de concentrados de plaquetas 	<p>Tratamiento y evolución</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ciclos de azacitidina (fecha, dosis) -Reducción de dosis sin motivo -Respuesta a tratamiento -Exitus, fecha -Tiempo de seguimiento <p>Clasificación</p> <ul style="list-style-type: none"> -OMS 2016 -FAB <p>Pronóstico</p> <ul style="list-style-type: none"> -CPSS / IPSS-R
--	---

CPSS: sistema de pronóstico específico para LMMC, FAB: Franco-Americano-Británico, IPSS-R: sistema internacional de pronóstico revisado, Hb: hemoglobina, OMS: Organización Mundial de la Salud, MO: médula ósea, SP: sangre periférica

Secuenciación de nueva generación de ARN dirigida

Se extrajo ARN total a partir de muestras de SP de 19 pacientes con SMD o LMMC en distintos momentos del tratamiento con azacitidina utilizando TRIzol® (*Thermo Fisher Scientific, Madrid, España*) siguiendo las instrucciones del fabricante. En un primer paso, tras la extracción, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-2000 (*Thermo Fisher Scientific, Madrid, España*) para su cuantificación y estudio de la calidad (ratios A260/A280 y A260/A230). Posteriormente, realizamos confirmación de calidad y concentración determinando el número de integridad del ARN (RIN) de cada muestra usando el Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies, California, EEUU*). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. En un tercer análisis de control de calidad de ARN utilizamos la cuantificación por el método Qubit® 3.0 (*Thermo Fisher Scientific, Madrid, España*) que cuenta con un paso de incubación con DNasa y nos permitiría una cuantificación más exacta del ARN.

Diseño del panel dirigido

Para el diseño del panel dirigido a 242 los ATTs previamente descritos (**Tabla 2.3**) se utilizó la herramienta *Ion Ampliseq designer*. La secuenciación de ARN de nueva generación

presenta algunas limitaciones, y el diseño de 32 de los ATTs no fue posible por alguna de las siguientes razones (**Tabla 2.4**): i) región altamente homóloga a otras regiones dentro del mismo genoma, ii) región que presenta largos tramos de un solo nucleótido o cuya secuencia es desconocida o iii) la región presenta demasiados SNPs.

Tabla 2.3: Genes incluidos en el diseño del panel de RNA-seq

<i>ACRBP</i>	<i>CCDC62</i>	<i>CXorf48</i>	<i>GAGE12J</i>	<i>LUZP4</i>	<i>MAGEC1</i>	<i>PBK</i>	<i>RQCD1</i>	<i>SPO11</i>	<i>THEG</i>
<i>ACTL8</i>	<i>CCDC83</i>	<i>CXorf61</i>	<i>GAGE13</i>	<i>LY6K</i>	<i>MAGEC2</i>	<i>PIWIL1</i>	<i>SAGE1</i>	<i>SSX1</i>	<i>TMEFF1</i>
<i>ADAM2</i>	<i>CCNA1</i>	<i>DCAF12</i>	<i>GAGE2A</i>	<i>LYPD6B</i>	<i>MAGEC3</i>	<i>PIWIL2</i>	<i>SEMG1</i>	<i>SSX2</i>	<i>TMEFF2</i>
<i>ADAM29</i>	<i>CEP290</i>	<i>DDX43</i>	<i>GPAT2</i>	<i>MAEL</i>	<i>MORC1</i>	<i>PLAC1</i>	<i>SLCO6A1</i>	<i>SSX2B</i>	<i>TMEM108</i>
<i>AKAP3</i>	<i>CEP55</i>	<i>DDX53</i>	<i>GPATCH2</i>	<i>MAGEA1</i>	<i>NLRP4</i>	<i>POTEA</i>	<i>SPA17</i>	<i>SSX3</i>	<i>TMPRSS12</i>
<i>AKAP4</i>	<i>COX6B2</i>	<i>DKKL1</i>	<i>HEMGN</i>	<i>MAGEA10</i>	<i>NOL4</i>	<i>POTEC</i>	<i>SPACA3</i>	<i>SSX4</i>	<i>TPPP2</i>
<i>ANKRD30BP2</i>	<i>CPXCR1</i>	<i>DMRT1</i>	<i>HORMAD1</i>	<i>MAGEA11</i>	<i>NR6A1</i>	<i>POTED</i>	<i>SPAG1</i>	<i>SSX4B</i>	<i>TPTE</i>
<i>ANKRD45</i>	<i>CRISP2</i>	<i>DNAJB8</i>	<i>HORMAD2</i>	<i>MAGEA12</i>	<i>NUF2</i>	<i>POTEE</i>	<i>SPAG17</i>	<i>SSX5</i>	<i>TSGA10</i>
<i>ARMC3</i>	<i>CSAG1</i>	<i>DPPA2</i>	<i>HSPB9</i>	<i>MAGEA2</i>	<i>ODF1</i>	<i>POTEG</i>	<i>SPAG4</i>	<i>SSX6</i>	<i>TSPY2</i>
<i>ARX</i>	<i>CT45A1</i>	<i>DSCR8</i>	<i>IGF2BP3</i>	<i>MAGEA2B</i>	<i>ODF2</i>	<i>POTEH</i>	<i>SPAG6</i>	<i>SSX7</i>	<i>TSPY3</i>
<i>ATAD2</i>	<i>CT45A3</i>	<i>ELOVL4</i>	<i>IGSF11</i>	<i>MAGEA3</i>	<i>ODF3</i>	<i>PRAME</i>	<i>SPAG8</i>	<i>SYCE1</i>	<i>TSSK6</i>
<i>BAGE2</i>	<i>CT45A4</i>	<i>EPPIN</i>	<i>IL13RA2</i>	<i>MAGEA4</i>	<i>ODF4</i>	<i>PRM1</i>	<i>SPAG9</i>	<i>SYCP1</i>	<i>TTK</i>
<i>BRDT</i>	<i>CT45A5</i>	<i>FAM133A</i>	<i>KDM5B</i>	<i>MAGEA5</i>	<i>OIP5</i>	<i>PRM2</i>	<i>SPANXA2</i>	<i>TAF7L</i>	<i>TULP2</i>
<i>C15orf60</i>	<i>CT47A1</i>	<i>FAM46D</i>	<i>KIAA0100</i>	<i>MAGEA6</i>	<i>OTOA</i>	<i>PRSS50</i>	<i>SPANXD</i>	<i>TAG</i>	<i>VENTXP1</i>
<i>CABYR</i>	<i>CT47A2</i>	<i>FATE1</i>	<i>KIF20B</i>	<i>MAGEA8</i>	<i>PAGE1</i>	<i>PRSS54</i>	<i>SPANXN1</i>	<i>TDRD1</i>	<i>XAGE1C</i>
<i>CAGE1</i>	<i>CT47B1</i>	<i>FBXO39</i>	<i>KIF2C</i>	<i>MAGEA9B</i>	<i>PAGE2</i>	<i>PRSS55</i>	<i>SPANXN2</i>	<i>TDRD6</i>	<i>XAGE2</i>
<i>CALR3</i>	<i>CT62</i>	<i>FMR1NB</i>	<i>LDHC</i>	<i>MAGEB1</i>	<i>PAGE2B</i>	<i>PTPN20A</i>	<i>SPANXN3</i>	<i>TEKT5</i>	<i>XAGE2B</i>
<i>CASC5</i>	<i>CTAGE1</i>	<i>FTHL17</i>	<i>LEMD1</i>	<i>MAGEB2</i>	<i>PAGE3</i>	<i>RBM46</i>	<i>SPANXN4</i>	<i>TEX101</i>	<i>XAGE3</i>
<i>CCDC110</i>	<i>CTAGE5</i>	<i>GAGE1</i>	<i>LIP1</i>	<i>MAGEB3</i>	<i>PAGE4</i>	<i>RGS22</i>	<i>SPANXN5</i>	<i>TEX14</i>	<i>XAGE5</i>
<i>CCDC33</i>	<i>CTCFL</i>	<i>GAGE12C</i>	<i>LOC348120</i>	<i>MAGEB4</i>	<i>PAGE5</i>	<i>RNF17</i>	<i>SPATA19</i>	<i>TEX15</i>	<i>ZNF165</i>
<i>CCDC36</i>	<i>CTNNA2</i>	<i>GAGE12H</i>	<i>LOC647107</i>	<i>MAGEB6</i>	<i>PASD1</i>	<i>ROPN1</i>	<i>SPEF2</i>	<i>TFDP3</i>	<i>ZNF645</i>

Tabla 2.4: Genes que no se incluyen en el experimento final por fallo en el diseño

<i>CSAG2</i>	<i>CT47A3</i>	<i>CT47A9</i>	<i>GAGE12G</i>	<i>SPANXA1</i>	<i>XAGE1D</i>
<i>CT107</i>	<i>CT47A4</i>	<i>CTAG1A</i>	<i>GAGE12I</i>	<i>SPANXB1</i>	<i>XAGE1E</i>
<i>CT45A2</i>	<i>CT47A5</i>	<i>CTAG1B</i>	<i>LAGE-1b</i>	<i>SPANXB2</i>	
<i>CT45A6</i>	<i>CT47A6</i>	<i>GAGE12D</i>	<i>MAGEA9</i>	<i>SPANXC</i>	
<i>CT47A10</i>	<i>CT47A7</i>	<i>GAGE12E</i>	<i>NXF2</i>	<i>XAGE1</i>	

Preparación de las librerías

La generación de las librerías se realizó con Ion AmpliSeq™ RNA Library Kit. Las muestras fueron secuenciadas en paralelo, y se prepararon 3 *pools* constituidos por 17

muestras cada uno, a una concentración final de 100pM medido con el Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies, California, EEUU*).

Secuenciación

La secuenciación dirigida de ARN se llevó a cabo en la plataforma Ion Torrent™ *Personal Genome Machine* (PGM) ® de *Life Technologies* basada en la tecnología de semiconductores. Se utilizaron 3 chips *Ion 318™ Chip Kit v2*. El análisis de calidad de las secuencias, así como el mapeo y el alineamiento de las lecturas se realizó mediante el paquete de *software* Ion Torrent Browser Suite.

Secuenciación de nueva generación de ARN global

Muestras de SP antes del tratamiento y en el día +28 tras el primer ciclo de azactidina se secuenciaron para obtener el transcriptoma completo siguiendo la misma metodología que en el apartado material y métodos del capítulo 1 de este trabajo (página 60), así como el método de análisis.

Secuenciación dirigida del ADN

Se realizó secuenciación dirigida de ADN en 17 de los 19 pacientes. Las condiciones y reactivos empleados para llevar a cabo todos los pasos de la secuenciación fueron los mismos que los descritos en el apartado material y métodos del capítulo 1 de este trabajo (página 61), así como el método de análisis.

Western Blot

En los análisis proteicos se utilizaron tanto muestras de plasma como de lisado celular.

Plasma: Se obtuvo de centrifugar SP (12 mL/sujeto a 2500 x *g*, 15 minutos a temperatura ambiente) recogida de los pacientes pre-tratamiento y previo a cada ciclo de azactidina. Se recuperó el plasma y se hicieron alícuotas y diluciones 1/20 en ddH₂O y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Lisado celular: Una fracción del *buffy coat* obtenido de la centrifugación anterior se destinó a lisado celular. La lisis celular se llevó a cabo en tampón RIPA suplementado con un 1% de inhibidores de proteasas y un 1% de inhibidores de fosfatasa (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) 20 minutos en hielo, y centrifugación posterior a 13000 x *g* a 4°C durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína total en cada muestra mediante el ensayo de BCA (ácido bicinonónico).

Separación de proteínas

La separación de proteínas se llevó a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). El SDS se une a las proteínas y les confiere, de forma proporcional a su masa, una carga negativa, de manera que las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño molecular. Se emplearon geles al 8% o 12% según el

tamaño de la proteína a estudio. En todos los casos se emplearon condiciones reducidas con la adición de ditioneitol (DTT). La muestra, junto con el DTT y el tampón de carga se incubó 5 minutos a 100°C. Se cargó un mínimo de 20 ug totales/muestra de proteína en el caso de los lisados celulares, y diluciones 1/20 de plasma. Se incluyó un marcador de tamaño en cada gel. En el caso de los geles de TFDP3, se utilizó extracto de proteínas nucleares de células de neuroblastoma como control positivo (IMR-32, Santa Cruz Biotechnology). Las condiciones electroforéticas se mantuvieron a 150V en todos los experimentos y una duración variable (60 minutos-90 minutos) en función de la proteína a estudio. Para la transferencia de las proteínas a un soporte sólido se utilizó un método de transferencia semi-seca en membranas de fluoruro de polivinilideno durante 1 hora a 1 mA/cm² (56mA) en tampón de transferencia.

Una vez terminada la transferencia, en el caso de los experimentos con plasma, las membranas pasarán a tinción con rojo *Ponceau*. Tras la transferencia y la tinción con rojo *Ponceau* se lleva a cabo el paso de bloqueo de uniones inespecíficas. Tras el bloqueo se añadieron los anticuerpos primarios, diluidos como se indica en la **tabla 2.5** y se incubaron toda la noche a 4°C. Se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa según correspondiese y se usó el kit de detección de detección ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Madrid, España) en el equipo ImageQuant™ LAS4000 (ExonBiotec, GE Healthcare, Madrid, España). El análisis densitométrico se realizó con el programa de análisis de imagen Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Para la normalización de los valores se utilizó el control endógeno β-actina en el caso de lisados celulares y la tinción con *Ponceau* en el caso de análisis de plasma.

Tabla 2.5. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western Blot.

Anticuerpo	~PM (kDa)	Dilución	
anti-adam29	92	1/500	Life Technologies S.A.
anti-SLCO6A1	80	1/1000	Life Technologies S.A.
anti-DDX53	71	1/1000	Life Technologies S.A.
anti-PRAME	56	1/1000	Life Technologies S.A.
anti-B-ACT	42	1/5000	Sigma-Aldrich
anti-MAGEB4	39	1/1000	Life Technologies S.A.
anti-TFDP3	45	1/500	Santa Cruz Biotechnology

PM: peso molecular, KdA: kilodalton ~: aproximadamente

Análisis estadístico

RNA-seq: Se realizó un pre-procesado de los datos por RMA (*Robust multi-array average*) para la corrección del ruido de fondo. Y normalización de los datos en CPM para poder comparar y analizar en el mismo experimento los distintos *chips* utilizados. ²⁹²

El estudio de expresión diferencial entre grupos (aquellos con cualquier tipo de respuesta vs. no respondedores, expresión pre-tratamiento vs. post-tratamiento y aquellos con respuesta completa vs. resto de respuestas) se llevó a cabo usando LIMMA. Con el objetivo de minimizar los falsos positivos se ajustaron los valores de *p* por contrastes

múltiples con el método propuesto por Benjamini Hochberg.²⁹³

El análisis estadístico entre grupos del resto de variables cualitativas y cuantitativas se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 21.0 Armonk, NY: IBM Corp). Se utilizó el test *t-Student* o *U Mann-Whitney* en las comparaciones de las variables cuantitativas entre dos grupos según procediera por el tamaño muestral y la distribución de la variable. Establecimos la significación estadística en un valor bilateral de 0.05, excepto para los valores de p en las comparaciones múltiples, donde aplicamos la corrección Bonferroni.

2.3 Resultados

Características de los pacientes tratados con azacitidina

Con el fin de estudiar el cambio de expresión de los ATTs en respuesta a agentes hipometilantes, realizamos RNA-seq en muestras de SP de 13 pacientes con SMD y 6 pacientes con LMMC pre-tratamiento y en el día +28 después del primer ciclo de azacitidina. La edad mediana de diagnóstico fue de 70 años en SMD y de 74.5 en LMMC. Los pacientes fueron clasificados, según la OMS 2016, como LMMC-0 (n=2), LMMC-1 (n=2), LMMC-2 (n=2), SMD-DM (n=5), SMD-EB-1 (n= 4) y SMD-EB-2 (n=4). Se utilizaron los modelos pronósticos IPSS-R para determinar el riesgo de los pacientes con SMD (bajo=2, intermedio=1, alto=8, y muy alto=2) y el modelo CPSS para los pacientes con LMMC (bajo=5 y alto=1). Los pacientes con SMD recibieron, de media, 6 ciclos de azacitidina, reduciéndose la dosis a la mitad en 3 casos, y con una mediana de seguimiento de 7.8 meses. En el grupo de LMMC se administraron de media 25 ciclos de azacitidina con una reducción de dosis en dos casos, y una mediana de seguimiento de 29 meses. La reevaluación de la enfermedad se realizó tras 4º y/o 6º ciclo, obteniéndose: en el grupo de SMD 5 respuestas completas, 4 respuestas parciales, y 4 pacientes sin respuesta; y en el grupo de LMMC los 6 pacientes alcanzaron una respuesta parcial. Una descripción completa de las características clínicas y de laboratorio puede verse en la **tabla 2.6**.

Tabla 2.6: Características al diagnóstico de los pacientes con SMD y LMMC incluidos en el estudio.

SMD (n=13)		LMMC (n=6)			
Variable		Variable			
Edad, años (mediana, rango)	70 (60.5-77.5)	Edad, años (mediana, rango)	74.5 (67.2-78.5)		
Sexo, hombre/mujer, n	11 / 2	Sexo, hombre/mujer n	3 / 3		
Leucocitos, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	2.8 (2.1-3.9)	Leucocitos, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	5.6 (2.6-18.3)		
Monocitos, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	0.3 (0.3-0.7)	Monocitos, x10 ⁹ /L (mediana, IQR)	2.4 (1.3-3.2)		
Hb, g/dL (mediana, RIQ)	8.8 (7.8-10.4)	Hb, g/dL (mediana, IQR)	9.3 (8.3-10)		
Plaquetas, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	56 (31-134)	Plaquetas, x10 ⁹ /L (mediana, RIQ)	110 (24.7-142.9)		
Dependencia transfusional de concentrados de plaquetas, n	2	Dependencia transfusional de concentrados de plaquetas, n	2		
Dependencia transfusional de concentrados de hemáties, n	7	Dependencia transfusional de concentrados de hemáties, n	3		
Subtipo OMS, n	SMD-DM	5	Subtipo OMS. n	LMMC-0	2
	SMD-EB-1	4		LMMC-1	2
	SMD-EB-2	4		LMMC-2	2
Subtipo FAB, n	AREB	8	Subtipo FAB. n	LMMC-MD	5
	AR	5		LMMC-MP	1
IPSS-R, n	Bajo	2	CPSS. n	Bajo	5
	Intermedio	1		Alto	1
	Alto	8			1
	Muy Alto	2			1
Citogenética, n	Normal	4	Citogenética. n	Normal	4
	Anormal	9		Anormal	2
Ciclos de azacitidina (mediana, rango)	6 (4-7)	Ciclos de azacitidina (mediana, rango)	25.5 (18.25-34)		
Seguimiento (mediana, rango)	7.8 (5.10-22.20)	Seguimiento (mediana, rango)	29 (21.15-34.96)		
Reducción de dosis a la mitad, n	3	Reducción de dosis a la mitad, n	2		

Perfil de expresión de los ATTs al diagnóstico en SMD y LMMC

La tabla 2.7 muestra los 137 ATTs de los 210 que formaron parte del diseño que se expresaban media de CPM>1 al diagnóstico en nuestra cohorte de 19 pacientes.

Tabla 2.7 ATTs expresados al diagnóstico en SMD y LMMC detectados por RNA-seq dirigido

Gen	CPM Pre	CPM Post	Gen	CPM Pre	CPM Post	Gen	CPM Pre	CPM Post	Gen	CPM Pre	CPM Post
<i>ACTL8</i>	3.07	1.99	<i>DDX53</i>	6.85	8.81	<i>MAGEA4</i>	2.79	2.49	<i>PRM1</i>	3.61	4.55
<i>ADAM2</i>	1.95	2.44	<i>DKKL1</i>	5.89	7.01	<i>MAGEA5</i>	4.21	5.70	<i>RGS22</i>	4.69	4.19
<i>ADAM29</i>	1.75	2.56	<i>DMRT1</i>	2.07	1.92	<i>MAGEA6</i>	2.87	3.58	<i>SAGE1</i>	2.29	1.75
<i>AKAP3</i>	7.27	7.22	<i>DNAJB8</i>	1.01	1.45	<i>MAGEA8</i>	1.83	1.24	<i>SEMG1</i>	7.03	4.99

<i>AKAP4</i>	3.59	3.11	<i>DPPA2</i>	5.19	4.50	<i>MAGEA9B</i>	3.35	4.64	<i>SPACA3</i>	3.43	4.05
<i>ANKRD45</i>	4.81	4.43	<i>DSCR8</i>	2.29	2.73	<i>MAGEB1</i>	0.80	0.70	<i>SPAG17</i>	3.49	3.07
<i>ARMC3</i>	8.62	8.59	<i>ELOVL4</i>	9.52	9.87	<i>MAGEB2</i>	1.94	1.10	<i>SPAG4</i>	8.25	6.81
<i>ARX</i>	4.97	4.69	<i>FAM133A</i>	5.58	5.54	<i>MAGEB3</i>	1.87	2.62	<i>SPAG6</i>	6.45	5.51
<i>BAGE2</i>	16.78	16.85	<i>FAM46D</i>	2.09	2.73	<i>MAGEB4</i>	6.06	8.59	<i>SPAG8</i>	8.28	8.38
<i>BRDT</i>	5.42	5.27	<i>FATE1</i>	1.90	1.86	<i>MAGEC1</i>	3.20	3.62	<i>SPANXN2</i>	1.78	1.42
<i>C15orf60</i>	3.88	2.70	<i>FBXO39</i>	8.48	8.29	<i>MAGEC2</i>	1.78	1.51	<i>SSX2</i>	4.31	3.64
<i>CABYR</i>	8.07	7.92	<i>FMR1NB</i>	6.89	6.70	<i>MAGEC3</i>	1.02	1.33	<i>SSX3</i>	4.31	3.90
<i>CAGE1</i>	2.11	3.11	<i>FTHL17</i>	1.56	1.61	<i>MORC1</i>	6.29	6.40	<i>SSX4</i>	1.97	2.12
<i>CALR3</i>	4.89	4.99	<i>GAGE12C</i>	4.11	3.84	<i>NLRP4</i>	5.22	4.40	<i>SSX4B</i>	4.45	3.01
<i>CASC5</i>	10.91	11.03	<i>GAGE12H</i>	4.56	4.27	<i>ODF3</i>	1.79	1.65	<i>SSX6</i>	1.81	1.40
<i>CCDC110</i>	6.28	6.04	<i>GAGE12J</i>	4.12	4.16	<i>ODF4</i>	2.53	3.82	<i>SSX7</i>	1.55	1.59
<i>CCDC33</i>	2.76	2.46	<i>GAGE13</i>	3.74	3.45	<i>OIP5</i>	9.90	9.64	<i>TAF7L</i>	4.13	4.77
<i>CCDC36</i>	7.42	6.06	<i>GAGE2A</i>	6.51	5.31	<i>OTOA</i>	6.09	5.23	<i>TDRD1</i>	7.13	7.12
<i>CCDC62</i>	7.94	7.05	<i>HORMAD1</i>	12.56	12.27	<i>PAGE1</i>	2.35	1.89	<i>TDRD6</i>	3.83	3.86
<i>CCDC83</i>	1.67	1.70	<i>HSPB9</i>	11.53	11.31	<i>PAGE2</i>	6.89	7.04	<i>TEKT5</i>	4.74	4.09
<i>CEP55</i>	10.65	11.12	<i>IGSF11</i>	6.06	6.20	<i>PAGE2B</i>	6.21	6.45	<i>TEX101</i>	7.22	7.71
<i>COX6B2</i>	8.07	7.82	<i>IL13RA2</i>	4.00	3.34	<i>PAGE4</i>	2.19	2.80	<i>TEX14</i>	6.68	6.19
<i>CPXCR1</i>	1.74	2.18	<i>LDHC</i>	5.72	5.39	<i>PAGE5</i>	5.30	5.69	<i>TEX15</i>	6.50	6.61
<i>CSAG1</i>	4.20	3.90	<i>LEMD1</i>	1.13	0.88	<i>PASD1</i>	1.22	1.37	<i>TFDP3</i>	4.38	7.20
<i>CT45A1</i>	2.78	3.58	<i>LIP1</i>	2.37	2.68	<i>PBK</i>	8.49	8.19	<i>THEG</i>	1.01	0.43
<i>CT45A4</i>	2.41	3.15	<i>LY6K</i>	2.93	1.40	<i>PIWIL1</i>	2.03	1.51	<i>TMEFF1</i>	12.04	11.87
<i>CT45A5</i>	4.91	5.55	<i>MAEL</i>	5.31	5.99	<i>PIWIL2</i>	7.81	7.65	<i>TMEFF2</i>	5.42	5.12
<i>CT47A1</i>	1.32	1.23	<i>MAGEA1</i>	2.97	2.79	<i>PLAC1</i>	4.46	4.13	<i>TMEM108</i>	5.24	4.06
<i>CT47B1</i>	1.44	1.07	<i>MAGEA10</i>	2.05	2.79	<i>POTEA</i>	4.04	3.30	<i>TPTE</i>	1.82	1.28
<i>CT62</i>	1.72	1.80	<i>MAGEA11</i>	3.03	4.30	<i>POTEC</i>	4.89	3.97	<i>TSGA10</i>	10.57	10.78
<i>CTAGE1</i>	10.96	10.95	<i>MAGEA12</i>	1.52	1.02	<i>POTED</i>	4.25	3.22	<i>TTK</i>	10.87	10.29
<i>CTCFL</i>	2.53	2.45	<i>MAGEA2</i>	2.14	1.58	<i>POTEE</i>	4.18	3.16	<i>TULP2</i>	4.05	3.08
<i>CTNNA2</i>	4.94	5.35	<i>MAGEA2B</i>	2.00	2.09	<i>POTEG</i>	3.58	2.77	<i>VENTXP1</i>	3.58	5.56
<i>DDX43</i>	9.77	9.72	<i>MAGEA3</i>	2.97	3.68	<i>POTEH</i>	3.83	3.12	<i>XAGE2</i>	4.52	4.92
									<i>ZNF165</i>	8.93	8.45

El transcriptoma completo de 11 de estos pacientes antes y después de tratamiento hipometilante fue analizado también, en las mismas muestras, por secuenciación de RNA-seq no dirigido. Extrajimos los ATTs comunes que fueron estudiados en ambos experimentos, un total de 203 genes. De estos 203 genes, en 181 se detectó expresión mediante RNA-seq dirigido, bien al diagnóstico o tras un ciclo de hipometilante. De estos 203 genes el método de RNA-seq global se detectó expresión, bien al diagnóstico o tras un ciclo de hipometilantes en tan solo 53 ATTs. En 16 de los ATTs no se detectó expresión en ninguna de las técnicas (Figura 2.1).

Figura 2.1: Comparación en la detección de expresión para 203 ATTs en función de la técnica de RNA-seq dirigida.



Expresión diferencial de los ATTs entre las muestras pre-tratamiento y post-tratamiento

Para las comparaciones globales de expresión de los ATTs antes y después del tratamiento, hicimos cuatro grupos de respuesta; los respondedores completos (RC), los respondedores parciales (RP); aquellos que tuvieron cualquier tipo de respuesta (RC+RP), y los no respondedores (NR).

La **figura 2.2** muestra los ATTs de los que obtuvimos una expresión diferencial ($p < 0.05$, $FC \pm 1$) tras un primer ciclo de azacitidina en cada una de las comparaciones realizadas: a) todos los pacientes, b) no respondedores, c) en el grupo con cualquier tipo de

respuesta, d) en el grupo de pacientes con respuesta parcial y e) el grupo de pacientes que alcanzaron respuesta completa. Sin embargo, no observamos ningún ATT con cambio significativo en la expresión tras el primer ciclo de azacitidina en el grupo de los que no obtuvieron ningún tipo de respuesta. Destacamos a *ADAM29* como el ATT que se re-expresaba en el grupo de pacientes que habían alcanzado respuesta completa y que además presentaba con un incremento significativo tras tratamiento en el resto de grupos, a excepción de los pacientes que no habían respondido. (Figura 2.2 y 2.3b). Es en el grupo de los pacientes que alcanzan respuesta completa, donde un mayor grupo de ATTs se re-expresaron (n=14) (Figura 2.3b).

Desde el punto de vista cuantitativo los mayores incrementos de expresión tras un ciclo de azacitidina se dieron en los 5 pacientes que alcanzaron respuesta completa en la reevaluación tras el 4º o 6º ciclo. En concreto los tres ATTs que mostraron un mayor cambio al alza en la expresión en estos respondedores completos fueron: *TFDP3*, *DDX53* *VENTPX1*, *DDX53* y *MAGEB4*.

Figura 2.2 ATTs expresados al diagnóstico que presentan un cambio significativo en la expresión tras primer ciclo de azacitidina. Los criterios de inclusión son los descritos en el texto. a) todos los pacientes, b) no respondedores, c) en el grupo con cualquier tipo de respuesta, d) en el grupo de pacientes con respuesta parcial y e) el grupo de pacientes que alcanzaron respuesta completa.

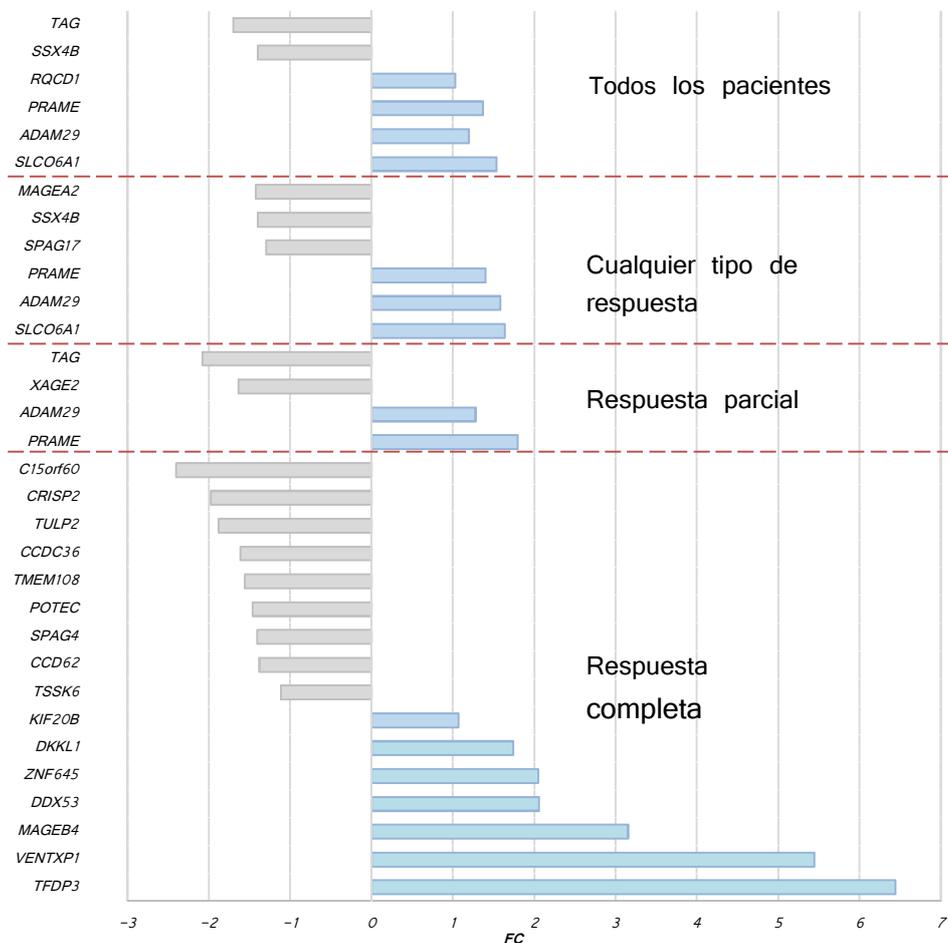
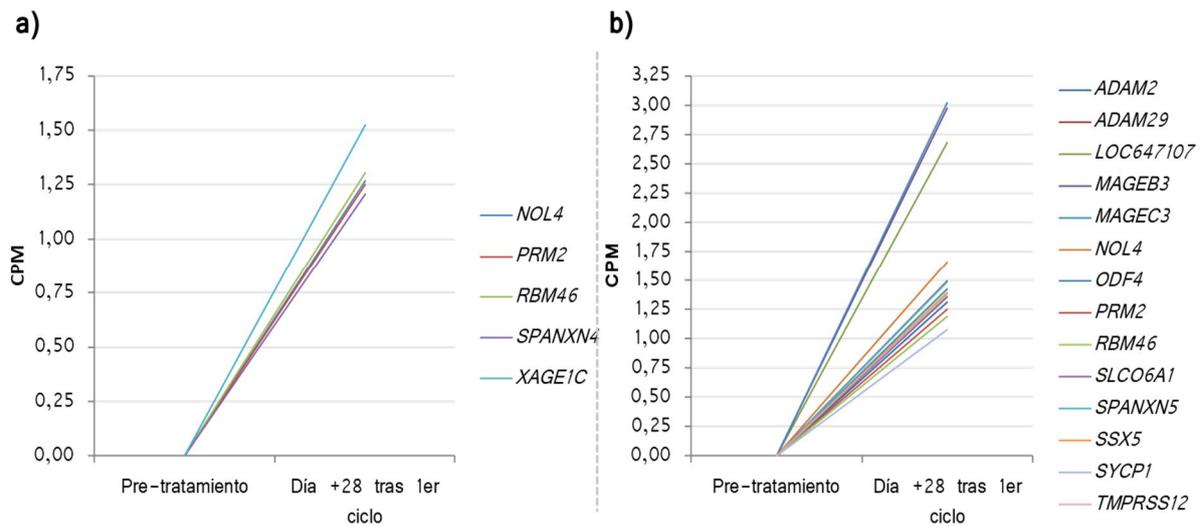


Figura 2.3: ATTs que no expresan al diagnóstico (CPM<1) pero experimentan un expresión *de novo* en a) todos los pacientes y b) solo en pacientes que alcanza RC.



A partir de los datos anteriores establecimos unos criterios a cumplir por los genes candidatos que someteríamos a validación a nivel proteico:

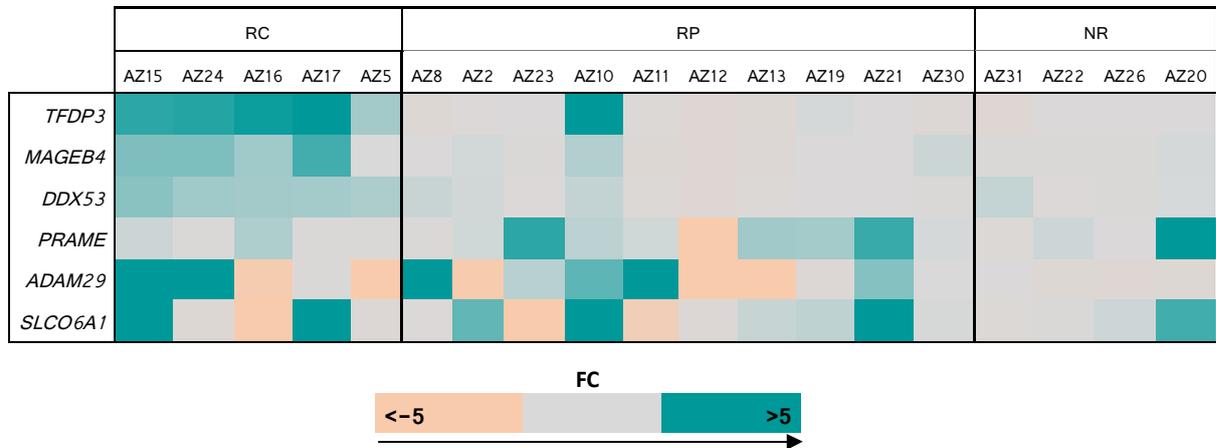
i) Que se expresarán *de novo* en los pacientes que alcanzaron respuesta completa tras un ciclo de azacitidina, y que además tuviesen un incremento significativo en el resto de grupos con respuesta. **ADAM29**

ii) ATTs expresados al diagnóstico en los que tras un primer ciclo de azacitidina se produjo un mayor incremento significativo de expresión tras azacitidina en el grupo de los pacientes que alcanzaron finalmente respuesta completa. **TFDP3, DDX53, VENTPX1, MAGEB4.**

iii) Aquellos ATTs que, expresándose al diagnóstico, tuvieran un mayor incremento significativo de expresión en la cohorte total. **PRAME y SLCO6A1**

El siguiente paso, después del cribado por grupos de respuesta, antes de la validación proteica fue comprobar la disponibilidad de anticuerpos comerciales diseñados. En el caso de *VENTPX1* no pudimos conseguir un anticuerpo específico, por lo que lo descartamos de los estudios proteicos (**Tabla 2.5**). Posteriormente queríamos ver el comportamiento de cada candidato en cada paciente, sin agruparlos. En el *heatmap* de la **figura 2.4**, observamos como código de colores, los cambios de expresión que se producen tras un ciclo de tratamiento en cada uno de los pacientes. Se puede observar como los pacientes que alcanzaron respuesta, de forma individual cada uno de ellos, son los que más incremento de expresión muestran tras el primer ciclo de tratamiento con azacitidina.

Figura 2.4. Heatmap del cambio de expresión por paciente (FC) en los genes candidatos a validación proteica.

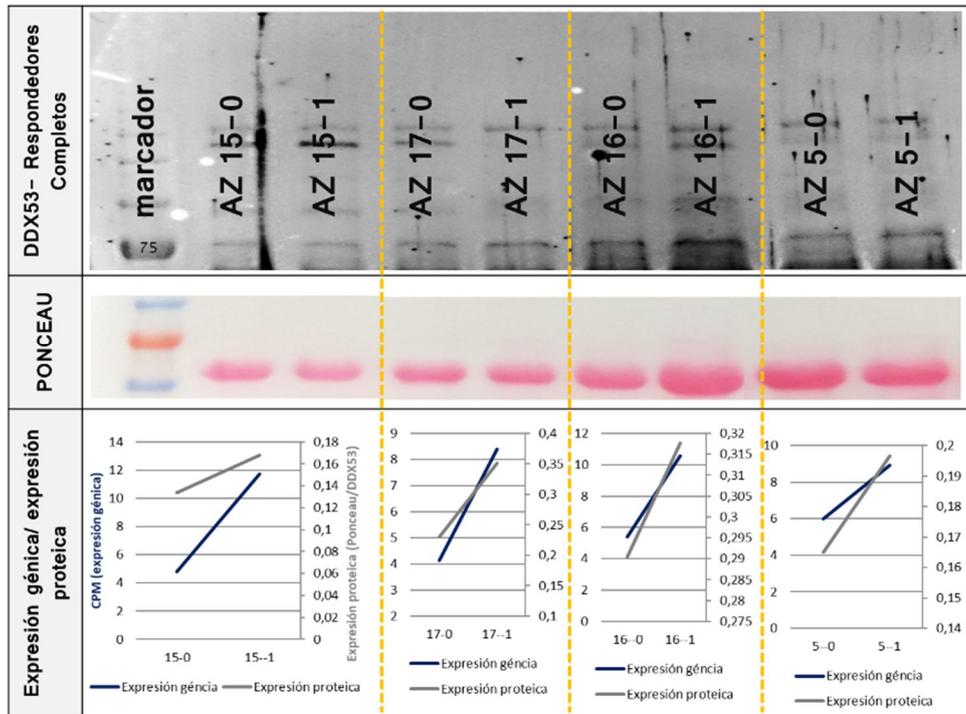


NR: pacientes que no alcanzaron ningún tipo de respuesta, RC: pacientes con respuesta completa, RP: pacientes con respuesta parcial

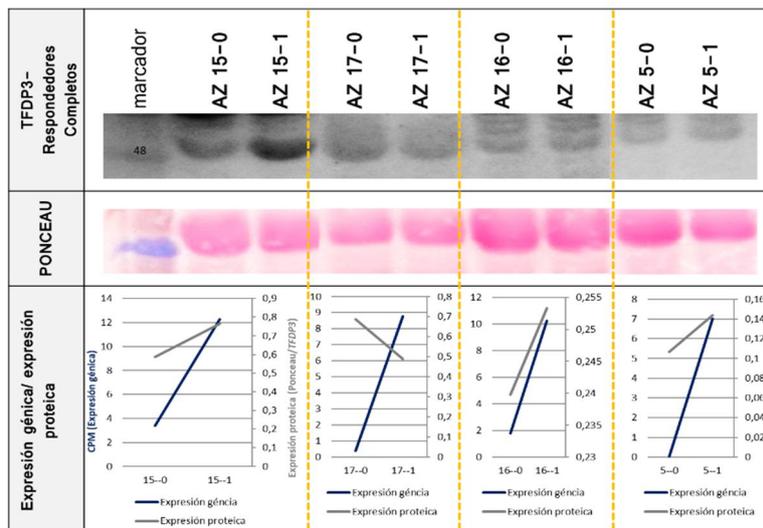
Los principales objetivos de la validación proteica fueron dos: i) estudiar si existía cantidad detectable de proteína que pudiese darnos candidatos de inmunoterapia, al poder producir respuesta inmunógena y, ii) estudiar si la dinámica de los niveles de expresión tenía su reflejo a nivel proteico. En la **figura 2.5** se observan nuestros dos candidatos principales, *DDX53* y *TFDP3*, en los que fuimos capaces de detectar proteína, y además mostraban un comportamiento paralelo en la expresión génica y proteica en plasma. En todos los geles, utilizamos la tinción con rojo Ponceau como control de carga, y normalizamos los datos de proteína detectada frente a la banda elegida como control de carga de la tinción con rojo Ponceau. la cantidad de proteína detectada con respecto a la cantidad cargada. En cuanto al estudio en el lisado proteico, solo pudimos estudiar dos casos para *TFDP3*, por la falta de disponibilidad de material. En esos casos la dinámica entre la expresión génica y proteica era similar a la observada en plasma, pero con una mayor intensidad de bandas. En la validación del resto de genes: *PRAME*, *SLCO6A1*, *ADAM29* y *MAGEB4*, observamos niveles proteicos detectables, pero sin una clara correlación con los niveles de expresión génica.

2.5 Validación a nivel proteico de la dinámica encontrada en los principales genes candidatos en el experimento de RNA-seq dirigido.

a) DDX53 en plasma



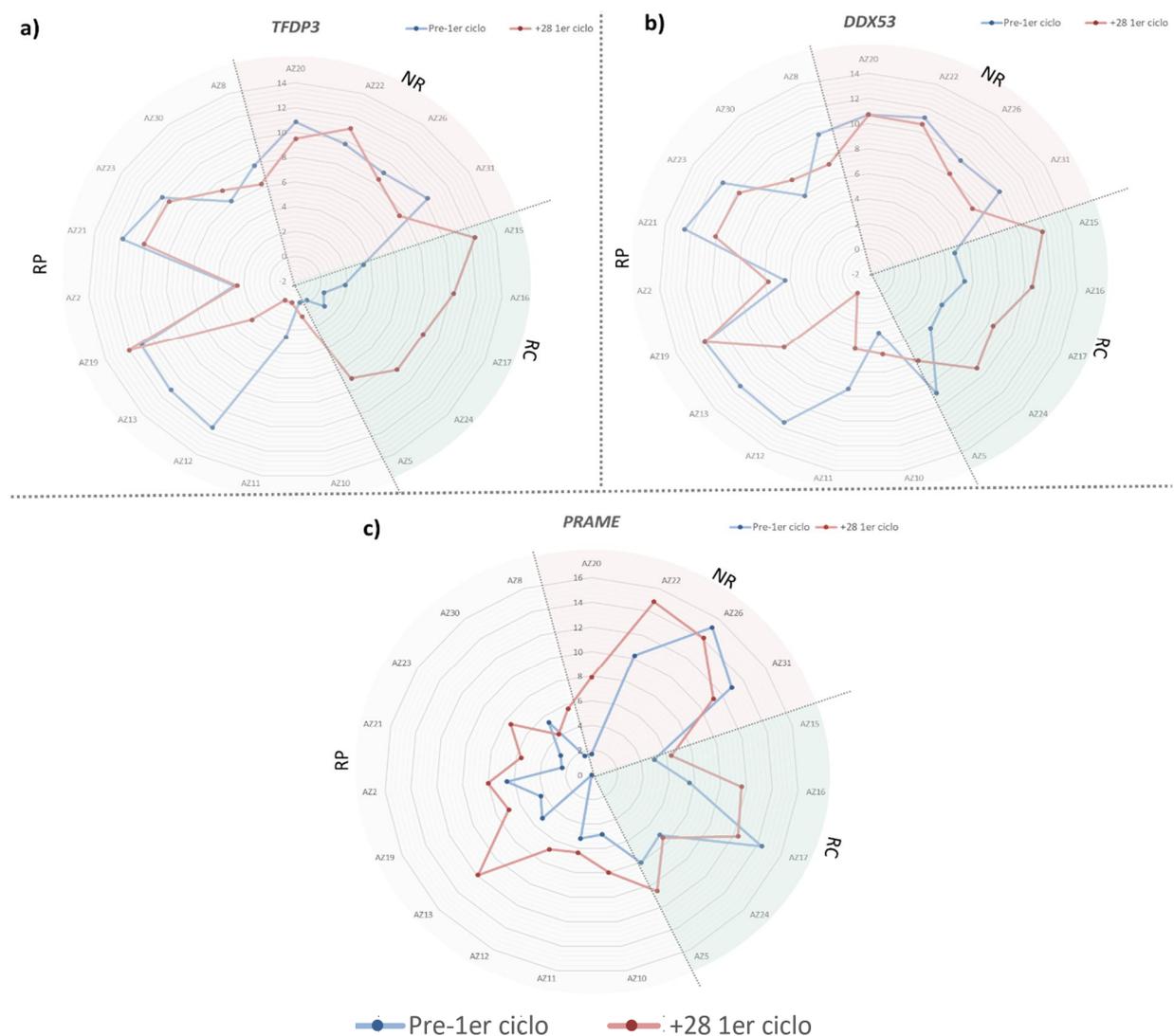
b) TFDP3 en plasma



Comportamiento individual y por grupos de respuesta de la expresión de *TFDP3*, *DDX53* y *PRAME*.

La **figura 2.6** muestra como el cambio significativo de expresión en el grupo de pacientes que alcanzaron respuesta completa en el caso de *TFDP3* y *DDX53* se basó, fundamentalmente en una muy baja expresión al diagnóstico, seguida de un incremento significativo tras el primer ciclo de azacitidina. En esta parte, estudiamos también a *PRAME*, ya que es uno de los ATTs más estudiados y caracterizados en las neoplasias hematológicas. Como puede verse en la **figura 2.6c**, *PRAME* es en el grupo de los pacientes que no alcanzaron respuesta donde más alta tiene su expresión antes del tratamiento, y aumenta tras el primer ciclo en la mayoría de los pacientes. Se aprecia el incremento significativo en todos los pacientes del grupo de respondedores completos del caso de *TFDP3* y de *DDX53* (**Figura 2.6a** y **2.6b**).

Figura 2.6. Gráficos radiales mostrando los niveles de expresión (CPM) pre-tratamiento (línea azul) y en el día +28 tras el primer ciclo de azacitidina (línea roja).



NR: no respondedores, pre: pre-tratamiento, RC: respuesta completa, RP: respuesta parcial

Mutaciones recurrentes somáticas y su asociación con respuesta al tratamiento y expresión de antígenos testiculares tumorales

Para caracterizar los pacientes del estudio a nivel mutacional, o diseñamos un panel de secuenciación de nueva generación dirigido a 18 genes recurrentemente mutados en LMMC y SMD y se lo aplicamos a 17 muestras (11 SMD y 6 LMMC). Encontramos un total de 29 variantes somáticas no sinónimas (**Figura 2.7**), incluyendo las mutaciones y frecuencias típicas asociadas a SMD y LMMC: *TET2* (n=8, 22.2% de los casos mutados), *ASXL1* (n=5, 18.5%) *SRSF2* (n=3, 11.1%), *RUNX1* (n=3, 11.1%), *TP53* (n=3, 11.1%), *NRAS* (n=2, 7.4%) y *SETBP1*, *JAK2*, *EZH2*, *ZRSR2* e *IDH1* (n=1, 3.7%). Debido al limitado número de pacientes no pudimos establecer asociaciones robustas entre respuesta a tratamiento y perfil mutacional, ni asociarlos significativamente a la expresión de ATTs.

Figura 2.7: Mutaciones de los genes recurrentemente mutados en 11 pacientes diagnosticados de SMD y 6 de LMMC.

	SMD											LMMC					
	AZ2	AZ21	AZ20	AZ15	AZ26	AZ22	AZ17	AZ30	AZ 31	AZ 24	AZ16	AZ11	AZ13	AZ12	AZ23	AZ8	AZ19
<i>TET2</i>	2											2					
<i>ASXL1</i>																	
<i>SRSF2</i>																	
<i>RUNX1</i>																	
<i>NRAS</i>																	
<i>TP53</i>																	
<i>SETBP1</i>																	
<i>JAK2</i>																	
<i>EZH2</i>																	
<i>ZRSR2</i>																	
<i>IDH1</i>																	
<i>CBL</i>																	
<i>KRAS</i>																	
<i>IDH2</i>																	
<i>U2AF1</i>																	
<i>FLT3</i>																	
<i>SF3B1</i>																	
<i>DNMT3A</i>																	
NO MUTACIÓN																	
OMS2016																	
FAB																	
CPSS/IPSS																	
CITOGENETICA																	
RESPUESTA																	

CLASIFICACIÓN OMS	LMMC-0	SMD
	LMMC-1	SMD-EB-2
	LMMC-2	SMD-DM
CLASIFICACIÓN FAB	LMMC	SMD
	MD	AREB
	MP	AR

CPSS	BAJO	IPSS	BAJO
	I1		INTERMEDIO
	I2		ALTO
	ALTO		MUY ALTO

CITOGENETICA	NORMAL
	ANORMAL
RESPUESTA	NR
	RP
	RC

2.4 Discusión

En este segundo capítulo del trabajo de tesis nos servimos de que el tratamiento actual de los SMD o LMMC de alto riesgo incluye hipometilantes en primera línea para estudiar el perfil de los antígenos tumorales testiculares antes y después de tratamiento y, para ello, utilizamos una técnica de secuenciación de ARN dirigida a este grupo de transcritos de baja expresión. Hemos definido el perfil de expresión de ATTs en SMD y LMMC al diagnóstico y destacamos el significativo incremento de expresión de dos de ellos, *TFDP3* y *DDX53* en aquellos pacientes con mejor respuesta a hipometilantes, postulándolos no sólo como potenciales biomarcadores sino como susceptibles de ser dianas inmunoterapéuticas.

El desarrollo de los métodos de secuenciación de nueva generación ha dado lugar a posibilidades no conocidas en cuanto a la caracterización del genoma y ha dado lugar a un avance sin precedentes en el conocimiento de su estructura y evolución. Las tecnologías NGS se usan para la secuenciación *de novo* de genomas extensos,²⁹⁴ conocer las diferencias entre individuos de la misma especie,²⁹⁵ para determinar los cambios genómicos a lo largo del curso natural de una enfermedad,⁶⁹ o para establecer perfiles globales de modificaciones epigenéticas.²⁹⁶ Una de las aplicaciones de NGS que ha cambiado el paradigma establecido es su uso para entender la complejidad del transcriptoma, desde la caracterización de las distintas isoformas, de nuevas uniones de *splicing*, regiones intragénicas expresadas hasta la determinación de la expresión distinta de cada uno de los alelos.^{297,298} La secuenciación de ARN de alto rendimiento, conocida como RNA-seq, ha ido situándose como el método preferido por los investigadores para cuantificar la expresión génica, ya que el número de lecturas secuenciadas de un transcrito es una estimación natural del nivel de expresión de esa característica.²⁹⁹

Aunque las ventajas de una cuantificación directa de transcritos frente a los *microarray* y RT-qPCR quedaron de manifiesto ya al inicio del uso de la técnica,³⁰⁰ también han ido detectándose algunas limitaciones. La naturaleza de la NGS, basada en lecturas cortas, hace inevitable que aquellos transcritos de mayor longitud sean detectados con mayor frecuencia que los transcritos cortos. Otro aspecto importante es la profundidad que se le otorga al experimento. Los transcritos más expresados serán más detectados de manera proporcional. Ello llevó al uso de secuenciación muy profunda para intentar detectar transcritos cuya expresión es muy baja. Sin embargo, se ha visto que, a mayor número de lecturas secuenciadas, la cantidad de “ruido de fondo” y artefactos potenciales también aumenta.³⁰¹ Con el fin de intentar superar estas limitaciones, se han desarrollado técnicas de secuenciación dirigida, de “captura” o usando amplicones, de alto rendimiento que han probado alcanzar resultados relevantes al centrarse, exclusivamente, en un número limitado de moléculas. Bajo esas condiciones, la cobertura y detección de esos transcritos “raros”

mejora enormemente y, por tanto, su detección.¹⁵⁷ Los objetivos del segundo capítulo de este trabajo cumplían las condiciones para que utilizáramos una aproximación dirigida. Existe un número discreto pero elevado de ATTs descritos y su expresión, medida con diversas técnicas en la literatura, es muy baja o ausente. En nuestro experimento, considerando como expresión detectable aquellos ATTs que en los que se obtuviera más de un CPM de media entre las réplicas, encontramos que al diagnóstico de SMD y LMMC se expresaban 187 de 210 medidos.

Además, disponer de datos de RNA-seq global en 12 de los casos, nos permitió comparar, como objetivo secundario del trabajo, esta tecnología con nuestro panel “customizado” de ATTs. En el 81% de los genes considerados no expresados en el experimento de RNA-seq global, encontramos expresión relevante al usar la aproximación dirigida.

En 12 ATTs encontramos un descenso significativo en la expresión tras el primer ciclo de azacitidina. Ya ha sido sugerido previamente que, para algunos ATTs, el grado de metilación puede no ser su principal mecanismo de regulación. De hecho, algunos ATTs muestran un patrón de expresión aún más restringido, a un tipo de tumor específico, lo que sugiere que requieren la presencia de factores de transcripción propios del tumor además de demetilación de los promotores para permitir una transcripción estable.^{302,303} Van Tongelen *et al.*, agruparon a este grupo de ATTs cuya expresión no depende de la metilación, y encontraron que la mayoría de estos genes compartían el ser expresados después de iniciada la meiosis.^{304,305}

En la investigación del cáncer ha sido constante la búsqueda de antígenos propios del tumor que pudieran ser utilizados para dirigir sobre ellos las capacidades citolíticas de nuestro sistema inmune.^{306,307} El antígeno tumoral ideal para ser atacado con inmunoterapia debería ser expresado de manera estable por el tumor, no expresarse en tejidos sanos y ser crucial para la supervivencia de la célula cancerígena. Los antígenos tumorales testiculares presentes, fundamentalmente, en tejido germinal y en tumores, cumple esas premisas.³⁰⁸ Además, el descubrimiento progresivo de sus funciones celulares apoya la teoría de que la expresión aberrante en tumores de estos genes germinales refleja la activación del programa gametogénico en células somáticas, programa que comparte muchas de las características biológicas con la oncogénesis (división, proliferación, propagación).²¹⁵ Los antígenos tumorales testiculares son un grupo de proteínas codificadas por 276 genes, englobando a más de 70 familias.²¹² Aproximadamente la mitad se encuentran localizados en el cromosoma X, fundamentalmente entre las bandas Xq24-q28.³⁰⁹ En nuestro objetivo de perfilar la expresión de estos antígenos en SMD y LMMC, encontramos que 187 ATTs se expresaban ya al diagnóstico y 192 tras tratamiento hipometilante. Además, ya que las discrepancias entre la expresión de ARN y la proteica es un fenómeno frecuente, quisimos completar nuestro estudio confirmando, en las mismas

muestras, que esa expresión o re-expresión del mRNA de los ATTs, se correspondía con la presencia o incremento de la proteína.

TFDP3 y *DDX53*, ambos ATTs asociados al cromosoma X, emergieron como principales candidatos a diana terapéutica en este trabajo, al cumplir dos condiciones: i) re-expresión significativa en aquellos pacientes que alcanzaron RC con tratamiento hipometilante, ii) dinámica similar a nivel proteico a lo observado a nivel de ARN. Estudios previos han demostrado como *TFDP3* se expresa en tejido germinal y en determinados tejidos tumorales, incluyendo cerebro, esófago, mama y melanoma.³¹⁰⁻³¹² Además, también se ha definido parcialmente su función en la célula, comportándose como un inhibidor de E2F1, un regulador, a su vez, de los mecanismos de apoptosis y proliferación celular dependientes de *TP53*.³¹³ Al antígeno tumoral *DDX53*, también llamado *CAGE*, le ha sido atribuido el papel de promover la angiogénesis tumoral en el periodo embrionario y también durante la oncogénesis. La expresión de este gen se ha descrito en cáncer gástrico, de endometrio y se ha comunicado su ausencia en líneas celulares de leucemia.³¹⁴ Este gen codifica una proteína con un dominio *DEAD box*, lo que sugiere que tenga actividad helicasa de ARN. La proteína se localiza principalmente en el núcleo, pero datos recientes indican que puede ser secretada al espacio extracelular. Experimentos en los que se añadió *DDX53* recombinante al medio de cultivo de células endoteliales mostraron un incremento en la capacidad de invasión de estas.³¹⁵

Como vemos, para ambos candidatos se ha definido su papel en la supervivencia de la célula tumoral. Pero si los ATTs han despertado el interés de la comunidad científica ha sido, fundamentalmente, por su capacidad potencial para desencadenar una respuesta inmune significativa. En ese sentido, *DDX53* se considera un gen absolutamente restringido a tejido germinal o tumoral, lo que lo hace aún más prometedor en cuanto a su potencial inmunógeno. Desde su descubrimiento, muchos ATTs han mostrado dar lugar a una respuesta inmune dirigida. De hecho, el primer ATT identificado, *MAGEA1*, fue descubierto debido a su habilidad para inducir una respuesta linfocitaria T citotóxica en un paciente con melanoma.²⁰⁹ Desde entonces, otros ATTs han sido descritos como inmunógenos, incluyendo *SSX2*, *NY-ESO-1* y varios miembros de las familias *BAGE*, *GAGE* y *MAGE*.^{309,316} Los ensayos clínicos actuales que contemplan el empleo de vacunas dirigidas contra ATTs han evolucionado considerablemente en su diseño respecto a hace una década, tanto en el descubrimiento y síntesis de los péptidos como en la formulación de las vacunas. Actualmente, se dispone del uso de péptidos de diseño personalizado, vectores bacterianos, o tratamiento combinado, tanto con inhibidores de mTOR, como con agentes demetilantes.³¹⁷ Por otro lado, y dentro del campo de las vacunas anti-cáncer, existen números ensayos fase II evaluando la eficacia y seguridad de las vacunas de células dendríticas. La generación de células dendríticas *ex vivo* y la carga de las mismas con antígeno ha permitido utilizarlas con éxito en la vacunación para mejorar la inmunidad de pacientes con cáncer, dando así la prueba preliminar de su validez.³¹⁸ Sin embargo, el

posicionamiento destacado de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer en la última década ha ido de la mano de la ingeniería genética de los linfocitos T. En el campo de los ATTs, linfocitos T modificados frente a epítomos específicos de NY-ESO-1 han mostrado mejorar las respuestas clínicas y la supervivencia global en pacientes con melanoma refractario y sarcoma sinovial.^{319,320} En la actualidad, se ha puesto en marcha un ensayo clínico, reclutando pacientes con LMA y SMD para ser tratados con linfocitos T modificados contra PRAME y NY-ESO-1 (NCT02494167 H-36346).

En resumen, el uso de un diseño dirigido nos ha permitido explotar la capacidad de secuenciación de alto rendimiento de ARN para la descripción al diagnóstico y tras tratamiento demetilante de un gran número de ATTs. Encontramos un número discreto de genes, expresados a nivel muy bajo pre-tratamiento, pero con incremento muy significativo tras un ciclo de azacitidina en pacientes que alcanzaron respuesta completa. La validación de esa dinámica a nivel proteico los confirma como candidatos a inmunoterapia.

2.5 Conclusiones

- **El uso de una técnica de secuenciación dirigida nos ha permitido ampliar y completar el perfil de expresión global de los antígenos tumorales al diagnóstico en SMD y LMMC.**
- **Hemos confirmado, en las mismas muestras, la mayor sensibilidad de una aproximación dirigida frente a una global del uso de RNA-seq para genes de baja expresión.**
- ***TFDP3* y *DDX53*, re-expresados de manera significativa tras tratamiento hipometilante en pacientes con respuesta completa y con dinámica similar a nivel proteico emergen como dianas inmunoterapéuticas a explorar.**

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- We uncovered different patterns of DNA repair gene misregulation, with a relative preservation of double strand break repair pathways, when comparing our CMML cohort with the MDS and ckAML subsets of the MILE study. These differences could explain, in part, the different spectrum of chromosomal and gene-level defects found among those entities.
- We found, and independently validated, *BAP1* and PARP1 down-regulation to be specific to CMML compared with other related disorders; and a significant over-expression of the double strand break-fidelity genes *CDKN1A* and *ERCC1*, independent of promoter methylation, emerging as therapeutic targets.
- Using a targeted RNA-seq approach, we have comprehensively described the cancer testis antigen expression profile in MDS and CMML patients at baseline. Its comparison with our global RNA-seq database from the same samples, allowed us to confirm a significant better sensitivity of the targeted approach for low expression transcripts.
- *TFDP3* and *DDX53* significantly increased their expression after one cycle of azacitidine, mainly in those patients who achieved a complete response after 4-6 cycles of treatment. and showed a similar proteomic dynamic, fulfilling criteria as potential candidates for an immunotherapeutic approach.

REFERENCIAS

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–2405.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008. 439 p.
3. Goldberg SL, Chen E, Corral M, et al. Incidence and Clinical Complications of Myelodysplastic Syndromes Among United States Medicare Beneficiaries. *J Clin Oncol* 2010;28(17):2847–2852.
4. Cogle CR, Craig BM, Rollison DE, List AF. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood* 2011;117(26):7121–5.
5. Such E, Germing U, Malcovati L, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121(15):3005–15.
6. Adès L, Sekeres MA, Wolfrohm A, et al. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. *Leuk Res* 2013;37(6):609–613.
7. Williamson PJ, Kruger AR, Reynolds PJ, Hamblin TJ, Oscier DG. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1994;87(4):743–5.
8. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001–2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 2008;112(1):45–52.
9. Kohlmann A, Grossmann V, Klein H-U, 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;28(24):3858–3865.
10. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2013;28:241–247.
11. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J Clin Oncol* 2012;30(8):820–829.
12. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007;110(13):4385–4395.
13. Tiu R V., Gondek LP, O’Keefe CL, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* 2011;117(17):4552–4560.
14. Mallo M, Arenillas L, Espinet B, et al. Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic

- evidence of 5q-. *Haematologica* 2008;93(7):1001–1008.
15. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 2012;120(12):2454–2465.
 16. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89(6):2079–88.
 17. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Dambrosio I, Zappatore R. Validation of the new comprehensive cytogenetic scoring system (NCCSS) on 630 consecutive de novo MDS patients from a single institution. *Am J Hematol* 2013;88(2):120–9.
 18. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, et al. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia* 2005;19(8):1424–31.
 19. Boulwood J, Fidler C, Strickson AJ, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 2002;99(12):4638–41.
 20. Schneider RK, Schenone M, Ferreira MV, et al. Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nat Med* 2016;22(3):288–97.
 21. Schneider RK, Ademà V, Heckl D, et al. Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell* 2014;26(4):509–20.
 22. Fink EC, Ebert BL. The novel mechanism of lenalidomide activity. *Blood* 2015;126(21):2366–9.
 23. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med* 2010;16(1):49–58.
 24. Varney ME, Niederkorn M, Konno H, et al. Loss of Tifab, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor-TRAF6 signaling. *J Exp Med* 2015;212(11):1967–85.
 25. Venner CP, Woltosz JW, Nevill TJ, et al. Correlation of clinical response and response duration with miR-145 induction by lenalidomide in CD34(+) cells from patients with del(5q) myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2013;98(3):409–13.
 26. McNerney ME, Brown CD, Wang X, et al. CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(6):975–83.
 27. Heuser M, Yap DB, Leung M, et al. Loss of MLL5 results in pleiotropic hematopoietic defects, reduced neutrophil immune function, and extreme sensitivity to DNA demethylation. *Blood* 2009;113(7):1432–43.
 28. Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, et al. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: Clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* 2012;119(25):6109–6117.
 29. Such E, Cervera J, Costa D, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96(3):375–383.

30. Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, 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;25(5):877–879.
31. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol* 2017;35(9):968–974.
32. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118(24):6239–6246.
33. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med* 2011;365(15):1384–1395.
34. Montalban-Bravo G, Takahashi K, Patel K, et al. Impact of the number of mutations in survival and response outcomes to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget* 2018;9(11):9714–9727.
35. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013;122(22):3616–3627.
36. Mortera-Blanco T, Dimitriou M, Woll PS, et al. SF3B1-initiating mutations in MDS-RSs target lymphomyeloid hematopoietic stem cells. *Blood* 2017;130(7):881–890.
37. Visconte V, Rogers HJ, Singh J, et al. SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120(16):3173–3186.
38. Visconte V, Avishai N, Mahfouz R, et al. Distinct iron architecture in SF3B1-mutant myelodysplastic syndrome patients is linked to an SLC25A37 splice variant with a retained intron. *Leukemia* 2015;29(1):188–95.
39. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med* 2018;24(4):497–504.
40. Patel BJ, Przychodzen B, Thota S, et al. Genomic determinants of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* [Epub ahead of print].
41. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478(7367):64–9.
42. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* 2012;119(14):3203–10.
43. Thol F, Kade S, Schlarman C, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;119(15):3578–84.
44. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360(22):2289–301.
45. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias Plenary Paper Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* 2013;121(12):2186–2198.

46. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2011;364(26):2496–2506.
47. Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* 2014;124(17):2705–2712.
48. Zhang Z-M, Lu R, Wang P, et al. Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation. *Nature* 2018;554(7692):387–391.
49. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2011;25(7):1153–1158.
50. Thol F, Winschel C, Ludeking A, et al. Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2011;96(12):1870–1873.
51. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363(25):2424–33.
52. Prensner JR, Chinnaiyan AM. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat Med* 2011;17(3):291–3.
53. Wang J, Li Z, He Y, et al. Loss of Asxl1 leads to myelodysplastic syndrome-like disease in mice. *Blood* 2014;123(4):541–553.
54. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* 2011;118(26):6920–9.
55. Fisher JB, McNulty M, Burke MJ, Crispino JD, Rao S. Cohesin Mutations in Myeloid Malignancies. *Trends in cancer* 2017;3(4):282–293.
56. Thota S, Viny AD, Makishima H, et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood* 2014;124(11):1790–1798.
57. Ran D, Shia W-J, Lo M-C, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood* 2013;121(15):2882–90.
58. Padron E, Yoder S, Kunigal S, et al. ETV6 and signaling gene mutations are associated with secondary transformation of myelodysplastic syndromes to chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2014;123(23):3675–7.
59. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol* 2013;160(5):660–72.
60. Bally C, Adès L, Renneville A, et al. Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. *Leuk Res* 2014;38(7):751–5.
61. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2016;375(21):2023–2036.
62. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood* 2012;119(9):2114–21.

63. Ahuja HG, Foti A, Bar-Eli M, Cline MJ. The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. *Blood* 1990;75(8):1684–90.
64. Shou L-H, Cao D, Dong X-H, et al. Prognostic significance of SETBP1 mutations in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and chronic neutrophilic leukemia: A meta-analysis. *PLoS One* 2017;12(2):e0171608.
65. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, et al. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet* 2013;45(8):942–946.
66. Fernandez-Mercado M, Pellagatti A, Di Genua C, et al. Mutations in SETBP1 are recurrent in myelodysplastic syndromes and often coexist with cytogenetic markers associated with disease progression. *Br J Haematol* 2013;163(2):235–9.
67. Damm F, Itzykson R, Kosmider O, et al. SETBP1 mutations in 658 patients with myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and secondary acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2013;27(6):1401–3.
68. Mossner M, Jann J-C, Wittig J, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood* 2016;128(9):1246–59.
69. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1090–1098.
70. Walter MJ, Shen D, Shao J, et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2013;27(6):1275–82.
71. Pellagatti A, Roy S, Di Genua C, et al. Targeted resequencing analysis of 31 genes commonly mutated in myeloid disorders in serial samples from myelodysplastic syndrome patients showing disease progression. *Leukemia* 2016;30(1):247–50.
72. Bibikova E, Youn M-Y, Danilova N, et al. TNF-mediated inflammation represses GATA1 and activates p38 MAP kinase in RPS19-deficient hematopoietic progenitors. *Blood* 2014;124(25):3791–3798.
73. Allampallam K, Shetty V, Mundle S, et al. Biological significance of proliferation, apoptosis, cytokines, and monocyte/macrophage cells in bone marrow biopsies of 145 patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2002;75(3):289–97.
74. Du W, Erden O, Pang Q. TNF- α signaling in Fanconi anemia. *Blood Cells Mol Dis* 2014;52(1):2–11.
75. Lopes MR, Traina F, Campos P de M, et al. IL10 inversely correlates with the percentage of CD8+ cells in MDS patients. *Leuk Res* 2013;37(5):541–546.
76. Niyongere S, Lucas N, Zhou J-M, et al. Heterogeneous expression of cytokines accounts for clinical diversity and refines prognostication in CMML. *Leukemia* 2018;1.
77. Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 2013;123(11):4595–611.
78. Miyara M, Brechignac S, Harel S, et al. Abnormal Numbers Of Regulatory T Cell (Tregs) Subsets Are Significantly Associated With Adverse Disease Outcome In Lower Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Chronic Myelomonocytic Leukemia

- (CMML). *Blood*;122(21):.
79. Mailloux AW, Sugimori C, Komrokji RS, et al. Expansion of Effector Memory Regulatory T Cells Represents a Novel Prognostic Factor in Lower Risk Myelodysplastic Syndrome. *J Immunol* 2012;189(6):3198–3208.
 80. Maratheftis CI, Andreakos E, Moutsopoulos HM, Voulgarelis M. Toll-like receptor-4 is up-regulated in hematopoietic progenitor cells and contributes to increased apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1154–60.
 81. Rhyasen GW, Bolanos L, Fang J, et al. Targeting IRAK1 as a therapeutic approach for myelodysplastic syndrome. *Cancer Cell* 2013;24(1):90–104.
 82. Mills KI, Kohlmann A, Williams PM, et al. Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome. *Blood* 2009;114(5):1063–72.
 83. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2010;24(4):756–764.
 84. Cilloni D, Gottardi E, Messa F, et al. Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2003;21(10):1988–95.
 85. Pellagatti A, Benner A, Mills KI, et al. Identification of Gene Expression-Based Prognostic Markers in the Hematopoietic Stem Cells of Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* 2013;31(28):3557–3564.
 86. Gerstung M, Pellagatti A, Malcovati L, et al. Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* 2015;6(1):5901.
 87. Gelsi-Boyer V, Cervera N, Bertucci F, et al. Gene expression profiling separates chronic myelomonocytic leukemia in two molecular subtypes. *Leukemia* 2007;21(11):2359–2362.
 88. Bou Samra E, Moreaux J, Vacheret F, et al. New prognostic markers, determined using gene expression analyses, reveal two distinct subtypes of chronic myelomonocytic leukaemia patients. *Br J Haematol* 2012;157(3):347–356.
 89. Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 2010;464(7290):852–7.
 90. Medyouf H, Mossner M, Jann J-C, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell* 2014;14(6):824–37.
 91. Li X, Deeg HJ. Murine xenogeneic models of myelodysplastic syndrome: an essential role for stroma cells. *Exp Hematol* 2014;42(1):4–10.
 92. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2010;7(3):380–90.
 93. Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1 α Level Is Essential

- for Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2010;7(3):391–402.
94. Tong H, Hu C, Zhuang Z, Wang L, Jin J. Hypoxia-inducible factor-1 α expression indicates poor prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2012;53(12):2412–2418.
 95. Kim M, Hwang S, Park K, Kim SY, Lee YK, Lee DS. Increased expression of interferon signaling genes in the bone marrow microenvironment of myelodysplastic syndromes. *PLoS One* 2015;10(3):e0120602.
 96. Zhang P, Chen Z, Li R, et al. Loss of ASXL1 in the bone marrow niche dysregulates hematopoietic stem and progenitor cell fates. *Cell Discov* 2018;4(1):4.
 97. Shi H, Wang Y, Li R, et al. Alteration in the Cytokine Secretion of Bone Marrow Stromal Cells from Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia Contribute to Impaired Hematopoietic Supportive Activity. *Stem Cells Int* 2018;20181–9.
 98. Maassen A, Strupp C, Giagounidis A, et al. Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res* 2013;37(1):64–70.
 99. Verburgh E, Achten R, Louw VJ, et al. A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. *Leukemia* 2007;21(4):668–677.
 100. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [Epub ahead of print].
 101. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* 2011;96(10):1433–1440.
 102. Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2008;22(3):538–543.
 103. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer* 2008;113(6):1351–1361.
 104. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 2002;99(3):840–9.
 105. Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, et al. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia* 2013;27(7):1504–1510.
 106. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, et al. Prognostic Score Including Gene Mutations in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2428–2436.
 107. List A, Dewald G, Bennett J, et al. Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome
-

- with Chromosome 5q Deletion. *N Engl J Med* 2006;355(14):1456–1465.
108. Sauntharajah Y, Nakamura R, Wesley R, Wang QJ, Barrett AJ. A simple method to predict response to immunosuppressive therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003;102(8):3025–3027.
 109. Komrokji RS, Haider M, Al Ali NH, et al. Somatic Gene Mutations Serve As Molecular Biomarkers Predictive for Response to Immunosuppressive Therapy (IST) in Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Blood*;126(23):.
 110. Kantarjian H, Issa J-PJ, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006;106(8):1794–803.
 111. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized Controlled Trial of Azacitidine in Patients With the Myelodysplastic Syndrome: A Study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2002;20(10):2429–2440.
 112. Braun T, Itzykson R, Renneville A, et al. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood* 2011;118(14):3824–3831.
 113. Wong E, Seymour JF, Kenealy M, Westerman D, Herbert K, Dickinson M. Treatment of chronic myelomonocytic leukemia with azacitidine. *Leuk Lymphoma* 2013;54(4):878–880.
 114. Costa R, Abdulhaq H, Haq B, et al. Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* 2011;117(12):2690–2696.
 115. Padron E, Dezern A, Andrade-Campos M, et al. A Multi-Institution Phase I Trial of Ruxolitinib in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). *Clin Cancer Res* 2016;22(15):3746–54.
 116. Fenaux P, Raza A, Mufti GJ, et al. A multicenter phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in intermediate- to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2007;109(10):4158–4163.
 117. Ocheni S, Kröger N, Zabelina T, Zander AR, Bacher U. Outcome of allo-SCT for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(8):659–661.
 118. Elliott MA, Tefferi A, Hogan WJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusions for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(11):1003–1008.
 119. Patnaik MM, Wassie EA, Padron E, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in younger patients: molecular and cytogenetic predictors of survival and treatment outcome. *Blood Cancer J* 2015;5(2):e280.
 120. de Witte T, Bowen D, Robin M, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(13):1753–1762.
 121. Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002. *Cancer Causes Control* 2008;19(4):379–390.

122. Leonard JP, Martin P, Roboz GJ. Practical Implications of the 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid and Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *J Clin Oncol* 2017;35(23):2708–2715.
123. Lane SW, Gilliland DG. Leukemia stem cells. *Semin Cancer Biol* 2010;20(2):71–76.
124. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* 2012;150(2):264–278.
125. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2013;368(22):2059–2074.
126. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* 2017;547(7661):104–108.
127. Steffen B, Müller-Tidow C, Schwäble J, Berdel WE, Serve H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;56(2):195–221.
128. Kelly LM, Gilliland DG. GENETICS OF MYELOID LEUKEMIAS. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3(1):179–198.
129. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012;12(9):599–612.
130. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: Biological and clinical implications. *Blood Rev* 2013;27(1):13–22.
131. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009;114(12):2386–92.
132. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* 2004;4(5):394–400.
133. Peniket A, Wainscoat J, Side L, et al. Del (9q) AML: clinical and cytological characteristics and prognostic implications. *Br J Haematol* 2005;129(2):210–20.
134. Klein K, Kaspers G, Harrison CJ, et al. Clinical Impact of Additional Cytogenetic Aberrations, cKIT and RAS Mutations, and Treatment Elements in Pediatric t(8;21)–AML: Results From an International Retrospective Study by the International Berlin–Frankfurt–Münster Study Group. *J Clin Oncol* 2015;33(36):4247–58.
135. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354–65.
136. Berger R, Bernheim A, Sigaux F, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G. Acute monocytic leukemia chromosome studies. *Leuk Res* 1982;6(1):17–26.
137. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23(8):1490–9.

138. Creutzig U, Zimmermann M, Reinhardt D, et al. Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups. *Cancer* 2016;122(24):3821–3830.
139. Oancea C, Rüster B, Henschler R, Puccetti E, Ruthardt M. The t(6;9) associated DEK/CAN fusion protein targets a population of long-term repopulating hematopoietic stem cells for leukemogenic transformation. *Leukemia* 2010;24(11):1910–1919.
140. Radmacher MD, Marcucci G, Ruppert AS, et al. Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2006;108(5):1677–83.
141. Bullinger L, Rücker FG, Kurz S, et al. Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;110(4):1291–300.
142. Herborg LL, Hansen MC, Hansen M, Roug AS, Hokland P. RNA-Sequencing of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia to Extend Routine Molecular Diagnostics. *Blood*;126(23):.
143. Griffioen M, Arindrarto W, Borràs D, et al. Whole Transcriptome Sequencing (RNAseq) As a Comprehensive, Cost-Efficient Diagnostic Tool for Acute Myeloid Leukemia. *Blood*;128(22):.
144. Li Z, Herold T, He C, et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *J Clin Oncol* 2013;31(9):1172–81.
145. Handschuh L, Kaźmierczak M, Milewski M, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. *Int J Oncol* 2017;52(3):656–678.
146. Abbas T, Dutta A. P21 in Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities. *Nat Rev Cancer* 2009;9(6):400–414.
147. Maiga A, Lemieux S, Pabst C, et al. Transcriptome analysis of G protein-coupled receptors in distinct genetic subgroups of acute myeloid leukemia: identification of potential disease-specific targets. *Blood Cancer J* 2016;6(6):e431–e431.
148. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–2406.
149. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103(4):620–5.
150. Klepin HD, Rao A V., Pardee TS. Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in Older Adults. *J Clin Oncol* 2014;32(24):2541–2552.
151. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424–447.

152. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1079–1089.
153. Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 2008;453(7199):1239–43.
154. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, et al. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science* (80-) 2008;320(5881):1344–1349.
155. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10(1):57–63.
156. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol* 2012;20121–11.
157. Mercer TR, Clark M, Crawford J, et al. Targeted sequencing for gene discovery and quantification using RNA CaptureSeq. *Nat Protoc* 2014;(9):989–1009.
158. Bridges CB. The Origin of Variations in Sexual and Sex-Limited Characters. *The American Naturalist* 1922;5651–63.
159. Dobzhansky T. Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 1946;31(3):269–90.
160. Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* 1997;278(5340):1064–8.
161. Ferrari E, Lucca C, Foiani M. A lethal combination for cancer cells: Synthetic lethality screenings for drug discovery. *Eur J Cancer* 2010;46(16):2889–2895.
162. Vilenchik MM, Knudson AG. Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates Evidence for Inverse DREs [Epub ahead of print].
163. Reinhardt HC, Yaffe MB. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14(9):563–580.
164. Barnum KJ, O’Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol* 2014;117029–40.
165. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 2007;6(8):1079–1099.
166. Fan C-H, Liu W-L, Cao H, Wen C, Chen L, Jiang G. O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death Dis* 2013;4(10):e876–e876.
167. Krokan HE, Bjoras M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(4):a012583–a012583.
168. FORTINI P, DOGLIOTTI E. Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 2007;6(4):398–409.

169. Shaheen M, Allen C, Nickoloff JA, Hromas R. Synthetic lethality: Exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* 2011;117(23):6074–6082.
170. Martin SA, Lord CJ, Ashworth A. Therapeutic Targeting of the DNA Mismatch Repair Pathway. *Clin Cancer Res* 2010;16(21):5107–5113.
171. Li G–M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008;18(1):85–98.
172. Bassing CH, Alt FW. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004;3(8–9):781–796.
173. Burma S, Chen BPC, Chen DJ. Role of non–homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 2006;5(9–10):1042–1048.
174. McVey M, Lee SE. MMEJ repair of double–strand breaks (director’s cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* 2008;24(11):529–38.
175. Walden H, Deans AJ. The Fanconi Anemia DNA Repair Pathway: Structural and Functional Insights into a Complex Disorder. *Annu Rev Biophys* 2014;43(1):257–278.
176. Moldovan G–L, D’Andrea AD. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu Rev Genet* 2009;43(1):223–249.
177. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2012;12(12):801–817.
178. Plummer R. Perspective on the pipeline of drugs being developed with modulation of DNA damage as a target. *Clin Cancer Res* 2010;16(18):4527–31.
179. Luo M, He H, Kelley MR, Georgiadis MM. Redox Regulation of DNA Repair: Implications for Human Health and Cancer Therapeutic Development. *Antioxid Redox Signal* 2010;12(11):1247–1269.
180. Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC. Cancer–specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet* 2014;30(8):326–39.
181. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2–deficient tumours with inhibitors of poly(ADP–ribose) polymerase. *Nature* 2005;434(7035):913–917.
182. Leung M, Rosen D, Fields S, Cesano A, Budman DR. Poly(ADP–ribose) polymerase–1 inhibition: preclinical and clinical development of synthetic lethality. *Mol Med* 2011;17(7–8):854–62.
183. O’Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al. Iniparib plus Chemotherapy in Metastatic Triple–Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2011;364(3):205–214.
184. Guha M. PARP inhibitors stumble in breast cancer. *Nat Biotechnol* 2011 295 [Epub ahead of print].
185. Kelley MR, Georgiadis MM, Fishel ML. APE1/Ref–1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref–1. *Curr Mol Pharmacol* 2012;5(1):36–53.
186. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Kakolyris S, et al. Nuclear expression of human

- apurinic/aprimidinic endonuclease (HAP1/Ref-1) in head-and-neck cancer is associated with resistance to chemoradiotherapy and poor outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50(1):27–36.
187. Cardoso AA, Jiang Y, Luo M, et al. APE1/Ref-1 regulates STAT3 transcriptional activity and APE1/Ref-1-STAT3 dual-targeting effectively inhibits pancreatic cancer cell survival. *PLoS One* 2012;7(10):e47462.
188. van Pel DM, Barrett IJ, Shimizu Y, et al. An evolutionarily conserved synthetic lethal interaction network identifies FEN1 as a broad-spectrum target for anticancer therapeutic development. *PLoS Genet* 2013;9(1):e1003254.
189. Shah F, Logsdon D, Messmann RA, Fehrenbacher JC, Fishel ML, Kelley MR. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. *npj Precis Oncol* 2017;1(1):19.
190. Martin SA, McCarthy A, Barber LJ, et al. Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene *MSH2*. *EMBO Mol Med* 2009;1(6–7):323–337.
191. Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 2008;18(1):64–72.
192. Neher TM, Bodenmiller D, Fitch RW, Jalal SI, Turchi JJ. Novel irreversible small molecule inhibitors of replication protein A display single-agent activity and synergize with cisplatin. *Mol Cancer Ther* 2011;10(10):1796–806.
193. Budke B, Logan HL, Kalin JH, et al. RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15):7347–7357.
194. Dar AC, Shokat KM. The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annu Rev Biochem* 2011;80(1):769–795.
195. Renodon-Cornire A, Weigel P, Le M, Fleury F. New Potential Therapeutic Approaches by Targeting Rad51- Dependent Homologous Recombination. In: *New Research Directions in DNA Repair*. InTech; p.
196. Setton J, Bindra RS, Powell SN. DNA double-strand repair by nonhomologous end joining and its clinical relevance. In: *DNA Repair in Cancer Therapy*. Elsevier; p277–302.
197. Davidson D, Amrein L, Panasci L, Aloyz R. Small Molecules, Inhibitors of DNA-PK, Targeting DNA Repair, and Beyond. *Front Pharmacol* 2013;45.
198. Neal JA, Dang V, Douglas P, Wold MS, Lees-Miller SP, Meek K. Inhibition of Homologous Recombination by DNA-Dependent Protein Kinase Requires Kinase Activity, Is Titratable, and Is Modulated by Autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 2011;31(8):1719–1733.
199. Maifrede S, Nieborowska-Skorska M, Sullivan K, et al. Tyrosine kinase inhibitor-induced defects in DNA repair sensitize FLT3 (ITD)-positive leukemia cells to PARP1 inhibitors. *Blood* 2018;blood-2018-02-834895.
200. Gregory MA, D'Alessandro A, Alvarez-Calderon F, et al. ATM/G6PD-driven redox

- metabolism promotes FLT3 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113(43):E6669–E6678.
201. Ma J, Li X, Su Y, et al. Mechanisms responsible for the synergistic antileukemic interactions between ATR inhibition and cytarabine in acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep* 2017;7(1):41950.
 202. Sampath D, Cortes J, Estrov Z, et al. Pharmacodynamics of cytarabine alone and in combination with 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in AML blasts in vitro and during a clinical trial. *Blood* 2006;107(6):2517–2524.
 203. Muvarak NE, Chowdhury K, Xia L, et al. Enhancing the Cytotoxic Effects of PARP Inhibitors with DNA Demethylating Agents – A Potential Therapy for Cancer. *Cancer Cell* 2016;30(4):637–650.
 204. Verma A, Steidl U. A synthetic lethal approach targeting mutant isocitrate dehydrogenase in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2015;21(2):113–114.
 205. Kwok M, Davies N, Agathangelou A, et al. Synthetic lethality in chronic lymphocytic leukaemia with DNA damage response defects by targeting the ATR pathway. *Lancet* 2015;385S58.
 206. Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, et al. The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* 2010;116(22):4578–87.
 207. Inoue S, Li WY, Tseng A, et al. Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. *Cancer Cell* 2016;30(2):337–348.
 208. Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004;41.
 209. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254(5038):1643–7.
 210. Yokoe T, Tanaka F, Mimori K, et al. Efficient Identification of a Novel Cancer/Testis Antigen for Immunotherapy Using Three-Step Microarray Analysis. *Cancer Res* 2008;68(4):1074–1082.
 211. Scanlan MJ, Gordon CM, Williamson B, et al. Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. *Int J Cancer* 2002;98(4):485–492.
 212. Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR, et al. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Database issue):D816–9.
 213. Stevenson BJ, Iseli C, Panji S, et al. Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome. *BMC Genomics* 2007;8(1):129.
 214. Zhang Q, Su B. Evolutionary Origin and Human-Specific Expansion of a Cancer/Testis Antigen Gene Family. *Mol Biol Evol* 2014;31(9):2365–2375.
 215. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ. Cancer/testis
-

- antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(8):615–625.
216. Türeci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):5211–6.
217. Kim R, Kulkarni P, Hannenhalli S. Derepression of Cancer/testis antigens in cancer is associated with distinct patterns of DNA hypomethylation. *BMC Cancer* 2013;13(1):144.
218. Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun* 2001;11.
219. Old LJ. Cancer is a somatic cell pregnancy.
220. Liggins AP, Lim SH, Soilleux EJ, Pulford K, Banham AH. A panel of cancer-testis genes exhibiting broad-spectrum expression in haematological malignancies. *Cancer Immun* 2010;108.
221. Lim SH, Wang Z, Chiriva-Internati M, Xue Y. Sperm protein 17 is a novel cancer-testis antigen in multiple myeloma. *Blood* 2001;97(5):1508–10.
222. van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, et al. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood* 1999;94(4):1156–64.
223. van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 2005;105(10):3939–3944.
224. Jungbluth AA, Ely S, DiLiberto M, et al. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood* 2005;106(1):167–174.
225. Dubovsky JA, McNeel DG, Powers JJ, Gordon J, Sotomayor EM, Pinilla-Ibarz JA. Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia with a Hypomethylating Agent Induces Expression of NXF2, an Immunogenic Cancer Testis Antigen. *Clin Cancer Res* 2009;15(10):3406–3415.
226. Adams SP, Sahota SS, Mijovic A, et al. Frequent expression of HAGE in presentation chronic myeloid leukaemias. *Leukemia* 2002;16(11):2238–42.
227. Almstedt M, Blagitko-Dorfs N, Duque-Afonso J, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2010;34(7):899–905.
228. Atanackovic D, Luetkens T, Kloth B, et al. Cancer-testis antigen expression and its epigenetic modulation in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2011;86(11):918–922.
229. Meklat F, Li Z, Wang Z, et al. Cancer-testis antigens in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2007;136(6):769–776.
230. Türeci Ö, Chen Y-T, Sahin U, et al. Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 1998;77(1):19–23.
231. Ait-Tahar K, Anderson AP, Barnardo M, et al. Sp17 Protein Expression and Major Histocompatibility Class I and II Epitope Presentation in Diffuse Large B Cell

- Lymphoma Patients. *Adv Hematol* 2017;20171–9.
232. Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, et al. Cancer Testis Antigen, Ropporin, Is a Potential Target for Multiple Myeloma Immunotherapy. *J Immunother* 2011;34(6):490–499.
233. Li Z, Li W, Meklat F, et al. A yeast two-hybrid system using Sp17 identified Ropporin as a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Int J cancer* 2007;121(7):1507–11.
234. Chen Y-T, Chadburn A, Lee P, et al. Expression of cancer testis antigen CT45 in classical Hodgkin lymphoma and other B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(7):3093–3098.
235. Srivastava P, Paluch BE, Matsuzaki J, et al. Induction of cancer testis antigen expression in circulating acute myeloid leukemia blasts following hypomethylating agent monotherapy. *Oncotarget* 2016;7(11):12840–56.
236. Wang Z, Zhang Y, Mandal A, et al. The spermatozoa protein, SLLP1, is a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2004;10(19):6544–50.
237. Wang Z, Zhang Y, Liu H, Salati E, Chiriva-Internati M, Lim SH. Gene expression and immunologic consequence of SPAN-Xb in myeloma and other hematologic malignancies. *Blood* 2003;101(3):955–60.
238. Lim SH, Austin S, Owen-Jones E, Robinson L. Expression of testicular genes in haematological malignancies. *Br J Cancer* 1999;81(7):1162–1164.
239. Zhang Y, Wang Z, Liu H, Giles FJ, Lim SH. Pattern of gene expression and immune responses to Semenogelin 1 in chronic hematologic malignancies. *J Immunother*;26(6):461–7.
240. Zhang Y-H, Lu A-D, Yang L, et al. PRAME overexpression predicted good outcome in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia patients receiving chemotherapy. *Leuk Res* 2017;5243–49.
241. Proto-Siqueira R, Figueiredo-Pontes LL, Panepucci RA, et al. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 2006;30(11):1333–1339.
242. Liberante FG, Pellagatti A, Boncheva V, et al. High and low, but not intermediate, *PRAME* expression levels are poor prognostic markers in myelodysplastic syndrome at disease presentation. *Br J Haematol* 2013;162(2):282–285.
243. Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, Disel U, Baslamisli F, Burgut R. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: Clinical importance and future prospects. *Am J Hematol* 2005;79(4):257–261.
244. Guinn B, Bland EA, Lodi U, et al. Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335(4):1293–1304.
245. Meklat F, Zhang Y, Shahriar M, et al. Identification of protamine 1 as a novel cancer-testis antigen in early chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*

- 2009;144(5):660–6.
246. Carrasco J, Van Pel A, Neyns B, et al. Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells. *J Immunol* 2008;180(5):3585–93.
247. Chaux P, Luiten R, Demotte N, et al. Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J Immunol* 1999;163(5):2928–36.
248. Connerotte T, Van Pel A, Godelaine D, et al. Functions of Anti-MAGE T-cells induced in melanoma patients under different vaccination modalities. *Cancer Res* 2008;68(10):3931–40.
249. Goodyear O, Agathangelou A, Novitzky-Basso I, et al. Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood* 2010;116(11):1908–18.
250. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, et al. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2012;119(13):3097–104.
251. Mackensen A, Herbst B, Chen JL, et al. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J cancer* 2000;86(3):385–92.
252. Davis ID, Chen W, Jackson H, et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(29):10697–702.
253. Ye Q, Shen Y, Wang X, et al. Hypermethylation of HLA class I gene is associated with HLA class I down-regulation in human gastric cancer. *Tissue Antigens* 2010;75(1):30–39.
254. Issa J-PJ, Gharibyan V, Cortes J, et al. Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol* 2005;23(17):3948–56.
255. Sigalotti L, Altomonte M, Colizzi F, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment of hematopoietic malignancies: a multimechanism therapeutic approach? *Blood* 2003;101(11):4644–6; discussion 4645–6.
256. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* 2013;45(10):1127–33.
257. Kar SA, Jankowska A, Makishima H, et al. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2013;98(1):107–113.
258. Lee MJ, Ye AS, Gardino AK, et al. Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. *Cell* 2012;149(4):780–794.

259. Huang D, Nagata Y, Grossmann V, et al. BRCC3 mutations in myeloid neoplasms. *Haematologica* 2015;100(8):1051–7.
260. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016;374(23):2209–2221.
261. Tong KI, Ota K, Komuro A, et al. Attenuated DNA damage repair delays therapy-related myeloid neoplasms in a mouse model. *Cell Death Dis* 2016;7(10):e2401.
262. Gaymes TJ, Mohamedali AM, Patterson M, et al. Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies. *Haematologica* 2013;98(9):1397–1406.
263. Pederiva C, Böhm S, Julner A, Farnebo M. Splicing controls the ubiquitin response during DNA double-strand break repair. *Cell Death Differ* 2016;1–10.
264. Dolatshad H, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, et al. Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia* 2015;29(5):1092–103.
265. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937–51.
266. Shen S, Park JW, Lu Z, et al. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(51):E5593–601.
267. Katz Y, Wang ET, Airoidi EM, Burge CB. Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation. *Nat Methods* 2010;7(12):1009–15.
268. Pérez C, Martínez-Calle N, Martín-Subero JI, et al. TET2 mutations are associated with specific 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine profiles in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *PLoS One* 2012;7(2):e31605.
269. Haferlach T, Kohlmann A, Wiczorek L, et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: Report from the international microarray innovations in leukemia study group. *J Clin Oncol* 2010;28(15):2529–2537.
270. Dey a., Seshasayee D, Noubade R, et al. Loss of the Tumor Suppressor BAP1 Causes Myeloid Transformation. *Science* (80-) 2012;337(6101):1541–1546.
271. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* 2012;120(15):3080–8.
272. Wray J, Williamson EA, Singh SB, et al. PARP1 is required for chromosomal translocations. *Blood* 2013;121(21):4359–4365.
273. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995;377(6549):552–557.
274. McWhir J, Selfridge J, Harrison DJ, Squires S, Melton DW. Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities

- and die before weaning. *Nat Genet* 1993;5(3):217–224.
275. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2011;43(2):142–6.
276. Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, et al. ERCC1–XPF endonuclease facilitates DNA double–strand break repair. *Mol Cell Biol* 2008;28(16):5082–92.
277. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 2010;17(1):13–27.
278. Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014;28(3):497–506.
279. Zhang Y, Jasin M. An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end–joining pathway. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18(1):80–4.
280. Gaymes TJ, Shall S, MacPherson LJ, et al. Inhibitors of poly ADP–ribose polymerase (PARP) induce apoptosis of myeloid leukemic cells: potential for therapy of myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94(5):638–646.
281. Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget* 2015;6(42):44061–71.
282. Dkhissi F, Aggoune D, Pontis J, et al. The downregulation of BAP1 expression by BCR–ABL reduces the stability of BRCA1 in chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2015;43(9):775–780.
283. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant–Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell* [Epub ahead of print].
284. Saarni MI, Linman JW. Preleukemia. The hematologic syndrome preceding acute leukemia. *Am J Med* 1973;55(1):38–48.
285. Koefler H, Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. 31.
286. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom–Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher–risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open–label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009;10(3):223–232.
287. Cappell KM, Sinnott R, Taus P, Maxfield K, Scarbrough M, Whitehurst AW. Multiple cancer testis antigens function to support tumor cell mitotic fidelity. *Mol Cell Biol* 2012;32(20):4131–40.
288. Mercer TR, Gerhardt DJ, Dinger ME, et al. Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nat Biotechnol* 2012;30(1):99–104.
289. Hart T, Komori H, LaMere S, Podshivalova K, Salomon DR. Finding the active genes in deep RNA–seq gene expression studies. *BMC Genomics* 2013;14(1):778.
290. Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD). *Haematologica* [Epub ahead of print].

291. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* 2006;108(2):419–425.
292. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4(2):249–264.
293. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995;57:289–300.
294. Locke DP, Hillier LW, Warren WC, et al. Comparative and demographic analysis of orang-utan genomes. *Nature* 2011;469(7331):529–533.
295. 1000 genome project consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467(7319):1061–73.
296. Li N, Ye M, Li Y, et al. Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology. *Methods* 2010;52(3):203–212.
297. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009;25(9):1105–1111.
298. Fantom Consortium T. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* (80-) 2006;309(5740):1559–1563.
299. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 2008;18(9):1509–1517.
300. Griffith M, Griffith OL, Mwenifumbo J, et al. Alternative expression analysis by RNA sequencing. *Nat Methods* 2010;7(10):843–847.
301. Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Res* 2011;21(12):2213–2223.
302. Lorient A, Boon T, De Smet C. Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia. *Int J Cancer* 2003;105(3):371–6.
303. Grunwald C, Koslowski M, Arsiray T, et al. Expression of multiple epigenetically regulated cancer/germline genes in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2006;118(10):2522–2528.
304. Koslowski M, Sahin U, Huber C, Türeci Ö. The human X chromosome is enriched for germline genes expressed in premeiotic germ cells of both sexes. *Hum Mol Genet* 2006;15(15):2392–2399.
305. Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Letters* 2017;396:130–137.
306. Old LJ. Cancer immunology: the search for specificity. *Natl Cancer Inst Monogr* 1982;60:193–209.
307. Boon T. Cancer tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997;6:81–88.
308. Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immunol* 2004;4:1.

309. Fratta E, Coral S, Covre A, et al. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol* 2011;5(2):164–182.
310. Wang Y, Han KJ, Pang XW, et al. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 2002;169(2):1102–1109.
311. Ma Y, Xin Y, Li R, et al. TFDP3 was expressed in coordination with E2F1 to inhibit E2F1-mediated apoptosis in prostate cancer. *Gene* 2014;537(2):253–259.
312. Yin K, Liu Y, Chu M, Wang Y. TFDP3 regulates epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *PLoS One*;12(1):.
313. Ingram L, Munro S, Coutts AS, La Thangue NB. E2F-1 regulation by an unusual DNA damage-responsive DP partner subunit. *Cell Death Differ* 2011;18(1):122–132.
314. Cho B, Lim Y, Lee DY, et al. Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292(3):715–726.
315. Kim Y, Park D, Kim H, et al. MiR-200b and cancer/testis antigen cage form a feedback loop to regulate the invasion and tumorigenic and angiogenic responses of a cancer cell line to microtubule-Targeting drugs. *J Biol Chem* 2013;288(51):36502–36518.
316. Li Y, Li J, Wang Y, et al. Roles of cancer/testis antigens (CTAs) in breast cancer. *Cancer Letters* 2017;39964–73.
317. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, et al. NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: Current perspectives. *Frontiers in Immunology*;9(MAY):
318. Sabado RL, Bhardwaj N. Cancer immunotherapy: Dendritic-cell vaccines on the move. *Nature* 2015;519(7543):300–301.
319. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 2011;29(7):917–924.
320. Robbins PF, Kassim SH, Tran TLN, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: Long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 2015;21(5):1019–1027.

SUMMARY

SUMMARY

Background: Recent therapeutic and survival advances in the lymphoid malignancies setting have not been paralleled in the myeloid setting, where there is an urgent need for new targets. Despite the absence of mutations in the DNA repair machinery in myeloid malignancies, the advent of high-throughput sequencing and discovery of splicing and epigenetics defects in chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) prompted us, in the first chapter of our work, to revisit a pathogenic role for genes involved in DNA damage response. In the second chapter, we focused on the cancer testis antigens (CTA), a group of molecules whose expression has been silenced by hypermethylation in the somatic cells of healthy individuals. However, cancer cells re-express some of them, specific for the type of tumor, with immunogenic properties. Even when re-expressed, these molecules show a low number of transcripts, and global transcriptome RNA-seq approaches could be not sensitive enough for their characterisation. A customized targeted RNA-seq approach has shown to be more reliable for these purposes.

Aims: to take advantage of recent RNA-seq approaches to identify new molecules to be targeted in CMML and related disorders, focusing in a synthetic lethality strategy for DNA repair genes, and in CTAs change of expression after azacitidine for immunotherapeutic purposes.

Methods: First, we screened for misregulated DNA repair genes by enhanced RNA-sequencing on bone marrow from a discovery cohort of 27 CMML patients and 9 controls. We validated differentially expressed candidates in CMML CD34+bone marrow selected cells and in an independent cohort of 74 CMML patients, mutationally contextualized by targeted sequencing. Second, we performed a customized RNA-seq experiment targeting 210 CTAs at diagnosis and after one cycle of azacitidine in 19 cases, validated at the protein level the behaviour of our main candidates, and compared the results with global RNA-seq results from 11 patients.

Resultados: First, we found *BAP1* and *PARP1* down-regulation to be specific to CMML compared with other related disorders. Chromatin-regulator mutated cases showed decreased BAP1 dosage. We validated a significant over-expression of the double strand break-fidelity genes *CDKN1A* and *ERCC1*, independent of promoter methylation and associated with chemorefractoriness. In addition, patients bearing mutations in the splicing component SRSF2 displayed numerous aberrant splicing events in DNA repair genes, with a quantitative predominance in the single strand break pathway.

Second, we performed a RNA-seq study targeting 210 CTAs pre and post (+28) first cycle of azacitidine in 19 patients with MDS (n=13) and CMML (n=6). We found that 137 out of 210 CTAs showed a significant expression (CPM>1) at diagnosis. Some of the CTAs not expressed at baseline showed a re-expression after azacitidine; highlighting *ADAM29* as a potential candidate based on the highest level of expression after a cycle of hypomethylating agent. In addition, *TFDP3* y *DDX53*, both X-linked CTAs, emerged as main candidates as therapeutic targets, as they fulfilled two criteria: i) significant increase in expression after 1 cycle of azacitidine in those patients who achieved complete remission after 4–6 cycles, and ii) a parallel dynamic was validated at the protein level.

As we had the results from the global transcriptome pre and post azacitidine in 11 of these targeted sequenced patients, we compared both datasets. We could identify 203 of CTA genes common in both designs. Of those, 181, at baseline and/or after treatment, were found to be significantly expressed in the targeted approach and only 53, at baseline and/or after treatment, in the global transcriptome experiment.

Conclusion: Our results highlight potential targets in these group of diseases, selected with clinical and biological rationale, which currently has few therapeutic options.

RESUMEN

RESUMEN

Antecedentes: Los avances terapéuticos y en la supervivencia en neoplasias linfoides durante las dos últimas décadas no se han reproducido en el entorno de las enfermedades malignas mieloides, en las que existe una necesidad urgente de nuevas dianas terapéuticas. A pesar de la ausencia de mutaciones en los genes de la maquinaria de reparación del ADN en neoplasias mieloides, la llegada de la secuenciación de nueva generación y los descubrimientos de defectos epigenéticos y del espliceosoma en leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) nos impulsó, en el primer capítulo de este trabajo, a revisar el papel patogénico de los genes implicados en la respuesta a las lesiones en el ADN. En el segundo capítulo, nos centramos en los antígenos testiculares tumorales (ATTs), un grupo de moléculas cuya expresión se silencia por hipermetilación en las células somáticas de individuos sanos. Sin embargo, las células tumorales re-expresan algunos de estos ATTs, de manera específica para cada tumor, con propiedades inmunogénicas. Incluso cuando se re-expresan, estas moléculas muestran niveles bajos de transcritos, y el uso del RNA-seq global puede no ser lo suficientemente sensible para caracterizarlos. Para este tipo de estudios, el RNA-seq dirigido ha demostrado ser más preciso.

Objetivos: Aprovechar los avances en los experimentos de RNA-seq para identificar nuevas moléculas que puedan ser dianas en LMMC y enfermedades relacionadas, centrándonos en la estrategia de la letalidad sintética para los genes de la reparación del ADN, y en los cambios de expresión génica de los ATTs tras tratamiento con azacitidina para dianas de inmunoterapia.

Métodos: Estudiamos la desregulación de los genes de reparación de ADN mediante RNA-seq global en médula ósea de 27 pacientes de LMMC y 9 controles (cohorte de descubrimiento). Validamos los candidatos diferencialmente expresados en la fracción CD34+ de médula ósea de pacientes con LMMC, y en una cohorte independiente de 74 LMMC, caracterizadas a nivel mutacional por secuenciación dirigida de ADN. En segundo lugar, diseñamos un panel dirigido a 210 ATTs para estudiarlos por RNA-seq al diagnóstico y tras un ciclo de azacitidina en 19 pacientes, validando a nivel proteico el comportamiento de nuestros principales candidatos y comparando los resultados con RNA-seq global procedente de 11 pacientes al diagnóstico y tras tratamiento

Resultados: Encontramos una infra-expresión de *BAP1* y *PARP1* específica de LMMC comparada con otras enfermedades relacionadas. Los casos con mutaciones en reguladores de la cromatina mostraron los niveles más bajos de *BAP1*. Validamos una sobre-expresión significativa de dos genes clave en mantener la fidelidad de la reparación de roturas de doble cadena, *CDKN1A* y *ERCC1*, independiente de la metilación del promotor y asociado

a quimioresistencia. Además, los pacientes portadores de mutaciones en el componente del espliceosoma *SRSF2*, presentaban numerosos eventos de *splicing* aberrante en los genes de reparación de ADN, más frecuentes en los genes de la vía de reparación de cadena única.

Por otra parte, realizamos RNA-seq dirigido a 210 ATTs en muestras antes y después del primer ciclo de azacitidina (día +28) en 19 pacientes con SMD (n=13) y LMMC (n=6). Encontramos que 137 de los 210 ATTs mostraban una expresión significativa (CPM>1) al diagnóstico. Algunos de los ATTs que no se expresaban antes del tratamiento mostraron una re-expresión significativa tras azacitidina; destacando *ADAM29* dentro de estos ATTs expresados *de novo* tras tratamiento hipometilante. Además, *TFDP3* y *DDX53*, ambos en el cromosoma X, emergen como candidatos principales a dianas terapéuticas al cumplir dos condiciones: i) aumento significativo de la expresión tras un ciclo de azacitidina en aquellos pacientes que alcanzaron respuesta completa tras 4 o 6 ciclos, y ii) dinámica paralela a nivel proteico.

Con la disponibilidad de datos del transcriptoma completo de 11 de estos pacientes antes y después de un ciclo de azacitidina, comparamos los datos de ambas técnicas. Identificamos 203 ATTs comunes en los dos experimentos. De ellos, 181 se expresaban antes y/o después del primer ciclo de azacitidina en el experimento dirigido y solo 53 en el experimento del transcriptoma global.

Conclusiones: Nuestros resultados destacan dianas potenciales, seleccionadas con criterios clínico-biológicos y usando nuevas técnicas de secuenciación, en este grupo de enfermedades que, actualmente, presentan escasas opciones para ser tratadas.

ANEXO I

Anexo I: Material Suplementario Capítulo 1

Tabla 1.1. Diferencias significativas en la expresión de los genes de reparación de ADN por RNA-seq entre pacientes con LMMC y controles.

Gen	Cromosoma	FC	logFC	<i>p</i>	<i>p</i> adj.	LMMC	Controles
<i>CDKN1A</i>	6p21.2	5.108	2.353	<0.001	0.003	34.081	6.673
<i>PNKP</i>	19q13.33	0.832	-0.266	0.001	0.016	15.196	18.271
<i>OGG1</i>	3p25.3	0.774	-0.370	0.003	0.027	7.404	9.570
<i>CDC25B</i>	20p13	0.537	-0.897	0.004	0.027	17.781	33.110
<i>MSH4</i>	1p31.1	4.057	2.020	0.005	0.027	0.093	0.023
<i>PARP1</i>	1q42.12	0.717	-0.479	0.005	0.027	16.154	22.520
<i>BLM</i>	15q26.1	0.649	-0.623	0.007	0.028	2.386	3.675
<i>FANCD2</i>	3p25.3	0.666	-0.587	0.007	0.028	5.223	7.844
<i>MSH2</i>	2p21	0.704	-0.505	0.010	0.032	5.224	7.415
<i>TDP1</i>	14q32.11	0.735	-0.445	0.010	0.032	4.078	5.551
<i>POLE</i>	12q24.33	0.651	-0.619	0.012	0.034	9.835	15.100
<i>MMS19</i>	10q24.1	0.829	-0.271	0.014	0.034	9.781	11.804
<i>ERCC1</i>	19q13.32	1.273	0.348	0.016	0.034	17.949	14.100
<i>MUS81</i>	11q13.1	0.782	-0.355	0.016	0.034	12.956	16.567
<i>CDKN1C</i>	11p15.5	2.115	1.081	0.017	0.034	6.334	2.995
<i>POLK</i>	5q13.3	1.295	0.373	0.024	0.043	3.415	2.636
<i>RPA2</i>	1p35.3	0.860	-0.218	0.024	0.043	22.723	26.430
<i>RPA4</i>	Xq21.33	1.815	0.860	0.029	0.046	0.144	0.079
<i>PRKDC</i>	8q11.21	0.772	-0.373	0.032	0.046	6.608	8.561
<i>ATRIP</i>	3p21.31	0.801	-0.320	0.036	0.046	2.547	3.179
<i>RAD9A</i>	11q13.2	0.837	-0.256	0.036	0.046	10.910	13.032
<i>UHRF1</i>	19p13.3	0.665	-0.589	0.036	0.046	8.513	12.801
<i>BAP1</i>	3p21.1	0.943	-0.084	0.039	0.046	18.921	20.060
<i>XRCC4</i>	5q14.2	1.128	0.173	0.039	0.046	7.028	6.233
<i>NEIL1</i>	15q24.2	0.693	-0.529	0.043	0.046	2.979	4.297
<i>POLH</i>	6p21.1	0.767	-0.382	0.043	0.046	1.632	2.127
<i>XPA</i>	9q22.33	1.099	0.136	0.043	0.046	5.682	5.172
<i>CDK2</i>	12q13.2	0.757	-0.401	0.043	0.046	11.003	14.530
<i>LIG1</i>	19q13.32	0.771	-0.376	0.047	0.047	13.144	17.056
<i>MDC1</i>	6p21.3	0.841	-0.250	0.047	0.047	5.494	6.534

FC: fold change, *p*.adj: valor *p* ajustado

Tabla 1.2: Diferencias significativas en la expresión de los genes de reparación de ADN entre pacientes con SMD y controles extraídos del estudio MILE.

Gen	Cromosoma	FC	logFC	<i>p</i>	<i>p</i> adj.	SMD	Controles
<i>CDKN2A_209644_X_AT</i>	9p21.3	1.084	0.116	<0.001	<0.001	4.759	4.391
<i>MDM2_229711_S_AT</i>	12q15	1.028	0.039	<0.001	<0.001	8.701	8.468
<i>NEIL1_219396_S_AT</i>	15q24.2	0.916	-0.126	<0.001	<0.001	5.755	6.281
<i>TP53BP1_203050_AT</i>	15q15.3	0.996	-0.006	<0.001	<0.001	6.632	6.659
<i>DDB2_203409_AT</i>	11p11.2	1.039	0.055	<0.001	<0.001	6.878	6.622
<i>PNKP_218961_S_AT</i>	19q13.33	0.949	-0.076	<0.001	<0.001	5.587	5.890
<i>RBBP8_203344_S_AT</i>	18q11.2	1.043	0.061	<0.001	<0.001	8.349	8.004
<i>DCLRE1A_209804_AT</i>	10q25.3	1.065	0.091	<0.001	<0.001	5.425	5.092
<i>BABAM1_221711_S_AT</i>	19p13.11	0.972	-0.040	<0.001	<0.001	8.167	8.399
<i>CDKN2D_210240_S_AT</i>	19p13.2	0.960	-0.059	0.001	0.001	8.690	9.050
<i>CDC25B_201853_S_AT</i>	20p13	0.963	-0.054	0.001	0.001	7.866	8.167
<i>GTF2H3_222104_X_AT</i>	12q24.31	0.962	-0.056	0.002	0.003	6.758	7.023
<i>NABP2_218903_S_AT</i>	12q13.3	1.034	0.049	0.003	0.004	5.353	5.175
<i>ERCC1_203719_AT</i>	19q13.32	1.024	0.035	0.005	0.007	7.513	7.335
<i>CDK1_203213_AT</i>	10q21.2	1.047	0.067	0.005	0.007	8.342	7.965
<i>EXO1_204603_AT</i>	1q43	1.052	0.073	0.006	0.007	6.266	5.955

<i>FANCM_1554277_S_AT</i>	14q21.2	1.023	0.033	0.008	0.009	7.374	7.206
<i>FAM175A_226521_S_AT</i>	4q21.23	1.037	0.052	0.008	0.009	7.055	6.804
<i>UBE2V2_209096_AT</i>	8q11.21	1.031	0.044	0.009	0.009	7.949	7.708

FC: fold change, *p*.adj: valor *p* ajustado

Tabla 1.3: Diferencias significativas en la expresión de los genes de reparación de ADN entre pacientes con LMA-CX y controles extraídos del estudio MILE.

Gen	Cromosoma	FC	logFC	<i>p</i>	<i>p</i> adj.	LMA-CX	Controles
<i>RPA3_209507_AT</i>	1p35.3	0.879	-0.186	<0.001	<0.001	7.329	8.338
<i>CDKN1C_213182_X_AT</i>	11p15.5	1.187	0.247	<0.001	<0.001	7.036	5.930
<i>CDK6_207143_AT</i>	7q21.2	1.085	0.117	<0.001	<0.001	9.652	8.899
<i>LIG4_206235_AT</i>	13q33.3	0.916	-0.126	<0.001	<0.001	5.687	6.206
<i>OGG1_205760_S_AT</i>	3p25.3	0.851	-0.232	<0.001	<0.001	5.007	5.882
<i>NEIL2_226585_AT</i>	8p23.1	1.067	0.094	<0.001	<0.001	6.707	6.280
<i>BRIP1_235609_AT</i>	17q23.2	0.814	-0.296	<0.001	<0.001	4.391	5.392
<i>MBD4_209579_S_AT</i>	3q21.3	0.945	-0.081	<0.001	<0.001	8.644	9.144
<i>XRCC4_205071_X_AT</i>	5q14.2	0.846	-0.241	<0.001	<0.001	5.066	5.985
<i>CDC25B_201853_S_AT</i>	20p13	0.919	-0.122	<0.001	<0.001	7.507	8.167
<i>POLB_203616_AT</i>	8p11.21	1.066	0.092	<0.001	<0.001	7.939	7.448
<i>FANCD2_242560_AT</i>	3p25.3	0.901	-0.151	<0.001	<0.001	6.451	7.163
<i>CDK1_203213_AT</i>	10q21.2	0.881	-0.183	<0.001	<0.001	7.017	7.965
<i>TDP1_219715_S_AT</i>	14q32.11	0.901	-0.151	<0.001	<0.001	5.261	5.840
<i>XRCC5_208642_S_AT</i>	2q35	0.952	-0.071	<0.001	<0.001	9.423	9.901
<i>NTHL1_209731_AT</i>	16p13.3	1.123	0.168	<0.001	<0.001	4.866	4.332
<i>RAD51_205024_S_AT</i>	15q15.1	0.890	-0.168	<0.001	<0.001	6.034	6.779
<i>RPA4_221143_AT</i>	Xq21.33	0.875	-0.194	<0.001	<0.001	3.121	3.569
<i>LIG1_202726_AT</i>	19q13.32	0.946	-0.080	<0.001	<0.001	6.840	7.232
<i>ERCC1_203719_AT</i>	19q13.32	1.059	0.082	<0.001	<0.001	7.766	7.335
<i>RAD51C_209849_S_AT</i>	17q22	0.886	-0.175	<0.001	<0.001	6.141	6.935
<i>MSH4_210533_AT</i>	1p31.1	1.059	0.082	<0.001	<0.001	2.226	2.103
<i>CDK2_204252_AT</i>	12q13.2	0.927	-0.109	<0.001	<0.001	5.628	6.070
<i>CCNE1_213523_AT</i>	19q12	0.924	-0.115	<0.001	<0.001	7.724	8.364
<i>NEIL1_219396_S_AT</i>	15q24.2	0.912	-0.133	<0.001	<0.001	5.728	6.281
<i>POLG_203366_AT</i>	15q26.1	1.047	0.066	<0.001	<0.001	7.665	7.324
<i>EXO1_204603_AT</i>	1q43	0.912	-0.132	<0.001	0.001	5.434	5.955
<i>MPG_203686_AT</i>	16p13.3	1.070	0.098	<0.001	0.001	7.095	6.629
<i>SLX4_232147_AT</i>	16p13.3	0.953	-0.070	0.001	0.001	5.347	5.614
<i>PAXIP1_212825_AT</i>	7q36.2	0.921	-0.119	0.001	0.001	5.794	6.290
<i>RPA2_201756_AT</i>	1p35.3	0.929	-0.107	0.001	0.002	6.227	6.706
<i>MSH2_209421_AT</i>	2p21	0.892	-0.166	0.001	0.002	5.845	6.555
<i>GTF2H5_213357_AT</i>	6q25.3	0.908	-0.140	0.001	0.002	5.948	6.552
<i>ERCC3_202176_AT</i>	2q14.3	1.047	0.066	0.001	0.002	6.606	6.311
<i>APEX2_204408_AT</i>	Xp11.21	0.946	-0.080	0.002	0.002	5.770	6.100
<i>BLM_205733_AT</i>	15q26.1	0.954	-0.069	0.002	0.002	7.046	7.389
<i>ATM_212672_AT</i>	11q22.3	0.917	-0.124	0.002	0.002	6.856	7.473
<i>CCNA2_213226_AT</i>	4q27	0.923	-0.116	0.002	0.003	7.091	7.684
<i>CCNB1_214710_S_AT</i>	5q13.2	0.910	-0.136	0.003	0.004	7.348	8.076
<i>RPA1_201528_AT</i>	17p13.3	0.952	-0.071	0.004	0.004	8.258	8.673
<i>MDC1_203062_S_AT</i>	6p21.33	1.040	0.056	0.004	0.005	7.935	7.632
<i>BAP1_201419_AT</i>	3p21.1	1.042	0.060	0.004	0.005	6.585	6.318
<i>RDM1_239169_AT</i>	17q12	0.973	-0.040	0.006	0.007	4.852	4.987
<i>RAD1_204460_S_AT</i>	5p13.2	0.962	-0.056	0.007	0.008	5.891	6.124
<i>CDKN1A_202284_S_AT</i>	6p21.2	1.060	0.084	0.008	0.008	7.972	7.519

<i>DCLRE1B_219490_S_AT</i>	1p13.2	0.962	-0.056	0.008	0.008	6.206	6.452
<i>BRCA1_211851_X_AT</i>	17q21.31	0.960	-0.059	0.009	0.009	5.538	5.769
<i>TP53_201746_AT</i>	17p13.1	0.930	-0.105	0.012	0.012	7.939	8.539

Tabla 1.4. Estado metilacional de sitios CpG dentro de la región promotora de 26 genes de la reparación de ADN.

	Sonda CpG	Valor (n=22)
<i>BAP1_1</i>	cg22753768	0.0980473
<i>BAP1_2</i>	cg24747396	0.0360909
<i>BLM_1</i>	cg01994513	0.0393529
<i>BLM_2</i>	cg07973395	0.0407927
<i>CDC25B_1</i>	cg08770869	0.0490659
<i>CDC25B_2</i>	cg03524627	0.0194525
<i>CDK2_1</i>	cg04108502	0.0332964
<i>CDK2_2</i>	cg09106999	0.1988279
<i>CDKN1A_1</i>	cg03714916	0.0620767
<i>CDKN1A_2</i>	cg05759269	0.0384797
<i>CDKN1C_1</i>	cg17738133	0.0454488
<i>CDKN1C_2</i>	cg20919799	0.0574684
<i>ERCC1_1</i>	cg15911500	0.0173014
<i>ERCC1_2</i>	cg17378989	0.1783112
<i>FANCD2_1</i>	cg24596576	0.0464683
<i>FANCD2_2</i>	cg02579736	0.1021963
<i>LIG1_1</i>	cg09594841	0.0395914
<i>LIG1_2</i>	cg13668397	0.1004619
<i>MDC1_1</i>	cg10277195	0.0322879
<i>MDC1_2</i>	cg12814525	0.0298547
<i>MMS19_1</i>	cg14175593	0.0838199
<i>MMS19_2</i>	cg09773756	0.0488143
<i>MSH2</i>	cg11311499	0.0691427
<i>MSH4_1</i>	cg21438018	0.8162970
<i>MSH4_2</i>	cg22035229	0.8704012
<i>MUS81_1</i>	cg15883761	0.0131771
<i>MUS81_2</i>	cg04042106	0.0668058
<i>NEIL1_1</i>	cg12600197	0.1798834
<i>NEIL1_2</i>	cg12978308	0.1900324
<i>OGG1_1</i>	cg15357639	0.9482415
<i>OGG1_2</i>	cg25415932	0.3750677
<i>PARP1_1</i>	cg04960271	0.0350460
<i>PARP1_2</i>	cg17661881	0.0301285
<i>PNKP</i>	cg04314463	0.0293497
<i>POLE</i>	cg02501984	0.0188944
<i>POLH_1</i>	cg06132324	0.0248159
<i>POLH_2</i>	cg07857181	0.0605559
<i>PRKDC</i>	cg23109897	0.3398181
<i>RAD9A_1</i>	cg01787047	0.0261773
<i>RAD9A_2</i>	cg03750407	0.0392630
<i>TDP1_1</i>	cg24023606	0.0355696
<i>TDP1_2</i>	cg14454278	0.0282086
<i>UHRF1_1</i>	cg13282951	0.0553024
<i>UHRF1_2</i>	cg19147390	0.0886999
<i>XPA_1</i>	cg06383088	0.0250192
<i>XPA_2</i>	cg07965714	0.0254356
<i>XRCC4_1</i>	cg23248587	0.0537105

XRCC4_2 | cg25243721 0.0541347

Tabla 1.5: Asociaciones clínicas de los genes DE en nuestra cohorte de LMMC de validación.

Variable		<i>BAP1</i>	<i>PARP1</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>ERCC1</i>
Edad (>81 años)	logFC	0,203	0,265	2,322	-0,117
	<i>p</i>	0,144	0,624	0,501	0,652
Mujer vs. Hombre	logFC	0,183	-0,064	1,708	-0,087
	<i>p</i>	0,140	0,630	0,428	0,123
LMMC-II vs. I	logFC	-0,117	-0,064	-1,496	0,334
	<i>p</i>	0,957	0,277	0,859	0,204
Variante MP vs. MD	logFC	-0,119	-0,396	-1,159	-0,167
	<i>p</i>	0,655	0,158	0,588	0,186
Leucocitos (> 23,800/uL)	logFC	0,147	-0,050	-1,053	-0,079
	<i>p</i>	0,649	0,903	0,793	0,120
Monocitos (>3,440/uL)	logFC	-0,194	0,066	-1,653	0,122
	<i>p</i>	0,814	0,984	0,954	0,047
Hemoglobina<8.8 g/dL	logFC	0,578	0,376	0,561	-0,198
	<i>p</i>	0,023	0,673	0,559	0,799
Plaquetas<94.000/uL	logFC	0,239	0,136	-1,264	-0,258
	<i>p</i>	0,166	0,865	0,800	0,598
LDH (>598 UI)	logFC	-0,094	-0,751	-0,500	2,139
	<i>p</i>	0,804	0,110	0,725	0,174
Enfermedad extramedular	logFC	-0,246	-0,040	-1,480	-0,456
	<i>p</i>	0,311	0,808	0,766	0,947
Blastos en MO (>5%)	logFC	-0,108	0,024	-1,570	0,199
	<i>p</i>	0,937	0,643	0,802	0,154
SG	<i>p</i>	0,170	0,967	0,782	0,030
Progresión a Leucemia	<i>p</i>	0,109	0,241	0,162	0,064
Citogenética anormal	logFC	0,717	0,481	-3,727	0,250
	<i>p</i>	0,464	0,483	0,033	0,161

ANEXO II

Producción Científica durante la Tesis Doctoral

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Artículos como autora relacionados con la tesis

- **Hurtado AM**, Luengo-Gil G, Chen-Liang TH, Amaral F, Batta K, Palomo L, Lumbreras E, Przychodzen B, Caparros E, Amigo ML, Díez-Campelo M, Zamora L, Salido Fierrez EJ, Maciejewski JP, Ortuño FJ, Vicente V, Del Canizo M, Sole F, Ferrer-Marin F, Wiseman DH, Jerez A. Transcriptomic rationale for synthetic lethality-targeting *ERCC1* and *CDKN1A* in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2018 May 24. doi: 10.1111/bjh.15408. PubMed PMID: 29797327. Factor de impacto (2017): 5.128

Artículos como autora durante la tesis

- **Hurtado AM**, Chen-Liang TH, Przychodzen B, Hamedí C, Muñoz-Ballester J, Dienes B, García-Malo MD, Antón AI, de Arriba F, Teruel-Montoya R, Ortuño FJ, Vicente V, Maciejewski JP, Jerez A. Prognostic signature and clonality pattern of recurrently mutated genes in inactive chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2015 Aug 28;5:e342. doi: 10.1038/bcj.2015.65. PubMed PMID: 26314984; PubMed Central PMCID: PMC4558590. Factor de impacto (2015): 4.411

Artículos como colaboradora durante el desarrollo de la tesis

- Iniesta P, Revilla N, Chen-Liang TH, **Hurtado AM**, Vicente V, Heras I, Jerez A, Lozano ML. An Early Increase of CD56^{bright} Natural Killer Subset as Dominant Effect and Predictor of Response to Extracorporeal Photoapheresis for Graft Versus Host Disease. *Transfusion*. doi: 10.1111/trf.14964. Aceptado septiembre 2018. Factor de impacto (2017): 3.423
- Chen-Liang TH, Casado-Prieto AM, Campos-Rodríguez V, **Hurtado AM**, Amigo ML, García-Malo MD, Vicente V, Ortuño FJ, Jerez A. An increased percentage of myeloid CD34+ bone marrow cells stratifies intermediate IPSS-R myelodysplastic syndrome patients into prognostically significant groups. *Int J Lab Hematol*. 2018 May 18. doi: 10.1111/ijlh.12860. PubMed PMID: 29774987. Factor de impacto (2017): 1.919
- Martínez-Losada C, Serrano-López J, Serrano-López J, Noguera NI, Garza E, Piredda L, Lavorgna S, Consalvo MAI, Ottone T, Alfonso V, Peinado JR, García-Ortiz MV, Morales-Ruiz T, Jerez A, **Hurtado AM**, Montesinos P, Cervera J, Such E, Ibañez M, Sempere A, Sanz MÁ, Lo-Coco F, Sánchez-García J. Clonal genetic evolution at relapse of favorable-risk acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation is associated with

phenotypic changes and worse outcomes. *Haematologica*. 2018 Sep; 103(9):e400–e403. doi: 10.3324/haematol.2018.188433. Epub 2018 Apr 5. PubMed PMID: 29622659. Factor de impacto (2017): 9.09

- Gutiérrez–Cívicos R, **Hurtado AM**, Torres–Moreno D, Sanchez–Blanco JJ, Español I, Consuegra–Sánchez L, Perez–Ceballos E, Gutiérrez–Meca MD, Jerez A, Conesa–Zamora P. Rituximab response in follicular lymphoma is associated with the rs20575 polymorphism in *TRAILR1* extrinsic apoptosis trigger. *Pharmacogenet Genomics*. 2017 Feb;27(2):70–77. doi: 10.1097/FPC.000000000000262. PubMed PMID: 27977511. Factor de impacto (2017): 2.25
- Gutiérrez–Cívicos R, **Hurtado AM**, Torres–Moreno D, Sanchez–Blanco JJ, Español I, Consuegra–Sánchez L, Perez–Ceballos E, Gutiérrez–Meca MD, Jerez A, Conesa–Zamora P. A polymorphism in *FASL* is associated with rituximab response in follicular lymphoma patients. *Am J Hematol*. 2016 Jun;91(6):E305–7. doi:10.1002/ajh.24354. Epub 2016 Apr 24. PubMed PMID: 26950187. Factor de impacto (2016): 5.275
- Muñoz–Ballester J, Chen–Liang TH, **Hurtado AM**, Heras I, de Arriba F, García–Malo MD, Iniesta P, Lozano ML, Nieto JB, Ortuño FJ, Osma Mdel M, Padilla J, Teruel–Montoya R, Vicente V, Castilla–Llorente C, Jerez A. Persistent cytotoxic T lymphocyte expansions after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: kinetics, clinical impact and absence of *STAT3* mutations. *Br J Haematol*. 2016 Mar;172(6):937–46. doi: 10.1111/bjh.13917. Epub 2016 Jan 5. PubMed PMID: 26728704. Factor de impacto: 5.670
- Juan Carlos Caballero Berrocal; Mercedes Sánchez Barba; Jesús María Hernández Sánchez; Esperanza Such; Kamila Janusz; Guillermo Sanz; Mónica Cabrero; Carmen Chillón; José Cervera; **Ana María Hurtado**; Andrés Jerez; Cristina Calderón; David Valcárcel; Eva Lumbreras; María Abáigar; Félix López Cadenas; Jesús María Hernández Rivas; Consuelo Del Cañizo; María Díez Campelo. Chronic Graft Versus Host Disease could ameliorate the impact of adverse somatic mutations in patients with Myelodysplastic Syndromes and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Enviado
- Giljun Park, Daehong Kim, Sofie Lundgren, Rajiv K Khajuria, **Ana M. Hurtado**, Cecilia Muñoz–Calleja, Laura Cardeñoso, Samuli Eldfors, Pekka Ellonen, Sari Hannula, Oscar Bruck, Anna Kreutzman, Andres Jerez, Maija Itälä–Remes, Mikko Keränen, and Satu Mustjoki. Somatic Mutations in Expanded T Cell Clones in Patients with Chronic Graft–Versus–Host Disease. Enviado

- Allan Beke, Lucie Laplane, Julie Riviere, Miguel Torres–Martin, Philippe Rameau, Veronique Saada, Chrystèle Bilhou–Nabera, **Ana M.Hurtado**, Larissa Lordier, Cyriane Oeuvray, Karine Leveque, William Vainchenker, Maria E. Figueroa, Nathalie Droin, Eric Solary. Functional heterogeneity exceeds genetic heterogeneity in chronic myelomonocytic leukemia

TRABAJOS A CONGRESOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Congresos Internacionales

- *PARP1* expression profile and divergent clinical impact in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. 23rd Congress of the European Hematology Association. Estocolmo, Suecia. 14/06/2018. **Ana María Hurtado López**; TH Chen–Liang; Laura Palomo; Eva Lumbreras; María Díez Campelo; Lurdes Zamora; Francisco Jose Ortuño; Vicente Vicente; Consuelo del Cañizo; Francisco Solé; Andres Jerez. Tipo de comunicación: Póster Presentado
- Global and Targeted RNA–Sequencing Assessment of Cancer Testis Antigen Re–Expression following Azacitidine in Myelodysplastic Syndromes. 59th ASH Annual Meeting. Atlanta, Estados Unidos de América. 12/2017. **Ana María Hurtado**; Tzu Hua Chen–Liang; Joaquin Panadero; Eduardo Salido; Victor Beltrán; Begoña Muiña; Nuria Villamor; Inés Calabria; Ana Isabel Antón; Andrés Jerez. Tipo de comunicación: Póster Presentado
- Transcriptome of DNA Repair Genes in CMML: Rationale for Targeting *ERCC1* and *CDKN1A* As a Synthetic Lethality Approach. 59th ASH Annual Meeting. Atlanta, Estados Unidos de América. 12/2017. **Ana María Hurtado**; Ginés Luengo–Gil; Tzu Hua Chen–Liang; Fabio Amaral; Laura Palomo; Eva Lumbreras; Bartłomiej Przychodzen; Eva Caparrós; Maria Luz Amigo; María Díez–Campelo; Lurdes Zamora; Eduardo Salido; Jaroslaw Maciejewski; Francisco José Ortuño; Vicente Vicente; Consuelo del Cañizo; Francesc Solé; Francisca Ferrer–Marin; Daniel H. Wiseman; Andrés Jerez. Tipo de comunicación: Póster Presentado
- Transcriptome Assessment of DNA Repair Genes in Chronic Myelomonocytic Leukemia: Synthetic Lethality Targets. 22nd Congress of the European Hematology Association. Madrid, España. 06/2017. **Ana María Hurtado López**; Ginés Luengo Gil; Tzu Chen; Laura Palomo; Eva Lumbreras; Eva Caparrós; Bartłomiej Przychodzen; Mari Luz Amigo; María Díez–Campelo; Lurdes Zamora; Francisco Ortuño; Vicente Vicente; Jaroslaw

Maciejewski; Consuelo del Cañizo; Francesc Solé; Francisca Ferrer–Marin; Andrés Jerez.
 Tipo de comunicación: Póster Presentado

- DNA Repair Genes Transcriptome in Chronic Myelomonocytic Leukemia. The 14th international symposium on myelodysplastic syndromes 2017. Valencia, España. 05/2017. **Ana María Hurtado;** Ginés Luengo–Gil; Tzu Hua Chen–Liang; Laura Palomo; Eva Lumbreras; Eva Caparrós; Bartłomiej Przychodzen; Mari Luz Amigo; María Díez–Campelo; Lurdes Zamora; Francisco Ortuño; Vicente Vicente; Jaroslaw Maciejewski; Consuelo del Cañizo; Francesc Solé; Francisca Ferrer–Marin; Andrés Jerez. Tipo de comunicación: Póster Presentado

- Downregulation of *BAP1* in Chronic Myelomonocytic Leukemia: Correlated with a Post–Translational Reduction of BRCA1 Levels and Independent of Promoter Methylation. 57th Annual Meeting of the American–Society–of–Hematology. Orlando. 12/2015. **Ana María Hurtado;** Gines Luengo–Gil; Laura Palomo; Eva Lumbreras; Eva Caparrós; Tzu Hua Chen–Liang; Bartłomiej Przychodzen; Maria Luz Amigo; María Díez–Campelo; Lurdes Zamora; Francisco José Ortuño; Raul Teruel Montoya; Jaroslaw P. Maciejewski; Consuelo Del Cañizo; Francesc Sole; Francisca Ferrer–Marin and Andres Jerez. Tipo de comunicación: Póster Presentado

- Deubiquitinase *BAP1* Downregulation in Myeloid Malignances: A New Pathogenic Mechanism, Dominant in Chronic Myelomonocytic Leukemia. 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Francisco. 12/2014. **Hurtado, Ana María;** Caparros, Eva; Miguel Torregrosa, Jose; Luengo, Gines; Toderici, Mara; Eugenia Dela Morena, Mara; Muina, Begona; Luisa Lozano, María; Martinez, Constant; Luz Amigo, Mari; De Arriba, Felipe; Ortuno, Francisco; Teruel Montoya, Raul; Ferrer–Marin, Francisca; Vicente, Vicente; Jerez, Andres. Tipo de comunicación: Comunicación escrita

Congresos Nacionales

- Reexpresión de Antígenos Tumorales Testiculares Tras Azacitidina en Síndromes Mielodisplásicos: Nuevas Dianas de Inmunoterapia Identificadas mediante Secuenciación Dirigida de ARN. LX Congreso Nacional de la SEHH y XXXIV Congreso Nacional de la SETH. Granada, 2018. **Ana María Hurtado,** Tzu Hua Chen–Liang, Joaquin Panadero, Eduardo Salido, Victor Beltrán, Begoña Muiña, Noelia Villamor, Inés Calabria, Ana Isabel Antón, Francisco José Ortuño, Vicente Vicente, Andrés Jerez. Tipo de comunicación: Comunicación oral

- Transcriptoma de los genes de reparación del ADN en Leucemia Mielomonocítica Crónica: identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas de letalidad sintética.

LIX Congreso Nacional de la SEHH y XXXIII Congreso Nacional de la SETH. Málaga, 2017. **Ana María Hurtado**; Ginés Luengo-Gil; Tzu Hua Chen-Liang; Laura Palomo; Eva Lumbreras; Eva Caparrós; Bartłomiej Przychodzen; Maria Luz Amigo; 1María Díez-Campelo; Eduardo Salido; Lurdes Zamora; Francisco Ortuño; Vicente Vicente; Jaroslaw Maciejewski; Consuelo del Cañizo; Francesc Solé; Francisca Ferrer-Marin; Andrés Jerez. Tipo de comunicación: Comunicación oral

- Infraexpresión de *BAP1* en Leucemia Mielomonocítica Crónica: Correlación con una Reducción PostTraduccional de los niveles de *BRCA1* e Independiente del Nivel de Metilación del Promotor. LVIII Congreso Nacional de la SEHH y XXXII Congreso Nacional de la SETH. Santiago de Compostela, Galicia, España, 2016. **Hurtado López AM**; Luengo Gil G; Palomo L; Lumbreras E; Caparrós E; Chen-Liang TH; Amigo M.^{al}; Díez-Campelo M; Zamora L; Ortuño FJ; Teruel-Montoya R; del Cañizo C; Sole F; Ferrer-Marín F; Jerez A. Tipo de comunicación: Comunicación escrita

- Infraexpresión de la deubiquitinasa *BAP1* en neoplasias mieloides: nuevo mecanismo predominante en leucemia mielomonocítica crónica. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Madrid, 2014. **A.M Hurtado**; E. Caparrós; JM Torregrosa; G Luengo-Gil; M. Toderici; ME de la Morena-Barrio; M.L Lozano; C. Martínez; ML. Amigo; F de Arriba; FJ Ortuño; V. Vicente; F. Ferrer-Marín; A. Jerez. Tipo de comunicación: Sesión Plenaria