

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Identificación de nuevas alteraciones genéticas y
funcionales en los
síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo a través
del estudio combinado
del genoma, epigenoma y transcriptoma**

Mónica del Rey González
2013

D. Jesús María Hernández Rivas, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo mi dirección por **D.ª Mónica del Rey González** titulado **“IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS ALTERACIONES GENÉTICAS Y FUNCIONALES EN LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS DE BAJO RIESGO A TRAVÉS DEL ESTUDIO COMBINADO DEL GENOMA, EPIGENOMA Y TRANSCRIPTOMA”** reúne, a mi juicio, las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca, a 7 de febrero de 2013.

Fdo. Dr. Jesús Mª Hernández Rivas

**Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiado con la ayuda:
Beca de la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH)**

Índice

Abreviaturas	11
Abstract	17
Introducción general	21
1. Características generales de los SMD	23
1.1. Epidemiología	23
1.2. Etiología	23
1.3. Anomalías en médula ósea y sangre periférica	24
1.4. Clasificación	24
1.4.1. Clasificación de los SMD en relación con el pronóstico	26
1.5. Citogenética	28
2. Patogénesis de los SMD	29
2.1. Modificaciones epigenéticas	30
2.1.1. Metilación	30
2.1.2. microRNAs	32
2.2. Apoptosis	35
2.2.1. Alteraciones en la vía extrínseca de la apoptosis	37
2.2.2. Alteraciones en la vía intrínseca de la apoptosis	38
2.3. Alteraciones en la transcripción	38
2.4. Desregulación del sistema inmune	40
2.5. Alteraciones en la angiogénesis	41
2.6. Cambios en el metabolismo del hierro y mitocondrial en las ARSA	43
3. Aplicación de las nuevas tecnologías al estudio de los SMD	45
3.1. Microarrays de alta densidad	45
3.1.1. Arrays de expresión	45
3.1.2. Arrays de metilación	48
3.2. Secuenciación masiva	50
Hipótesis	55

Objetivos	59
Resultados: Artículos científicos	63
1. Capítulo 1 (Artículo #1)	65
“Genome-Wide Profiling of Methylation Identifies Novel Targets with Aberrant Hyper-methylation and Reduced Expression in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes”	
2. Capítulo 2 (Artículo #2)	103
“Alteration in Endoglin-Related Angiogenesis in Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia”	
3. Capítulo 3 (Artículo #3)	133
“Deregulation of Genes Related to Iron and Mitochondrial Metabolism in Refractory Anaemia with Ring Sideroblasts”	
Discusión general	173
Conclusiones	193
Bibliografía	197

Abreviaturas

ABCB6	<i>ATP-binding cassette, sub-family B, member 6</i>
ABCB7	<i>ATP-binding cassette, sub-family B, member 7</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ago(2)	Argonauta (2)
ALAD	<i>Aminolevulinate dehydratase</i>
ALAS	<i>5-aminolaevulinate synthase</i>
ALAS2	<i>Aminolevulinate, delta-, synthase 2</i>
ALK	<i>Activin receptor-like kinase 5</i>
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i>
AML1 (RUNX1)	<i>Acute myeloid leukemia 1 (Runt-related transcription factor 1)</i>
ANG	Angiogenina
Apaf-1	<i>Apoptosis protease-activating factor-1</i>
APS	<i>Antigen prostate specific</i>
AR	Anemia refractaria
AREB-1	Anemia refractaria con exceso de blastos- tipo 1
AREB-2	Anemia refractaria con exceso de blastos- tipo 2
AREBt	Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
ARG1	Arginasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARSA	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo
ATG	<i>Antithymocyte globulin</i>
BAD (Bad)	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
BAX (Bax)	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCL2 (Bcl-2)	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL2L11	<i>Bcl-2-like 11</i>
BCL- X_L (Bcl-X_L)	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BMEC	<i>Bone marrow endothelial cells</i>
CA2	<i>Carbonic anhydrase II</i>
CCD	<i>Charge coupled device</i>
CDH1	<i>Cadherin-1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CPOX	<i>Coproporphyrinogen oxidase</i>
CRDM	Citopenia refractaria con displasia multilineal
CRDM-SA	Citopenia refractaria con displasia multilineal y sideroblastos en anillo
CRDU	Citopenia refractaria con displasia unilineal
dATP	<i>2'-deoxyadenosine triphosphate</i>
Del	Delección/pérdida
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>

DLK	<i>Delta-like 1 homolog (Drosophila)</i>
EBS	<i>ETS- binding site</i>
ENG	<i>Endogлина</i>
EPO	<i>Eritropoyetina</i>
EPO-R	<i>Erythropoietin receptor</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ETS1	<i>V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i>
EVI1	<i>Ecotropic virus integration site-1</i>
FAB	<i>Francesca-americana-británica</i>
FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>
Fas	<i>TNF receptor superfamily, member 6</i>
FECH	<i>Ferrochelataze</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FN1	<i>Fibronectina 1</i>
FT	<i>Factor de transcripción</i>
FXN	<i>Frataxina 1</i>
FZD9	<i>Frizzled family receptor 9</i>
GATA1	<i>Globin transcription factor 1</i>
GDF15	<i>Growth differentiation factor 15</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIC1	<i>Hypermethylated in cancer 1</i>
HIF1	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i>
IL27	<i>Interleucina 27</i>
IL27R	<i>Interleukin 27 receptor</i>
IL27RA	<i>Interleukin 27 receptor, alpha</i>
IL-6	<i>Interleucina 6</i>
ING1	<i>Inhibitor of growth family, member 1</i>
IPSS	<i>International prognostic scoring system</i>
IPSS-R	<i>Revised International Prognostic Scoring System</i>
ITGAL	<i>Integrin, alpha L</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
KDELR	<i>KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor</i>
LAM	<i>Leucemia aguda mieloblástica</i>
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LCN2	<i>Lipocalina-2</i>
LMMC	<i>Leucemia mielomonocítica crónica</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAP4K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1</i>
MCAM	<i>Methylated CpG islands and microarray</i>
MDM2	<i>Murine/Mouse doble minute 2</i>

MDS	<i>Myelodysplastic syndromes</i>
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MO	Médula ósea
Myc	<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NR	Neutropenia refractaria
OMS	Organización mundial de la salud
PAK2	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
Pi	<i>Inorganic pyrophosphate</i>
PPOX	<i>Protoporphyrinogen oxidase</i>
PTAF	<i>Platelet-activating factor receptor</i>
RBM22	<i>RNA binding motif protein 22</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
SCL25A38	<i>Solute carrier family 25, member 38</i>
sENG	Endoglina soluble
SF3B1	<i>Splicing factor 3b, subunit 1</i>
sFLT-1	<i>Soluble Fms-like tyrosine kinase 1</i>
SLC25A37	<i>Solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37</i>
SMD	Síndromes mielodisplásicos
SMD-t	Síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento
SMDu	SMD inclasificable
SP	Sangre periférica
sVEGF	<i>Soluble vascular endothelial grow factor</i>
TACSTD2	<i>Tumor-associated calcium signal transducer 2</i>
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TF	Transferrina
TFR2	<i>Transferrin receptor 2</i>
TFRC	<i>Transferrin receptor</i>
TGF-β1	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>
THH	Telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I
TIMM10	<i>Translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog (yeast)</i>
TNFSF13	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNNC	Troponina C
TOPBP1	<i>Topoisomerase (DNA) II binding protein 1</i>
TP53 (P53)	<i>Tumor protein p53</i>
TR	Trombopenia refractaria
TRADD	Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) associated death domain protein

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAP1	<i>TNF receptor-associated protein 1</i>
TβRII	<i>TGFβ receptor II</i>
t(11q23)	Translocación (11q23)
UBE2D3	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3</i>
UQCRC1	<i>Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I</i>
UROD	<i>Uroporphyrinogen decarboxylase</i>
UROS	<i>Uroporphyrinogen III synthase</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial grow factor</i>
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>
WPSS	<i>WHO Classification-Based Prognostic Scoring System</i>
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
+8	Trisomía del cromosoma 8
-Y	Pérdida del cromosoma Y

Abstract

MDS are a group of clonal diseases characterized by the presence of morphological dysplasias, ineffective hematopoiesis and peripheral cytopenias. MDS with a small population of blasts, normal karyotype or few morphological abnormalities, are sometimes entities difficult to separate from normality, and therefore, are difficult to diagnose. In this thesis, we have sought to deepen the understanding of the biology of MDS through the study of the transcriptome, genome and methylome in low-risk MDS in order to know whether other characteristics, different from morphological and cytogenetic characteristics, could help its identification. For this, we have used new methods such as microarrays or massive sequencing in the study of these diseases.

Integrative analysis of the epigenetic and expression profiles revealed that 66.7% of the hyper-methylated genes were under-expressed in low-risk MDS cases. The study identified genes with inactivated expression that were involved in the deregulation of pathways related to the development of MDS. The two key apoptotic genes *BCL2* and *ETS1* were identified as silenced genes by methylation. In addition, the immune response and miRNA biogenesis were affected by the hyper-methylation and under-expression of *IL27RA* and *DICER1*. Our integrative analysis revealed that aberrant epigenetic regulation is a hallmark of low-risk MDS patients and could play a central role in these diseases.

On the other hand, we were able to identify a set of genes related to angiogenesis that were differentially expressed in MDS. It led us to a more detailed study of the process through a combined analysis in bone marrow (BM) of gene expression levels, angiogenesis-related soluble factors and functional angiogenesis-related studies. Our findings suggest that RCMD patients show a loss of balance between pro and anti-angiogenic factors. In fact, these patients displayed high levels of expression of pro-angiogenic factors such as *VEGF*, *HIF*, and *FN1* in BM mononuclear cells. However, this group of MDS showed low expression of the *ENG* pro-angiogenic factor, high levels of factors with anti-angiogenic properties (sENG and sFLT-1) in the

marrow microenvironment, lower sVEGF and reduced vessel formation by endothelial cell lines. Functional studies in low-risk MDS have demonstrated aberrant angiogenesis in CRDM patients that could be related to *ENG*.

Finally, we have observed a differential expression profile in the subgroup of RARS that was the basis for an overall mutational analysis in which the genes involved in iron metabolism and mitochondrial played a fundamental role. Thus *SL25A37*, *SLC25A38*, and *ALAD* genes were over-expressed in patients with RARS. In addition *SLC25A38* showed mutations in one case of RCUD and in one patient with congenital sideroblastic anaemia. Two undescribed variants were found in the *ALAD* gene of two RARS patients. The deregulation of genes involved in iron and mitochondrial metabolism provides new insights in our knowledge of MDS with ring sideroblasts. Moreover, new variants in the *ALAD* gene that could be playing a role in the predisposition to the disease were identified.

In summary, the research carried out during the development of this thesis through a global analysis (transcriptome, methylome-genome) has allowed identifying alterations that provide new information about the pathogenesis of low-risk MDS and may have clinical relevance for the disease. Taken together, the genes described in this thesis could be considered as diagnostic markers and even, in some cases, as potential therapeutic targets in the future.

Introducción general

1. Características generales de los SMD

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales caracterizadas por una hematopoyesis ineficaz en la médula ósea (MO) que da lugar a citopenias en sangre periférica (anemia, neutropenia y/o trombocitopenia en grado y combinaciones variables) asociada con la presencia de alteraciones en la morfología de las células hematopoyéticas (displasia). Los SMD se caracterizan además por presentar una tasa elevada de transformación a leucemia aguda mieloblástica (LAM) ¹.

1.1. Epidemiología

La verdadera incidencia de los SMD es difícil de establecer debido a que existen varios factores que limitan una evaluación precisa. Sin embargo, los SMD se consideran una enfermedad rara, con una incidencia estimada de 4 por cada 100.000 personas al año. La enfermedad es más frecuente en la edad avanzada, de tal manera que la incidencia podría ser de 30 casos por cada 100.000 al año en personas mayores de 70 años ²⁻⁴. La mediana de edad de los pacientes se encuentra en los 77 años con predominio en varones ^{2,5}, aunque algunos estudios sugieren que la edad de aparición de los SMD es inferior en los países orientales ^{6,7}.

1.2. Etiología

En la etiología de los SMD se han implicado varios factores de riesgo, incluidos la edad, el sexo masculino, el alcohol, el tabaquismo, la radiación ionizante, la terapia inmunosupresora, las infecciones virales, el benceno y otras exposiciones ambientales u ocupacionales. El subconjunto principal de SMD secundarios comprende los que se producen a partir de tratamientos previos de quimioterapia o radioterapia (SMD-t) ⁵.

1.3. Anomalías en médula ósea y sangre periférica

La MO es generalmente hipercelular. Sin embargo, algunos pacientes pueden presentar celularidad normal o incluso hipocelularidad. Los cambios displásicos pueden aparecer en una MO normal en un número pequeño de células por lo que es importante distinguir entre esta “displasia menor” y un SMD (Tabla 1). Se requiere un mínimo de 10% de células displásicas por linaje para diagnosticar un SMD ^{8,9}.

Tabla 1. Alteraciones morfológicas de la MO en los pacientes con SMD ⁸⁻¹⁰

Diseritropeyisis
Alteraciones en el núcleo (multinuclearidad, puentes internucleares, núcleos en trébol, cambios megaloblásticos) y alteraciones en el citoplasma (vacuolización, defectos en la hemoglobinización, punteados basófilos, sideroblastos anillados)
Disgranulopoyesis
Granulación mielóide reducida o anormal, megacariocitos hipolobulados, formas pseudo-Pelger, núcleos anillados y aumento de la basofilia citoplasmática
Distrombopoyesis
Micromegacariocitos, megacariocitos hiposegmentados y megacariocitos con múltiples núcleos

En la sangre periférica (SP) es frecuente observar anemia, neutropenia y trombopenia asociadas con rasgos displásicos (Tabla 2)

Tabla 2. Alteraciones morfológicas de la SP en los pacientes con SMD ¹⁰⁻¹⁴

Serie roja
Macroцитosis, normocromía, poiquilocitosis, anisocitosis, acantocitosis y células nucleadas
Serie blanca
Monocitosis, hipolobulación nuclear, pseudo-Pelger-Huet, hipogranulación o agranulación y núcleos en anillo
Plaquetas
Plaquetas gigantes, plaquetas alargadas, anisocitosis e hipo-hipergranulación plaquetar

1.4. Clasificación

Debido la heterogeneidad de los SMD se han propuesto varias clasificaciones. La primera clasificación aceptada a nivel internacional fue la propuesta por el grupo FAB,

que separó 5 subgrupos de SMD en función del porcentaje de blastos en MO y en SP, el porcentaje de sideroblastos en anillo y la presencia de monocitosis en SP (Tabla 3) ¹⁵.

Tabla 3. Clasificación FAB de los SMD

Subtipo SMD	% Blastos en SP	% Blastos en MO	% Sideroblastos	Monocitos en SP
AR	<1	<5	<15	<1x10 ⁹ /L
ARSA	<1	<5	>15	<1x10 ⁹ /L
AREB	<5	5-20	<15	<1x10 ⁹ /L
AREBt	>5	21-30	<15	<1x10 ⁹ /L
LMMC	<5	0-20	<15	>1x10 ⁹ /L

AR: anemia refractaria. ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo. AREB: anemia refractaria con exceso de blastos. AREBt: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación. LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

La clasificación de la OMS de 2001, consideró a los AREBt como LAM (Tabla 4). Además incorporó nuevos subtipos de SMD, como el síndrome 5q- y la citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM). En esta clasificación la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) se incluyó en una nueva categoría mixta dentro de los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/SMP) ¹⁶.

Tabla 4. Clasificación de la OMS de 2001 de los SMD

Subtipo de SMD	Blastos en SP (%)	Blastos en MO (%)	Sideroblastos en anillo en MO (%)
AR	<1	<5	<15
ARSA	<1	<5	>15
CRDM	<1	<5	<15
CRDM-SA	<1	<5	>15
AREB-1	1-10	5-10	<15
AREB-2	11-20	11-20	<15
Síndrome 5q-	<1	<5	<15
SMDu	<1	<5	<15

AR: anemia refractaria. ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo. CRDM: citopenia refractaria con displasia multilineal. CRDM-SA: citopenia refractaria con displasia multilineal y sideroblastos en anillo. AREB-1: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 1. AREB-2: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 2. SMDu: SMD inclasificable.

En el año 2008 se actualizó esta clasificación (Tabla 5) ¹⁷ y se incorporó un nuevo subtipo, la citopenia refractaria con displasia unilíneal (CRDU), cuyo término incluye a la anemia refractaria simple de la clasificación OMS 2001.

Tabla 5. Clasificación de la OMS 2008 de los SMD

Subtipo SMD	Blastos (%) SP	Blastos (%) MO	Sideroblastos en anillo (%) MO
CRDU (AR, NR, TR)	<1	<5	<15
ARSA	<1	<5	>15
CRDM	<1	<5	±15
AREB-1	<5	5-9	<15
AREB-2	5-19	10-19	<15
Síndrome 5q-	<1	<5	<15
SMDu	<1	<5	<15

CRDU: citopenia refractaria con displasia unilíneal. AR: anemia refractaria. NR: neutropenia refractaria. TR: trombopenia refractaria. ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo. CRDM: citopenia refractaria con displasia multilíneal. AREB-1: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 1. AREB-2: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 2. SMDu: SMD inclasificable.

En la mayor parte de esta Tesis Doctoral se ha seguido la clasificación de la OMS de 2001.

1.4.1. Clasificación de los SMD en relación con el pronóstico

Los SMD incluyen varias entidades por lo que es preciso disponer de sistemas que ayuden a establecer el pronóstico de cada enfermo para valorar la necesidad y el tipo de tratamiento que deben recibir. Se han propuesto varios sistemas pronósticos de los que el más usado es el IPSS (Tabla 6). Este sistema está basado en la presencia de citopenias, el porcentaje de blastos en la MO y la citogenética, y permite la clasificación de los pacientes con SMD en cuatro categorías de riesgo con un pronóstico significativamente diferente ¹⁸.

Tabla 6. Índice Pronóstico Internacional (IPSS)

Pronóstico	Puntuación				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
Blastos (%) MO	<5	5-10	-	11-20	21-30
Cariotipo*	Bueno	Intermedio	Malo	-	-
Citopenias	0/1	2/3	-	-	-

Grupos de riesgo: Bajo=0; Intermedio-1=0.5-1.0; Intermedio-2=1.5-2.0; Alto=igual o mayor de 2.5

*Bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q); Malo: cariotipo complejo (3 o más alteraciones), alteraciones en el cromosoma 7; Intermedio: otras alteraciones.

Debido a las limitaciones que tiene el IPSS para predecir la supervivencia del paciente y la probabilidad de transformarse en LAM, se propusieron otros sistemas pronósticos entre los que destaca el sistema WPSS (Tabla 7). Este índice incorpora la dependencia a las transfusiones, que ha demostrado ser un factor muy importante en los pacientes con SMD. Junto con la clasificación de la OMS y los grupos de riesgo citogenético es posible separar a los enfermos en cuatro grupos pronósticos diferentes¹⁹.

Tabla 7. Sistema de puntuación pronóstico de la OMS (WPSS)

Variable	0	1	2	3
Categoría OMS	AR, ARSA, Síndrome 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariotipo*	Bueno	Intermedio	Malo	-
Necesita transfusiones	No	Si	-	-

Grupos de riesgo: Muy bajo=0; Bajo=1; Intermedio=2; Alto=3-4; Muy alto=5-6

*Bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q); Malo: cariotipo complejo (3 o más alteraciones), alteraciones en el cromosoma 7; Intermedio: otras alteraciones.

AR: anemia refractaria. ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo. CRDM: citopenia refractaria con displasia multilineal. CRDM-SA: citopenia refractaria con displasia multilineal y sideroblastos en anillo. AREB-1: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 1. AREB-2: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 2.

En los últimos años se han reconocido nuevos factores que tienen valor pronóstico en los SMD y se ha modificado el IPSS, dando lugar al IPSS revisado (IPSS-R). El IPSS-R sigue basándose en las variables presentes en el IPSS pero estratifica los pacientes en 5 grupos de riesgo con claras diferencias en la supervivencia global y en el

riesgo de evolución a LAM (Tabla 8). Además, el IPSS-R reconoce el papel de la edad, la ferritina sérica y la lactato deshidrogenasa, entre otros, en la supervivencia global, aunque no influyen en la evolución a LAM²⁰.

Tabla 8. Índice Pronóstico Internacional Revisado (IPSS-R)

Pronóstico	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Cariotipo*	Muy bueno	-	Bueno	-	Intermedio	Malo	Muy malo
% Blastos en MO	≤2	-	>2% - <5%	-	5-10%	>10%	-
Hemoglobina	≥10	-	8 - <10	<8	-	-	-
Plaquetas	≥100	50 - <100	<50	-	-	-	-
Neutrófilos	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-

Grupos de riesgo: Muy bajo=0-2; Bajo=>2-3.5; Intermedio=>3.5-5; Alto=>5-6; Muy alto=>6

*Muy bueno: del(11q,-Y; Bueno: normal, del(5q), del(20q), del(12p); Malo: der(3)(q21/q26), cariotipo complejo (3 alteraciones), alteraciones en el cromosoma 7; Muy malo: Complejo (más de 3 alteraciones); Intermedio: otras alteraciones.

En este trabajo centraremos principalmente nuestros estudios en la categoría de bajo riesgo y concretamente en los pacientes con AR, ARSA y CRDM.

1.5. Citogenética

En el momento del diagnóstico entre el 40 y el 70% de los pacientes con SMD tienen alteraciones citogenéticas. Las más frecuentes son la del(5q), la monosomía 7 o del(7q), la trisomía 8, y la del(20q) (Figura 1)²¹⁻²³. Las pérdidas en el brazo largo de cromosoma 5 son los cambios citogenéticos más frecuentes en los SMD y se pueden observar aisladas o acompañadas de otras alteraciones. La pérdida del cromosoma Y es también frecuente en los pacientes con SMD, pero puede considerarse como un fenómeno relacionado con la edad y no siempre indica un trastorno clonal²⁴.

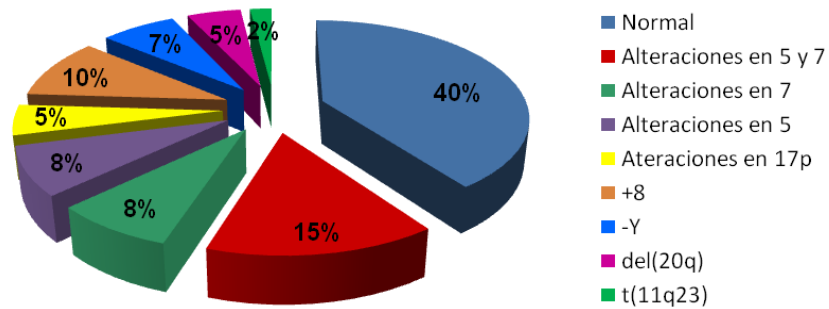


Figura 1. Alteraciones cromosómicas recurrentes en SMD. Tomado de "Hematologic Malignancies: Myelodysplastic Syndromes." Springer. Deeg, H.J./ Bowen, Dana T./ Haferlach, T./ Le Beau, H./ Niemeyer, C./ Deeg, H. Joachim (Editor)

Las alteraciones citogenéticas suelen presentarse en los pacientes con AREB-1 y 2, mientras que los enfermos con ARSA presentan menos alteraciones citogenéticas^{18,25,26}. Además, los SMD secundarios al tratamiento tienen, en comparación con los SMD primarios, un mayor número de cariotipos anormales, cambios citogenéticos complejos, y pérdidas que implican el cromosoma 5, el cromosoma 7 o ambos²⁷.

2. Patogénesis de los SMD

Además de las alteraciones citogenéticas, en la MO de estos enfermos es posible observar una alteración importante de varios mecanismos moleculares y microambientales. Hay una evidencia creciente de que la haploinsuficiencia, los cambios epigenéticos, el sistema inmunológico y el estroma de la MO, entre otros, contribuyen al desarrollo de los SMD²⁷. En esta sección, se exponen éstos y otros mecanismos que podrían estar contribuyendo a la patogénesis de esta enfermedad.

2.1. Modificaciones epigenéticas

2.1.1. Metilación

La metilación del ADN es un proceso epigenético que consiste en la adición de un grupo metilo (CH₃) al carbono en posición 5 del anillo de pirimidina de la citosina en un dinucleótido CpG (Figura 2). Las regiones particularmente ricas en CpG se denominan islas CpG y con frecuencia se encuentra “downstream” o muy próximas a los promotores génicos. Este proceso se lleva a cabo en una reacción orquestada que incluye las metiltransferasas, proteínas con dominio de unión a grupo metilo, y las histona- desacetilasas ²⁸.

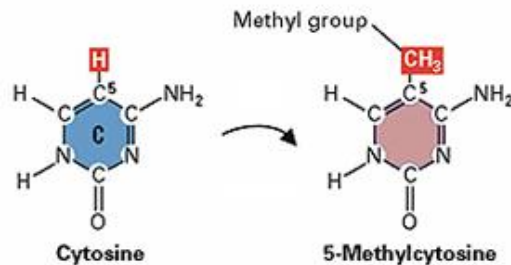


Figura 2. Metilación. Adición de un grupo metilo al anillo de citosina.
Tomado de <http://michaeldomingos.hubpages.com>

La metilación del ADN es el evento epigenético mejor caracterizado que conduce a la estabilización del genoma, la remodelación de la cromatina y la regulación de la transcripción génica ^{29,30}. Además, no sólo la presencia de metilación sino también su localización y densidad juegan un papel crucial en la regulación de estos procesos ^{31,32}. En muchos sistemas, se ha establecido una estrecha correlación entre el silenciamiento transcripcional y la hipermetilación génica ³³. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que la metilación causa silenciamiento del gen es poco conocido, pero podría incluir la interferencia directa con la unión de factores de transcripción, el bloqueo de la maquinaria de transcripción por el reclutamiento de proteínas del dominio de unión al ADN metilado o la alteración de la estructura de la cromatina ³⁴.

Se ha demostrado que las alteraciones epigenéticas tienen un papel en la carcinogénesis. La hipermetilación del ADN en el cáncer está asociada al silenciamiento de genes supresores de tumores, mientras que la hipometilación juega un papel causal en la formación del tumor y en la inestabilidad cromosómica ^{29,31,33,35,36}. Los genes supresores tumorales no son los únicos genes afectados por la metilación aberrante, ya que también pueden estar afectados genes que participan en la reparación del ADN, la apoptosis, la angiogénesis, la regulación del ciclo celular y la interacción célula-célula ³⁷. Por lo tanto, las modificaciones epigenéticas en el promotor y/o en las regiones reguladoras que llevan al silenciamiento transcripcional de los genes y al desarrollo de cáncer deben ser estudiados en cualquier estado oncológico y pueden constituir atractivas dianas terapéuticas.

Son varios los genes que han sido descritos en los SMD como objetivo de metilación. Así, la hipermetilación de los genes implicados en el control del ciclo celular y de la apoptosis es una característica común de esta enfermedad, particularmente de los SMD de alto riesgo. Es bien conocido que *p15INK4b* (*P15*) y *p16INK4a* (*P16*) son genes importantes para la regulación del ciclo celular. Estos dos genes están raramente mutados o delecionados ³⁸; sin embargo, la transcripción del gen *P15* está a menudo silenciada debido a la metilación anormal de su región promotora. La hipermetilación del promotor de este gen se ha observado en el 30-50% de los casos con SMD y se correlaciona con la presencia de un mayor porcentaje de blastos en la MO y con el riesgo de evolución a LAM ^{39,40}.

Se ha demostrado que el número de loci que sufren metilación es mayor en los SMD de alto riesgo y durante la progresión de la enfermedad ⁴¹. Además, algunos cambios epigenéticos podrían disminuir la producción de proteínas supresoras de tumores en los SMD si afectan a genes haploinsuficientes, tales como *FZD9* en el cromosoma 7 (que codifica para el receptor de la proteína WNT) ⁴¹ y *RBM22* en el cromosoma 5 (que codifica para una proteína de unión a ARN) ⁴². Otros genes que están

frecuentemente afectados por la hipermetilación en los SMD son *HIC1*, *CDH1* y *ER*. La hipermetilación de estos genes se asocia con un peor pronóstico en las primeras etapas de los SMD ^{43,44}.

2.1.2. microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una familia de RNAs pequeños no codificantes, de unos 18-25 nucleótidos altamente conservados desde los organismos invertebrados hasta los vertebrados. Los miRNAs inhiben la expresión génica por la unión a la región 3'UTR de su gen diana y modulan la expresión del gen a nivel post-transcripcional ⁴⁵.

La formación de un miRNA comienza con la actuación de la ARN Polimerasa II, que genera un transcrito primario (pri-miRNAs) de varias kilobases de longitud. En este transcrito monocatenario se genera una horquilla compuesta por un fragmento apareado por complementariedad de bases y un pequeño bucle en el extremo. En el núcleo de las células, la proteína Drosha reconoce a esta estructura y la procesa con ayuda de la proteína DGCR8. De esta manera el pre-miRNA se libera y pasa al citoplasma en un proceso mediado por la proteína Exportina 5. Una vez en el citoplasma, la proteína Dicer1 reconoce al pre-miRNA y corta el bucle del extremo, liberando un fragmento de doble cadena. Una de las dos hebras de este dúplex de ARN se une a la proteína de la subfamilia Ago para generar el complejo efector RISC, mientras que la otra cadena es degradada. El complejo RISC usa el miRNA como guía para silenciar de forma específica los ARN mensajeros que contienen una secuencia complementaria a la del "ARN guía" (Figura 3) ⁴⁵.

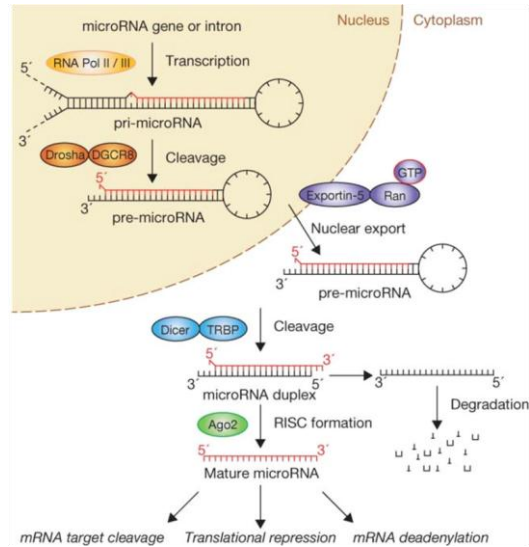


Figura 3. Formación del miRNA ⁴⁶

El análisis del perfil de expresión de los miRNAs ha demostrado que los miRNAs se expresan de manera diferente en muestras normales frente a tumorales ⁴⁷. Cada vez son mayores las evidencias que sugieren que la expresión anormal de los miRNAs es una característica común de los procesos neoplásicos ⁴⁸. De hecho, los patrones de expresión de los miRNAs pueden distinguir cánceres según su diagnóstico y estadio de desarrollo ⁴⁹.

En el caso concreto de los SMD, algunos trabajos recientes han demostrado cómo el perfil de expresión de los miRNAs permite diferenciar los SMD de los controles, los enfermos con alteraciones cromosómicas de aquellos que no las presentan e incluso los distintos subtipos de SMD entre sí ⁵⁰⁻⁵³ (Tabla 9). Otros trabajos además se han centrado en el estudio de la expresión de determinados miRNAs en la MO de los pacientes con SMD. Así, los SMD presentan una sobreexpresión de miR-10a/b, miR-15a/miR-16, miR-21, miR-126, miR-155, miR-181 y miR-222 respecto a controles y también se observa una sobreexpresión del miR-15a y del miR-16 en los SMD de bajo riesgo respecto a los de alto riesgo ⁵⁴.

Tabla 9. miRNAs infraexpresados en los SMD ⁵⁵

miRNA	Cromosoma	Subtipo de SMD
miR-197	1p13.3	Todos los SMD
miR-128b	2q21.3, 3p22.3	Del(5q)
miR-1284	3p14.1	Todos los SMD
miR-95	4p16.1	Del(5q)
miR-1305	4q35.1	Todos los SMD
miR-583	5q15	Todos los SMD
miR-143	5q33.1	Del(5q), AR/CRDM (+8)
miR-145	5q33.1	Del(5q), AR/CRDM (+8)
miR-146a	5q33.3	Del(5q), todos los SMD
miR-206	6p12.2	Del(5q), todos los SMD
miR-93	7q22.1	AR/CRDM (+8)
miR-182	7q32.2	Del(5q)
miR-335	7q32.2	Del(5q), AR/CRDM (+8)
miR-124	8p23.1	Todos los SMD
miR-875-5p	8q22.2	Todos los SMD
miR-30d	8q24.22	AR/CRDM (+8)
miR-661	8q24.3	AR/CRDM (tri8), del(5q)
let-7a	9q22.32, 11q24.1, 22q13.31	Todos los SMD
miR-326	11q13.4	Todos los SMD
miR-940	16p13.3	Todos los SMD
miR-423-5p	17q11.2	Todos los SMD
miR-10a	17q21.32	Del(5q), SMD de bajo riesgo, LMMC
miR-196a*	17q21.32, 12q13.13	Todos los SMD
miR-150	19q13.33	Del(5q), todos los SMD
miR-520c	19q13.41	Del(5q)
miR-525-5p	19q13.41	Todos los SMD
miR-507	Xq27.3	Todos los SMD

El perfil de expresión diferencial que ha sido descrito para los miRNAs en los SMD podría reflejar una alteración en el proceso de formación de los mismos. De este modo, los enzimas implicados en dicho proceso, tales como DICER1, estarían dañados, lo que provocaría una desregulación en el conjunto de los miRNAs, tal y como se ha mostrado en algunos trabajos. Por todo ello, una mejor comprensión de los mecanismos que controlan la expresión diferencial de estos miRNAs en los SMD así como sus consecuencias funcionales podría mejorar el conocimiento de la patogenia de estos enfermos.

2.2. Apoptosis

Descrita por primera vez en 1980⁵⁶, la apoptosis es un proceso dependiente de energía caracterizado morfológicamente por la condensación citoplasmática y nuclear, la fragmentación de los núcleos a "cuerpos apoptóticos", la preservación de la integridad de membrana plasmática y la fagocitosis de los restos celulares por los macrófagos en ausencia de una respuesta inflamatoria⁵⁷⁻⁵⁹. Este mecanismo de muerte es crucial en el mantenimiento de un número de células en un organismo. Las alteraciones de la apoptosis han sido implicadas en muchas enfermedades, entre las que se incluyen los SMD.

El proceso de apoptosis puede ser conceptualmente dividido en dos: la **vía extrínseca** y la **vía intrínseca**.

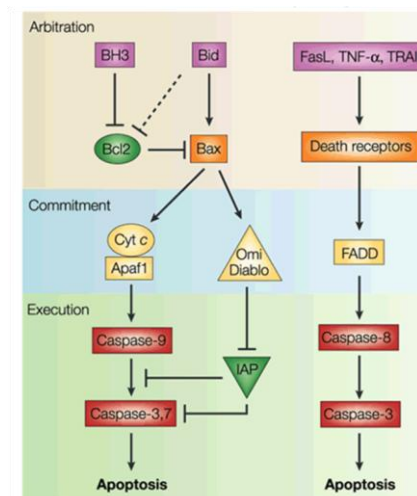


Figura 4. Vía intrínseca (izquierda) y vía extrínseca (derecha) de la apoptosis⁶⁰

La activación de la **vía extrínseca** de la apoptosis está mediada por la unión de los ligandos de muerte (ej. Fas, TNF- α y TRAIL) a los receptores transmembrana de las células⁶¹⁻⁶⁴. Por el contrario, el estrés y el daño celular pueden iniciar la **activación intrínseca** de las procaspasas. En esta vía, las mitocondrias son estimuladas para liberar

citocromo c al citosol, el cual forma un complejo con Apaf-1, procaspasa-9 y dATP^{65,66}. Este complejo activa la ruta de las caspasas que desencadenan finalmente la apoptosis (Figura 4).

La familia Bcl-2 de proteínas intracelulares incluye muchos de los reguladores más importantes de la apoptosis (Figura 5)⁶⁷. Algunos miembros proapoptóticos de la familia, tales como Bad actúan mediante la unión y la inactivación de los miembros inhibidores de muerte celular de la misma familia⁶³. Otras moléculas apoptóticas tales como Bax y Bak estimulan la liberación de citocromo c de la mitocondria. Forman homo o heterodímeros que crean poros de membrana o canales de iones que facilitan la liberación de citocromo c y otras proteínas apoptogénicas⁶⁸⁻⁷¹. Por el contrario, algunos miembros de esta familia, tales como Bcl-2 y Bcl-X_L inhiben la apoptosis mediante el bloqueo en la liberación de citocromo c (Figura 5). Estas moléculas, pueden unirse directamente y secuestrar citocromo c y Apaf-1 o interactuar con Bax o Bak, inhibiendo de este modo la formación de poros de membrana⁷²⁻⁷⁵.

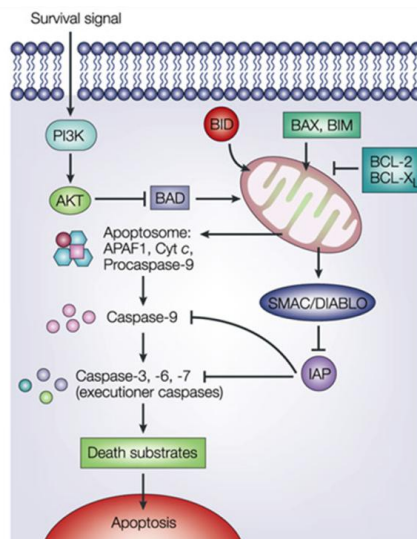


Figura 5. Bcl-2 en la ruta de apoptosis⁷⁶

Los estudios de la morfología, la inmunohistoquímica, la citometría de flujo y la detección molecular de proteínas han permitido demostrar una alta tasa de apoptosis en los SMD ⁷⁷. En 1995 se demostró por primera vez un aumento de la apoptosis en pacientes con SMD más indolentes ^{78,79}. Estos estudios se corroboraron mediante el análisis de la fracción CD34+ ⁸⁰ y de las células no clonales ⁸¹.

La causa de la apoptosis anormal en los SMD es desconocida. Aún se desconoce si el aumento de la actividad caspasa se debe a la activación de la vía extrínseca o de la ruta apoptótica intrínseca, por lo que ambas vías siguen siendo estudiadas en la actualidad.

2.2.1. Alteraciones en la vía extrínseca de la apoptosis

Algunos autores sugieren la desregulación de la vía extrínseca como la razón principal del aumento de la apoptosis en los SMD. Más concretamente, se ha descrito que los ligandos de muerte celular (TRAIL, Fas) podrían estar implicados en dicha desregulación ⁸². Así se ha observado que TRAIL bloquea la diferenciación de eritroblastos en SMD de bajo riesgo determinando la severidad de la diseritropoyesis y la anemia ⁸³. Otros estudios han demostrado que Fas se sobreexpresa en aproximadamente el 40% de los SMD más indolentes e incluso que existe una correlación negativa entre la intensidad de la expresión de Fas en las células CD34 + y el porcentaje de blastos en la MO ⁸⁴. Fas aumenta la apoptosis y disminuye el crecimiento de colonias de igual manera en las ARSA y en los controles. Sin embargo, causa una activación de las caspasas significativamente mayor en las ARSA ⁸⁵. Otros estudios han demostrado una mayor actividad de la caspasa-8 inducida por Fas en las AR y ARSA que en condiciones normales o en SMD en estado avanzado ^{86,87}.

Por otro lado, no hay consenso acerca de los receptores de muerte celular de Fas, TNF- α y TRAIL. Mientras que en algunos estudios se ha descrito que estas

moléculas están sobreexpresadas y promueven la apoptosis en las células eritroides de los SMD indolentes⁸⁸⁻⁹¹, otros trabajos sugieren que el bloqueo del receptor Fas por anticuerpos antagonistas no rescata de la apoptosis a las células de los enfermos con ARSA⁸⁵.

2.2.2. Alteraciones en la vía intrínseca de la apoptosis

Recientemente, se ha sugerido que las alteraciones en la vía intrínseca podrían ser las desencadenantes del aumento de la apoptosis en los SMD^{92,93}. Varios estudios han analizado la expresión de ciertos miembros de la familia de Bcl-2 (pro- versus anti-apoptóticos), ya que estas proteínas controlan los potenciales de membrana mitocondrial. Así, la proporción de C-Myc:Bcl-2 es mayor en los casos de los SMD más indolentes y menor en los SMD en estadios más avanzados y en las LAM. Además, la relación entre Bax (pro-apoptótica) y Bcl-2 (anti-apoptótica) está aumentada en fases iniciales de los SMD, y disminuye cuando la enfermedad está más avanzada^{77,94,95}. Estos estudios apoyan la hipótesis de que el equilibrio relativo entre la muerte celular y la señalización de la célula por la supervivencia está asociado al aumento de la apoptosis observada en progenitores de los SMD. Por tanto, el aumento de la apoptosis en los SMD podría estar relacionado con alteraciones en los miembros de la familia de Bcl-2, sin embargo, las causas de esta desregulación siguen siendo desconocidas.

2.3. Alteraciones en la transcripción

Los factores de transcripción (FTs) son proteínas capaces de unirse a las regiones promotoras de algunos genes para modular la expresión de los mismos y regular la producción de las proteínas codificadas por dichos genes. Los FTs son fundamentales en procesos como la elección de linaje, la maduración y la autorrenovación celular. Estos

procesos desempeñan un papel muy importante en la hematopoyesis y, por tanto, en el desarrollo de las neoplasias hematológicas⁹⁶.

Algunos FTs pueden verse implicados en reordenamientos cromosómicos, como es el caso de *EVI1*, localizado en 3q26. Los pacientes con SMD pueden sufrir translocaciones o inversiones a este nivel, que pueden dar lugar a la expresión inapropiada de *EVI1*⁹⁷. La expresión anormal de *EVI1* en las células hematopoyéticas está implicada en el desarrollo y progreso de los SMD⁹⁸. Además *EVI1* reprime la expresión del receptor de EPO en modelos animales, lo que podría explicar en parte la falta de respuesta a EPO que pueden tener algunos pacientes con SMD⁹⁹.

La formación de megacariocitos y de su completa diferenciación en plaquetas depende especialmente del nivel de expresión del FT *GATA1*¹⁰⁰. La expresión de *GATA1* está desregulada en los SMD y es posible que las alteraciones en la metilación pudieran ser las responsables de esta alteración, lo que podría contribuir a la eritropoyesis ineficaz observada en los SMD¹⁰¹. Por último, la mutación de algunos FTs puede ocasionar alteraciones en su expresión, como ocurre con *AML1 (RUNX1)* en los SMD¹⁰².

En resumen, son muchos los FTs que pueden estar desregulados en los SMD y varias las causas que pueden dar lugar a esta desregulación (reordenamientos cromosómicos, metilación, mutación...). Por consiguiente, un estudio sobre la regulación de los FTs, así como de las dianas en las que un FT está influyendo podría aportar nuevos datos en el estudio de la patogénesis de los SMD.

2.4. Desregulación en el sistema inmune

Hay una evidencia creciente de que la desregulación inmune juega un papel importante en la fisiopatología de los SMD. La incidencia de trastornos autoinmunes está aumentada en estos pacientes ¹⁰³ y de hecho, en un estudio realizado con un amplio número de enfermos se comprobó que el 63% de los casos analizados presentaban alguna alteración relacionada con el sistema inmune ¹⁰⁴.

Las alteraciones más frecuentemente descritas son la hipergammaglobulinemia así como las alteraciones cuantitativas y funcionales de los linfocitos T y de las células NK ¹⁰⁵. Varios estudios han demostrado la existencia de expansión policlonal de los linfocitos T (CD4+) o la expansión clonal u oligoclonal de las células T citotóxicas (CD8+) en la sangre y en la MO de estos pacientes ^{106,107}. Estos datos llevaron a proponer que la mielosupresión observada en los SMD podría deberse a un proceso autoinmune mediado por linfocitos T ^{108,109}.

Algunos estudios clínicos han mostrado que el tratamiento de determinados pacientes con globulina antitimocítica (ATG) y ciclosporina puede ser eficaz en los SMD. ¹¹⁰⁻¹¹². La ATG ha dado lugar a respuestas hematológicas completas hasta en el 10-15% de los SMD ¹¹¹, que se ha asociado con la desaparición de clones de células T ^{113,114}.

Sin embargo, las preguntas fundamentales acerca de los mecanismos de la autoinmunidad en los SMD siguen sin respuesta. La hipótesis de que los linfocitos T atacan a los antígenos específicos de células progenitoras de los SMD sigue sin demostrarse. Asimismo, no está claro por qué algunos pacientes responden a la inmunosupresión y otros no.

2.5. Alteraciones en la angiogénesis

La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes por lo que es un mecanismo biológico importante en el mantenimiento y recuperación del organismo. En condiciones fisiológicas normales, tiene lugar durante el desarrollo embrionario, en los procesos de cicatrización de heridas, en la restauración del flujo sanguíneo en los tejidos dañados, en la reconstrucción cíclica del endometrio y en la génesis de la placenta durante el embarazo ¹¹⁵. Las alteraciones de este proceso están asociadas con el crecimiento, la difusión y la metástasis en los tumores sólidos ¹¹⁶ y con las neoplasias hematológicas, aunque en éstas últimas parece desarrollarse de forma diferente a los tumores sólidos ^{117,118}.

Gran parte de los estudios muestran que la angiogénesis es mayor en los SMD respecto a individuos control y son varios los trabajos que demuestran que la microvasculatura en la MO de estos pacientes parece ser mayor que en personas sin hemopatías malignas (Figura 6) ^{117,119-121}. Además, se ha descrito que los niveles en plasma de ciertos factores angiogénicos como VEGF, bFGF o HGF están aumentados en los SMD ^{117,122}, mientras que los niveles de la ANG y la IL-6 son mayores en los SMD de alto riesgo respecto a los de bajo riesgo ¹¹⁹.

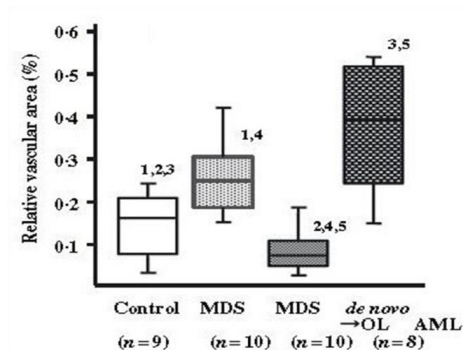


Figura 6. Comparación de la densidad microvascular en la MO de controles, SMD, SMD transformados y LAM ¹²⁰

Se ha demostrado que la microvasculatura en la MO de pacientes con AREBt es mayor que en pacientes con AR, ARSA o AREB ¹²³. Por el contrario, otros trabajos describen la formación de colonias endoteliales en los casos de AR, ARSA y AREB, pero no en los enfermos con AREBt ¹²⁴, así como una relación negativa entre la microvasculatura y el riesgo de transformación a LAM ¹²⁵. La alteración de los procesos angiogénicos es, por tanto, evidente en los SMD, aunque no hay trabajos funcionales que profundicen en el estudio en las diferentes entidades de SMD.

Son muchas las moléculas implicadas en la angiogénesis, y entre ellas la endogлина (ENG) ha adquirido en los últimos años un papel relevante en este proceso. La ENG es una glicoproteína integral de membrana cuyas propiedades la han convertido en un marcador de angiogénesis tumoral y un objetivo para la terapia anti-angiogénica ^{126,127}. En estudios realizados en células endoteliales procedentes de vasos de diferentes tumores se ha observado una correlación entre el aumento en la expresión de la *ENG* y la proliferación de células endoteliales tumorales ¹²⁸. Sin embargo, en células de cáncer de próstata, la ENG suprime la adhesión celular, la motilidad y la invasión y su expresión disminuye en la progresión del tumor ^{129,130}.

Por otro lado, a pesar de que la ENG es una proteína de membrana, se pueden encontrar niveles disminuidos de su forma soluble en el plasma (sENG), probablemente debido a un corte proteolítico ¹³¹. Se ha demostrado que la sENG provoca disfunción endotelial, inhibe la formación de pseudocapilares "in vitro" y aumenta la permeabilidad vascular ^{132,133}. Los niveles de la forma soluble de ENG pueden encontrarse aumentados en ciertos tumores sólidos como por ejemplo el cáncer de mama ¹³⁴. Además, los niveles altos de la sENG parecen correlacionarse con el riesgo de desarrollar metástasis en estos pacientes así como en enfermos con cáncer de color y pulmón ^{135,136}; por tanto, estos estudios indican que la sENG podría servir como marcador pronóstico de la progresión tumoral en varios tipos de cáncer ¹²⁷. Otros

estudios muestran una elevada concentración de la proteína soluble en las LAM y las neoplasias mieloproliferativas crónicas ¹³⁷.

2.6. Cambios en el metabolismo del hierro y mitocondrial en las ARSA

La anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA) es un subtipo de SMD que presenta anemia aislada, eritrocitos hipocrómicos, eritropoyesis ineficaz hiperplásica y acúmulos de hierro mitocondrial en las células precursoras eritroides. Dichos acúmulos de hierro (en forma de sideroblastos en anillo alrededor del núcleo), parecen estar implicados en el aumento de la apoptosis de los eritroblastos y, por lo tanto, en la eritropoyesis ineficaz ¹³⁸. Sin embargo, la base molecular de esta acumulación anormal de hierro, de los defectos en las funciones mitocondriales y de la biosíntesis ineficaz el grupo hemo en la ARSA sigue siendo desconocida.

El hierro es esencial para la síntesis del grupo hemo y la biogénesis del cluster Fe-S en la célula eritroide. Ambos procesos tienen lugar en la mitocondria. La síntesis del grupo hemo es iniciada por el enzima ALAS, que cataliza el primer paso del proceso. Otros enzimas tales como ALAD catalizan los pasos intermedios de la síntesis y, por último, el hierro se incorpora a la protoporfirina IX por medio del enzima FECH ^{104,139,140}. Se ha especulado que un defecto en alguno de los enzimas que catalizan esta síntesis lleva a la escasez de precursores del hemo en la ARSA y de hecho, se ha demostrado que esta entidad presenta la expresión alterada en genes implicados en la biosíntesis del grupo hemo así como de genes mitocondriales. Además, los perfiles de expresión génica en células CD34+ demostraron que los pacientes con ARSA constituyen un grupo relativamente homogéneo debido en parte a la expresión alterada de este conjunto de genes (Tabla 10) ¹⁴¹.

Tabla 10. Genes diferencialmente expresados en la ARSA ¹⁴¹

	AR	AREB	ARSA
Biosíntesis del grupo hemo			
<i>FECH</i>	1.35 (0.69-3.89)	1.07 (0.45-2.02)	2.20 (0.79-5.78)
<i>ALAS2</i>	2.00 (0.65-20.44)	1.60 (0.60-29.17)	12.77 (1.16-104.4)
<i>ALAD</i>	1.12 (0.74-2.84)	0.97 (0.66-2.19)	1.93 (0.88-4.90)
<i>HMBS</i>	1.10 (0.60-2.43)	0.94 (0.52-2.02)	2.41 (0.89-8.39)
<i>UROD</i>	1.03 (0.43-2.24)	0.91 (0.30-2.22)	1.73 (0.87-2.83)
Otros genes eritroides			
<i>GATA1</i>	1.22 (0.79-2.38)	0.90 (0.52-2.21)	1.91 (0.80-3.36)
<i>CA2</i>	1.15 (0.17-8.97)	0.88 (0.12-2.63)	1.90 (0.28-10.36)
<i>EPO-R</i>	1.40 (0.70-3.36)	1.02 (0.41-2.70)	2.08 (1.19-4.66)
Genes mitocondriales			
<i>CGI-69</i>	1.31 (0.75-3.09)	1.49 (0.77-4.71)	3.03 (1.23-9.33)
<i>TRAP1</i>	0.92 (0.42-1.59)	0.93 (0.43-2.58)	1.62 (0.79-2.75)
<i>TIMM10</i>	0.96 (0.59-1.90)	0.93 (0.39-2.24)	1.64 (0.65-2.79)

A su llegada a la mitocondria, El Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} . Existen evidencias que apuntan hacia el complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria como artífice de este proceso ^{142,143}. El Fe^{2+} es la única forma en la puede ser utilizado por el enzima FECH por lo que si esta conversión no se produjera el hierro se acumularía en la matriz mitocondrial ¹⁰⁴. Basados en esta idea, algunos autores proponen un modelo patogénico en las ARSA que postula un defecto en el metabolismo del hierro mitocondrial y no en la síntesis del grupo hemo ¹⁴⁴. La primera evidencia de disfunción de la cadena respiratoria en la MO de pacientes con ARSA fue descrita en 1980 ¹⁴⁵. Estos autores observaron que el citocromo c oxidasa y la ATPasa sensible a oligomicina, ambos componentes de la cadena respiratoria, presentan una actividad reducida en pacientes con ARSA. Además, la función de la cadena respiratoria puede verse comprometida por mutaciones en el ADN mitocondrial. Así, han sido identificadas numerosas mutaciones puntuales que podrían estar jugando un papel en la patogénesis de las ARSA ^{92,146-148}.

El hierro que no se incorpora en la síntesis del grupo hemo es transportado por la proteína de membrana ABCB7 fuera de la mitocondria ¹³⁹. La infraexpresión de *ABCB7* en las ARSA ¹⁴⁹, junto con la analogía de esta entidad con la anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, en la que el gen se encuentra mutado, hicieron que *ABCB7* se propusiera como candidato causante de la formación de sideroblastos en estos pacientes ¹⁴⁹. Sin embargo, los análisis mutacionales revelaron que la secuencia de *ABCB7* no presenta variaciones en los pacientes con ARSA adquirida ^{149,150}.

Además, algunos estudios han mostrado una sobreexpresión de la ferritina mitocondrial y una relación significativa entre el porcentaje de ferritina en los eritroblastos y el de sideroblastos en anillo. Estos hallazgos sugieren que la mayor parte del hierro mitocondrial depositado en la zona perinuclear de los sideroblastos está presente en forma de ferritina mitocondrial ^{151,152}.

3. Aplicación de las nuevas tecnologías al estudio de los SMD

3.1. Microarrays de alta densidad

3.1.1. Arrays de expresión

El transcriptoma o perfil de expresión génico de un individuo es el conjunto total de genes que se expresan o se transcriben a partir del ADN genómico y determina el fenotipo y la función celular. Los microarrays de expresión permiten realizar el estudio global del transcriptoma así como de sus alteraciones ya que permiten el análisis simultáneo de miles de genes en un único experimento.

La introducción de la tecnología de los microarrays o biochips a mediados de los 90 ha representado un punto de inflexión en el estudio del cáncer. Durante la última década, este tipo de abordaje ha permitido la clasificación de algunas neoplasias y definir nuevas entidades a través de las diferencias entre los perfiles de expresión. Además los biochips han permitido correlacionar las firmas genéticas de algunos tumores con el pronóstico de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Los perfiles de expresión también se han aplicado al análisis de la progresión tumoral, con el fin de identificar genes específicamente activados o inactivados durante los distintos estadios del tumor. Por último, esta tecnología ha ayudado a la identificación de dianas terapéuticas en el cáncer. Los investigadores han estudiado la expresión de miles de genes en una gran variedad de cánceres, incluyendo linfomas difusos de célula B grande, linfomas foliculares, LAM y SMD ¹⁵³⁻¹⁶⁰.

El estudio del perfil de expresión génico ha permitido diferenciar los SMD de las LAM ¹⁶¹, los SMD de bajo riesgo de los de alto riesgo ¹⁶², los pacientes con SMD-t de aquellos cuya enfermedad se mantiene estable ¹⁶³ así como los casos que presentan un cariotipo complejo aberrante de los SMD sin alteraciones cromosómicas. Además los pacientes con 5q-, trisomía 8 y -7/del (7q) presentan un perfil de expresión característico y diferencial (Figura 7) ^{141,164}.

Los estudios de arrays han permitido conocer que las vías desreguladas en los SMD incluyen la señalización de interferones, la señalización de trombopoyetina y las vías de Wnt ¹⁶⁴ así como los genes que codifican para factores de crecimiento, proteínas implicadas en la regulación redox y proteínas de membrana ¹⁶¹. Los pacientes con SMD de bajo riesgo presentan un aumento de la susceptibilidad a los daños celulares ¹⁶² y una infraexpresión de los genes asociados al linaje de células B ¹⁶⁵, mientras que los casos de alto riesgo tienen una sobreexpresión de genes asociados a la proliferación ¹⁶². Dentro de las rutas desreguladas en los SMD de bajo riesgo se encuentran la apoptosis,

inmunodeficiencia y quimioquinas, mientras que los SMD avanzados se caracterizan por la desregulación de la respuesta al daño en el ADN ¹⁶⁴.

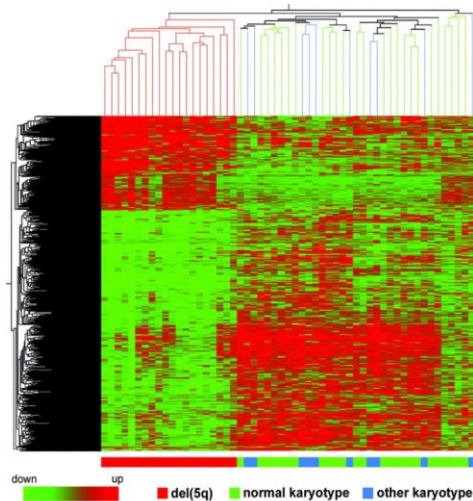


Figura 7. Análisis no supervisado a partir de los genes diferencialmente expresados en los pacientes con del(5q), pacientes con SMD con cariotipo normal y SMD con alteraciones citogenéticas distintas a 5q-, que demuestra un perfil genético diferenciado en los enfermos con 5q- ¹⁴¹

Los estudios del perfil de expresión han demostrado que el gen *DLK* se expresa en la mayoría de los casos de SMD y rara vez en los casos de LAM ¹⁶¹. Además, algunos trabajos parecen indicar que la expresión alterada de los genes *TACSTD2*, *UQCRC1*, *TNNC* y *KDELR* en células CD34+ es predictiva en casos con SMD de bajo riesgo ¹⁶² y que existe una correlación entre la mayor expresión de *FLT3* con el porcentaje de blastos, mientras que una mayor expresión de *ARG1*, *LCN2* y *MMP9* se asocia con un porcentaje menor de blastos. Se ha demostrado que la expresión específica de algunos genes en las diferentes etapas de la enfermedad puede tener importancia pronóstica ya que en algunas situaciones puede predecir la transformación leucémica ^{166,167}.

En resumen, los estudios de expresión génica de las células progenitoras o de los neutrófilos en los SMD han puesto de relieve la heterogeneidad de la enfermedad a nivel molecular, las diferencias en la expresión genética entre la enfermedad de bajo y alto riesgo y las diferencias entre los grupos citogenéticos de los SMD. Además, el

análisis mediante microarrays puede proporcionar datos suficientes para detectar genes o patrones de genes, que están asociados con alteraciones específicas en las vías celulares o cascadas de señalización en los SMD. La identificación de "firmas moleculares específicas" puede generar información relevante para seguir avanzando en la predicción del pronóstico y en la respuesta al tratamiento.

3.1.2. Arrays de metilación

Durante la última década, el interés por la metilación del ADN ha crecido rápidamente por lo que sus métodos de análisis han experimentado avances importantes. De esta manera, los análisis que se restringían a localizaciones específicas en un número limitado de genes se combinan ahora con el análisis a gran escala del metiloma completo ¹⁶⁸. Estos análisis de alto rendimiento se utilizan actualmente para identificar las firmas de metilación de diferentes tumores que pueden ser de gran utilidad en la detección temprana de la enfermedad o en el diagnóstico de la misma. Estas tecnologías también pueden ayudar a mejorar el conocimiento de la evolución del paciente lo que permite asentar unas bases racionales para la terapia epigenética.

En el año 2007, la técnica de amplificación de las islas CpG metiladas (MCA) se combinó con la tecnología de los microarrays dando lugar a los arrays de metilación MCAM. Esta metodología, utilizada para la realización de esta tesis doctoral, permite analizar la metilación de 12192 islas CpG a lo largo del genoma completo. Además permite obtener información sobre hipermetilación e hipometilación en promotores, regiones 5' y regiones 3' ¹⁶⁹. Las islas CpG metiladas son seleccionadas mediante el uso de oligonucleótidos después de dos rondas de digestión: el ADN genómico se digiere en primer lugar con SmaI, que elimina sitios no metilados, y a continuación con XmaI, que crea extremos cohesivos en los fragmentos metilados. Posteriormente, y gracias a la unión de adaptadores, el ADN es amplificado y los amplicones resultantes (la fracción metilada del genoma) son marcados con fluorocromos. Por último, se realiza una

hibridación competitiva entre la muestra del paciente y una muestra control sobre una plataforma de microarrays (Figura 8) ¹⁶⁹.

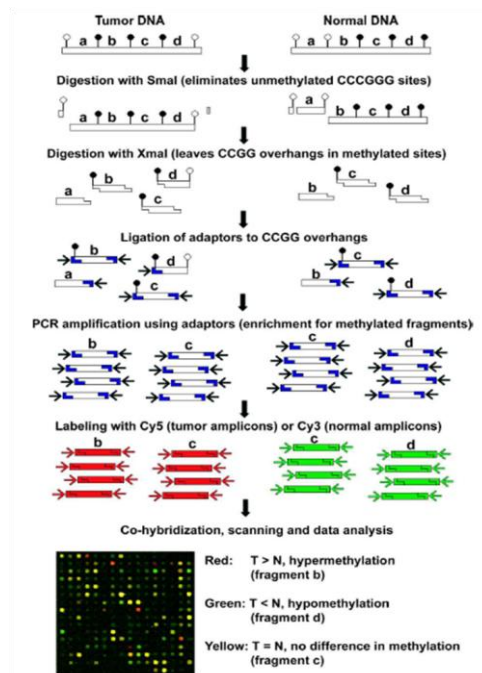


Figura 8. Esquema del método MCAM ¹⁶⁹

El patrón de metilación de los SMD no ha sido tan bien estudiado como en otras hemopatías malignas y la mayoría de los estudios se han centrado en análisis que se restringen a un número limitado de genes. Sin embargo, es interesante destacar algunos trabajos recientemente publicados sobre el análisis del perfil de metilación en los SMD en los que se pone de manifiesto la importancia de este tipo de estudios para la comprensión de la enfermedad. Concretamente, estos estudios muestran una mayor metilación en los SMD respecto a controles sanos ¹⁷⁰ así como en los SMD-t en relación con el resto de SMD ⁴¹. Los genes diferencialmente metilados en los SMD parecen estar relacionados con las rutas de WNT y de las MAPK ¹⁷⁰. Se ha descrito que existe una asociación entre el estado de metilación de los genes *P16*, *CHK2* y *WT1* y el IPSS ¹⁷¹ y se atribuye un peor pronóstico a los pacientes que presentan pérdida y metilación del gen

FZD9⁴¹. Además, se ha observado que la metilación de los pacientes con SMD tratados con azacitidina disminuye respecto a la fase inicial¹⁷⁰.

3.2. Secuenciación masiva

En el año 2001 se publicó el primer borrador del genoma humano, que costó casi 3.000 millones de dólares. Estos costes, inasumibles para cualquier laboratorio, estimularon a algunos científicos a buscar soluciones más económicas. En esta búsqueda, se desarrollaron los secuenciadores de segunda generación, capaces de generar cientos de miles de reacciones de secuencias en paralelo gracias a la inmovilización de las reacciones en una superficie sólida. Concretamente, la tecnología aplicada por Roche en su modelo GS-FLX (utilizado en esta tesis doctoral) permite la lectura de hasta 100 millones de bases en un tiempo aproximado de 4 horas a un coste asequible.

La secuenciación masiva en paralelo está basada en la *pirosecuenciación* del ADN y los pasos seguidos con esta tecnología son los que se describen a continuación (Figura 9):

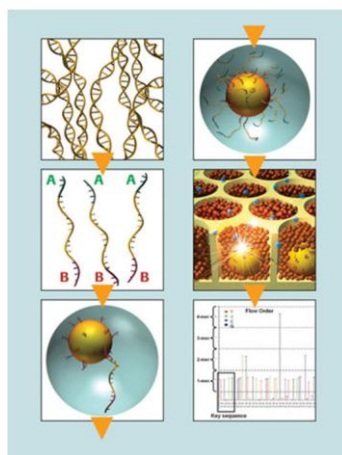


Figura 9. Esquema de la técnica de secuenciación masiva. Tomado de <http://www.genengnews.com>

1- Preparación de la librería de ADN

La preparación de la librería de ADN consiste en el fraccionamiento del ADN genómico (gDNA) en pequeños fragmentos (de 300 a 500 pb) que son posteriormente pulidos (extremos romos) y ligados a adaptadores (A y B). Estos adaptadores proporcionan las secuencias de hibridación necesarias para la posterior amplificación y secuenciación de los fragmentos de la librería. Además el adaptador B está biotinilado en su extremo 5', lo que permite la inmovilización de la librería sobre las esferas recubiertas de estreptavidina.

2- PCR en emulsión

Cada esfera contiene una única molécula de ADN de cadena sencilla de la librería. La esfera unida a la librería se emulsiona con los reactivos de amplificación en una micela de agua y aceite, de tal manera que cada una queda englobada en su propio microreactor, dentro del cual ocurre la amplificación mediante PCR. El resultado es una esfera inmovilizada, que contiene fragmentos de ADN amplificados clonalmente.

3- Secuenciación

Las esferas unidas a los fragmentos de ADN se distribuyen en capas dentro de la placa de secuenciación junto con unas esferas enzimáticas que contienen luciferasa y sulfurilasa. Cada pocillo de la placa contiene una única esfera con miles de copias del mismo fragmento de ADN. Durante el flujo de nucleótidos, cada uno de los cientos de miles de esferas con millones de copias de DNA se secuencia en paralelo. Si un nucleótido es complementario a la cadena molde en algún pocillo, la polimerasa extiende la hebra existente de ADN mediante la adición de nucleótido(s). La adición de uno (o más) nucleótido(s) resulta en una reacción que genera una señal de luz que es recogida por la cámara CCD del equipo. La intensidad de la señal es proporcional al número de nucleótidos incorporados en un solo flujo de nucleótidos. Esto genera una imagen que se analiza e interpreta en forma de secuencias de nucleótidos (Figura 10).

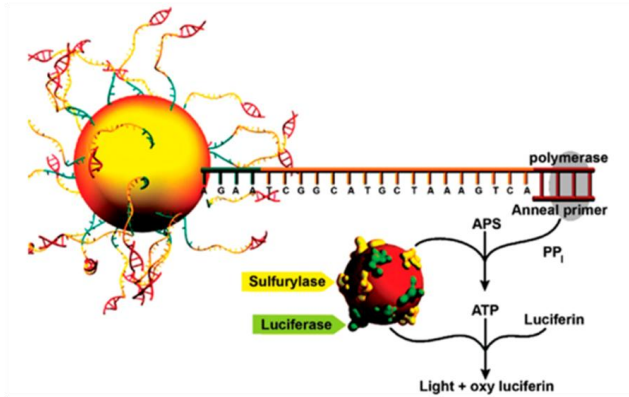


Figura 10. Último paso en la técnica de secuenciación masiva: Pirrosecuenciación¹⁷²

La mayoría de las mutaciones descritas hasta la fecha en los SMD son poco frecuentes y pueden encontrarse también en otras neoplasias mieloides. Existen mutaciones en genes supresores tumorales, oncogenes, genes relacionados con la regulación del ciclo celular, con mecanismos de apoptosis o con “splicing”¹⁷³. Estas mutaciones podrían estar implicadas en el desarrollo de la enfermedad, aunque en ocasiones el papel de las mismas en la patogenia o progresión de los SMD no está muy claro.

La mayoría de las mutaciones conocidas hasta día de hoy en los SMD (*TET2*, *AML1*, *TP53*, *JAK2* o *FLT3* entre otras) fueron detectadas mediante el uso de técnicas de secuenciación convencional como es la secuenciación Sanger. Sin embargo, en los últimos años, las técnicas de secuenciación masiva han sido aplicadas en el estudio de las diferentes hemopatías malignas, incluidos los SMD, y han permitido definir de esta manera la presencia de nuevas mutaciones en genes que podrían estar implicados en estas enfermedades¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Entre los años 2011 y 2012 se han publicado más de diez trabajos diferentes que han supuesto un hito importante en el estudio de los SMD¹⁷⁷⁻¹⁸⁹. En todos ellos, la secuenciación masiva ha permitido analizar decenas de pacientes con SMD y describir la presencia de mutaciones en el gen *SF3B1*, no relacionado hasta

el momento con la enfermedad. *SF3B1* es un componente del “spliceosoma”, cuyas mutaciones están claramente asociadas con la presencia de sideroblastos en anillo, siendo su frecuencia de 65-75% en casos con ARSA (Figura 11). Estas mutaciones parecen estar presentes también en otro tipo de hemopatías, como es la leucemia linfática crónica, aunque en estos casos con una frecuencia mucho menor^{190,191}.

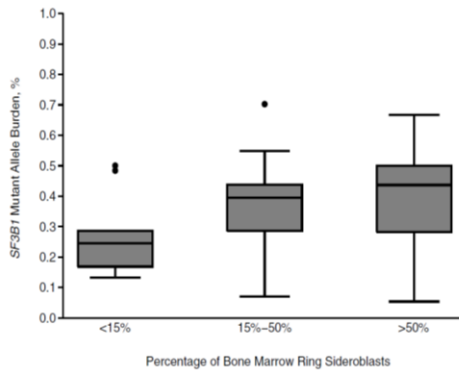


Figura 11. Relación entre la mutación en *SF3B1* y la proporción de sideroblastos en anillo¹⁸²

Es importante destacar también que la existencia de mutaciones en este gen se ha relacionado con menos citopenias, mayor supervivencia y menor probabilidad de evolución a LAM (Figura 12).

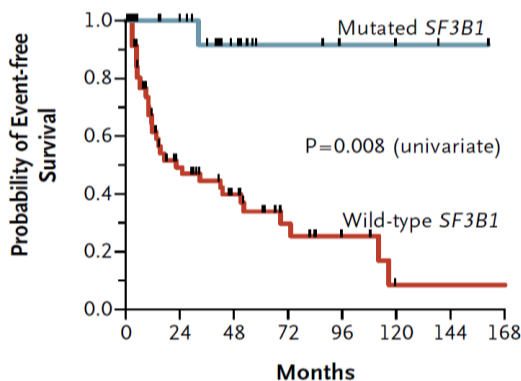


Figura 12. Curvas Kaplan–Meier que representan la probabilidad de supervivencia en un grupo de SMD de acuerdo a la presencia o ausencia de mutaciones en *SF3B1*¹⁸⁵

En conclusión, podemos afirmar que los recientes hallazgos en *SF3B1* mediante la aplicación de la secuenciación masiva son un claro ejemplo de cómo esta metodología puede ayudar en el estudio y la comprensión de la patología de los SMD.

Hipótesis

Los SMD de bajo riesgo constituyen una enfermedad heterogénea y diversa debido a su compleja fisiopatología. Estas enfermedades son, en ocasiones, entidades difíciles de separar de la normalidad y por tanto presentan dificultades en su diagnóstico además de una gran variabilidad en su comportamiento clínico, como corresponde a un grupo heterogéneo de enfermedades. Por todo ello, este trabajo de tesis doctoral plantea como hipótesis la posibilidad de diferenciar este grupo de enfermos mediante el estudio en profundidad del transcriptoma, metiloma y genoma, más allá de la diferenciación morfológica y citogenética que se utiliza para su diagnóstico. Para ello, la aplicación de las nuevas técnicas de análisis genético y epigenético global podrían constituir una herramienta de gran utilidad.

En la última década la introducción de la tecnología de los microarrays ha permitido diferenciar los SMD de las LAM, de otras hemopatías malignas e incluso de aquellos enfermos con SMD en transformación. Sin embargo, ha sido más difícil distinguirlas de las MO normales. Nuestro grupo, como parte del proyecto MILE (“Microarray Innovations in LEukemia”), ha realizado estudios en los que los SMD fueron diferenciados de otras quince hemopatías malignas a través de su perfil de expresión génica. Sin embargo, los SMD de bajo riesgo han sido menos analizados por lo que el estudio de las características que permiten distinguir este grupo de pacientes de la normalidad es de gran interés. Además nuestro grupo se planteó que las posibles diferencias encontradas a nivel transcripcional podrían deberse a cambios en su perfil de metilación. La posibilidad de realizar un estudio combinado, epigenético y transcripcional, en el mismo grupo de pacientes, puede revelar hasta qué punto la expresión diferencial está influida por una metilación aberrante, algo que hasta el momento no ha sido investigado en los SMD de bajo riesgo.

Una de las funciones celulares que suele afectarse en los SMD es la alteración en el proceso de angiogénesis. Sin embargo, todavía existen algunas contradicciones sobre los mecanismos y los procesos involucrados en la angiogénesis anómala que tienen

estos pacientes. Nuestro grupo se planteó que la realización de estudios funcionales en los que estuviera implicado el microambiente medular, la búsqueda de diferencias en la angiogénesis entre las distintas entidades de SMD y el análisis en profundidad del papel que puede desempeñar ENG en este proceso podría ayudar a conocer mejor la biología del proceso en estos enfermos.

La tecnología de secuenciación masiva ha permitido recientemente la identificación de mutaciones en el gen *SF3B1*, que han sido relacionadas con la presencia de sideroblastos en anillo en los SMD. Sin embargo, hasta el momento sólo existen dos trabajos que relacionen la alteración funcional de este gen con la aparición de los sideroblastos en anillo. Además, la presencia (en menor medida) de mutaciones en *SF3B1* en otras hemopatías sin sideroblastos en anillo no ha podido ser justificada. Por ello, nos propusimos analizar la presencia de mutaciones en nuevos genes relacionados con el metabolismo del hierro y mitocondrial que podrían estar implicados en la fisiopatología de los SMD con sideroblastos en anillo.

Todos estos interrogantes han sido los que nos han inducido a realizar el presente trabajo, cuyos objetivos se exponen a continuación.

Objetivos

Objetivo global

Profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de los SMD de bajo riesgo mediante un análisis combinado del transcriptoma, del metiloma y del genoma en la médula ósea de estos enfermos.

Objetivos específicos

- 1.** Analizar las diferencias que existen a nivel de expresión génica entre los SMD de bajo riesgo y los enfermos sin hemopatías malignas.
- 2.** Identificar las funciones y vías de señalización principalmente desreguladas en los SMD de bajo riesgo.
- 3.** Definir el patrón de metilación de los SMD de bajo riesgo.
- 4.** Determinar qué genes pueden tener afectada su expresión génica debido a una metilación aberrante mediante el estudio combinado del perfil de expresión y de la metilación en el mismo grupo de pacientes con SMD de bajo riesgo.
- 5.** Profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la angiogénesis en los SMD de bajo riesgo y realizar estudios funcionales que permitan definir las diferencias entre los distintos tipos de SMD.
- 6.** Analizar el papel de la endogлина, recientemente descrita como un importante marcador angiogénico, en los SMD de bajo riesgo.

- 7.** Caracterizar el subgrupo de SMD con sideroblastos en anillo mediante estudios de expresión génica y de secuenciación masiva.

- 8.** Determinar la presencia de mutaciones en genes implicados en el metabolismo del hierro y mitocondrial en los SMD con sideroblastos en anillo.

Resultados

Genome-Wide Profiling of Methylation Identifies Novel Targets with Aberrant Hyper-methylation and Reduced Expression in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes

Leukemia. 2012 Aug 31. doi: 10.1038/leu.2012.253

Mónica del Rey, MS^{1,2}; Kathleen O'Hagan, PhD³; Margaret Dellett, PhD³; Sara Aibar, MS^{1,2}; Hilary Ann Alexandra Colyer, PhD³; María Eugenia Alonso, PhD^{2,4}; María Díez-Campelo, MD, PhD^{2,4}; Richard N. Armstrong, PhD³; Daniel J. Sharpe, PhD³; Norma Carmen Gutiérrez, MD, PhD^{2,4}; Juan Luis García, PhD^{2,5}; Javier De Las Rivas, PhD^{1,2}; Ken I. Mills, PhD^{3*}; Jesús María Hernández-Rivas, MD, PhD^{1,2,4*}

¹IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Spain; ²IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Spain ³Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast, UK ⁴Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Spain ⁵Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL)-HUSAL, Castilla y León, Spain

*These authors contributed equally to the paper

1

Alteration in Endoglin-Related Angiogenesis in Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia

PLoS One. 2013;8(1):e53624

Mónica del Rey^{1,2}; Miguel Pericacho^{2,3}; Soraya Velasco³; Eva Lumbreras^{1,2};
José Miguel L. Novoa^{2,3}; Jesús María Hernández-Rivas^{1,2,4} and Alicia
Rodríguez-Barbero^{2,3}

¹BMCC, Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Universidad de Salamanca-CSIC, Spain; ²IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Spain; ³Departamento de Fisiología & Farmacología, Universidad de Salamanca, Spain; ⁴Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Spain

JMHR and ARB contributed equally to this study

2

Abstract

The functional mechanisms involved in angiogenesis and the potential role of endoglin (ENG), recently described as a new marker for this process, have not been explored in Myelodysplastic Syndromes (MDS). In order to gain insight in MDS angiogenesis a combined analysis in bone marrow (BM) of gene expression levels, angiogenesis-related soluble factors and functional angiogenesis-related studies was carried out. Ninety-seven MDS patients and forty-two normal BM samples were studied. The morphology of the capillary-like structures originated by two endothelial cells lines in the BM environment of patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) was different from those of the remaining MDS. In addition, the BM mononuclear cells from RCMD patients displayed over-expression of *VEGF*, *HIF* and *FN1* while they showed reduced expression of *ENG* in contrast to the normal *ENG* expression of the remaining low-risk MDS and the high expression of *ENG* in high-risk MDS subtype. Moreover, higher soluble ENG and soluble FLT-1 levels in BM microenvironment were observed in RCMD cases, which distinguished them from other individuals. Therefore, the present study suggests that the patterns of angiogenesis are different between the MDS subtypes. The differences in angiogenesis observed in RCMD patients could be related to ENG abnormalities.

Introduction

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a heterogeneous group of hematopoietic malignancies, characterized by ineffective haematopoiesis, hypercellular bone marrow (BM), dysplasia of at least one lineage and cytopenias in the peripheral blood [1]. These disorders are classified according to WHO criteria, which take into account types and number of cell dysplasias, percentage of blasts and cytogenetic abnormalities [2,3]. Moreover, based on these parameters, MDS can be divided into four prognostic categories: low, intermediate-1, intermediate-2 and high risk [4]. MDS are stem cell disorders, however, some studies have recently stressed the possibility that the BM microenvironment may play a relevant role in the pathogenesis of these diseases [5]. In addition, abnormalities in signal transduction, transcription activity, cell-cycle control, epigenetic, mitochondrial DNA and angiogenesis have been related to MDS [6].

Angiogenesis is the process by which new blood vessels are formed from pre-existing vessels and it has been associated with growth, dissemination and metastasis of solid tumours [7]. In hematological malignancies, angiogenesis develops in different way than in solid tumours [8,9]. There are conflicting evidences regarding angiogenesis in MDS; some studies have proposed that BM microvascular density (MVD) increases with MDS progression [10], whereas others suggest an increased vascularity in the early but not the latter stages of MDS [11]. Differences between MDS subtypes could explain these conflicting results and hence the importance of the discrimination between the different entities of MDS.

Endoglin (ENG) is an integral membrane glycoprotein whose properties have made it a reliable marker of tumour angiogenesis and a prime target for anti-angiogenic therapy [12]. ENG serves as co-receptor for members of the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily of proteins [13] and a major evidence for the pivotal role of ENG in angiogenesis is that mice lacking *Eng* (*Eng*^{-/-}) die from cardiovascular defects at mid gestation with major defects in yolk sac vasculature [13,14]. *ENG* is mainly expressed in

proliferating vascular endothelium and its expression increases during tumour angiogenesis and inflammation [12,13]. Elevated expression of *ENG* correlates with the proliferation of tumour endothelial cells [15] and also in hematopoietic tumours such as multiple myeloma [16] and in hairy cell leukemia [17]. The mechanism involved in the *ENG* over-expression is probably multifactorial, being hypoxia one of the most suitable candidates. In fact, many of the pathophysiological settings where *ENG* is upregulated involve hypoxic microenvironments, as is the case of tumour angiogenesis [18]. Although *ENG* is a membrane protein, low levels of soluble protein (s*ENG*) can be found in extracellular medium. The appearance of this soluble protein form is probably due to proteolytic cleavage of isoform membrane as occurs with betaglycan, which can be shed by metalloproteinase 1 [19]. s*ENG* interferes with TFG- β signalling causing endothelial dysfunction [20]. It has been demonstrated that s*ENG* inhibits the capillar tube formation “in vitro” and increases vascular permeability [21].

Most of the studies of angiogenesis in MDS have been focused on malignant haematopoietic cells but there is growing evidence that BM-derived endothelial cells may contribute to tumour angiogenesis [22,23]. In addition, clonal cells may have interactions with these BM endothelial cells and the contact between endothelial cells and normal or malignant haematopoietic cells is mediated by soluble angiogenic factors of the BM microenvironment [24,25]. Therefore the role of endothelial cells in the BM malignant microenvironment and their possible relationship with the malignant clone remains to be clarified by functional studies and not only assessed by immunohistochemistry that so far has been the most used method of analyzing angiogenic activity in MDS [26].

In order to gain insight in the mechanisms involved in angiogenesis in MDS a study of the cellular expression and the BM microenvironment levels of s*ENG* and other angiogenic factors was carried out. The results showed marked differences in the

angiogenesis in the MDS subtypes, and could open new approaches in the treatment in MDS patients.

Design and Methods

1. Patients samples

A total of 97 MDS patients and 42 age-matched controls were included in the study. Classification of MDS was performed according to the World Health Organization (WHO) criteria [3]. Twenty-nine patients were diagnosed as refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) and forty-six had other low-risk MDS excluding RCMD: nineteen of them had a refractory anemia (RA), twenty-two had a refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) and five patients had a 5q- syndrome. The remaining twenty-two patients had a refractory anemia with excess of blasts (RAEB: high-risk MDS) (Supplementary Table 1). The study was approved by the local ethical committees “Comité Ético de Investigación Clínica, Hospital Universitario de Salamanca”. Written informed consent was obtained from each patient before they entered the study.

Mononuclear cells as well as the supernatant fluid were isolated from BM of MDS patients and controls by density gradient (Ficoll). Total RNA from cells was extracted by homogenization in TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the protocol supplied by manufactures, and treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, USA) to eliminate genomic DNA contamination, and finally purified with RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA quantity and quality was determined by Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, CA, USA). The BM supernatant fluid was collected by centrifugation. The liquid was withdrawn carefully to avoid disturbing the cells and collected in a separate container at -80°C.

2. BMEC-1 cell culture

The immortalised cell line, BMEC-1 (Bone marrow endothelial cells), kindly donated by Dr. F.J. Candal (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia) was used in our studies [27]. This cell line was generated by transfecting an early passage of primary BMEC with a vector (pSVT) encoding the large T antigen of SV40. BMEC-1

express vWF/Factor VIII and maintain a phenotype similar to that of primary cells, even at high passage number.

Cells were maintained in culture at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ in Medium MCDB 131 (Invitrogen) supplemented with 15% foetal calf serum (FCS), 10ng/ml endothelial grow factor (EGF) and 1µg/ml hydrocortisone.

3. HMVEC-L cell culture

Lung-derived normal human microvascular endothelial cells (HMVEC-L) were purchased from Clonetics (Lonza Walkersville, MD, USA) and maintained exactly as recommended by the manufacturer. Cells were cultured with the EGM-2MV bullet kit containing endothelial cell basal medium-2 (EBM-2) and the following growth supplements: hEGF, hydrocortisone, GA-1000, FBS, VEGF, hFGF-B, R³-IGI-1 and ascorbic acid. The experiments described in this study were performed on cells between three and four passages.

4. Cell proliferation assay

Subconfluent BMEC-1 were plated in 96-well plates to a density of 5,000 cells per well. Twelve hours after plating, cells were serum starved (5% FCS) and the BM supernatant fluid from MDS patients or controls was added (1:10 dilution). After incubation during 24 h, 48 h or 72 h, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, Sigma, Illinois, USA) was added to each well and incubated for 4 h. The formazan crystals formed from MTT by the living cells were dissolved in the lysis buffer (10% sodium dodecyl sulfate (SDS); 5% isopropanol; 0.1M HCl) for 12 h, and the formazan purple solution was detected using a Sunrise plate reader (Bio-Tek, Instruments, Winooski, USA) at 595 nm. All experiments were performed in quadruplicate.

5. Endothelial cell tube formation assay

Endothelial cell tube formation was assessed as previously described Jerkic et al[28]. In brief a total of 8,000 BMEC-1 per well were plated on Matrigel® precoated plates (BD

Biosciences, New Jersey, USA) and cultured in medium MCDB 131 with 15% FCS. Half an hour later, the BM supernatant fluid from MDS patients or controls was added in the wells (1:10 diluted). After seeding on Matrigel[®], cells spread and aligned with each other to develop hollow, tube-like structures. Endothelial tube formations were observed each hour during seven hours of incubation and the morphological changes were photographed at 5h using a phase contrast inverted Zeiss Microscope (Carl-Zeiss, Jena, Germany). Each experiment was performed in duplicate. As a control in one of each 5 wells just culture medium was added. The experiment was performed in the same way with HMVEC-L. Likewise, a total of 8,000 HMVEC-L per well were plated on Matrigel[®] precoated plates. However, in this case, it was used its appropriate culture medium as above described.

6. Real-Time PCR

The expression levels of endoglin (*ENG*), vascular endothelial grow factor (*VEGF*), hypoxia-inducible factor 1-alpha (*HIF1*) and fibronectin (*FN1*) genes were analyzed by Real-Time PCR. First-strand cDNA was generated from 1 µg of total RNA using poly-dT as primers with the M-MLV reverse transcriptase (Promega). Real-time PCR was performed in triplicate. Each 20 µl reaction contained 300ng of cDNA, 400 nM of each primer, and 1x iQ SybrGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Standard curves were run for each transcript to ensure exponential amplification and to rule out non-specific amplification. The expression level of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene was used to normalize differences in input cDNA. The reactions were run on an iQ5 Real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The primers were designed for specific sequences and checked by BLAST algorithm [29]. Primer sequences were as follows:

GAPDH- forward: 5'-CAG GGC TGC TTT TAA CTC TGG TAA-3'

GAPDH- reverse: 5'-GGG TGG AAT CAT ATT GGA ACA TGT A-3'

ENG- forward: 5'-AGG TGC TTC TGG TCC TCA GT-3'

ENG- reverse: 5'-CCA CTC AAG GAT CTG GGT CT-3'

VEGF- forward: 5'-CGA AGT GGT GAA GTT CAT GG-3'

VEGF- reverse: 5'-CAC AGG ATG GCT TGA AGA TG-3'

HIF1- forward: 5'-GTC ACT TTG CCA GCT CAA AA-3'

HIF1- reverse: 5'-ACC AAC AGG GTA GGC AGA AC-3'

FN1- forward: 5'-TCA CAG CTT CTC CAA GCA TC-3'

FN1- reverse: 5'-TGG CTG CAT ATG CTT TCC TA-3'

7. Enzyme-linked immunosorbent assay

In order to assess the concentration of proangiogenic soluble factors, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out in the BM supernatant fluid from patients and controls. The levels of sENG, soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFLT-1) and VEGF were assessed by using commercially available kits from R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, USA). The whole protocol was performed following the instructions given by the manufacturer.

8. Statistical analysis

The relationship between clinical or biological data and genomic characteristics was analyzed using an independent sample ANOVA test or Mann-Whitney test. All P-values reported were two-sided and statistical significance was defined as P-value < 0.05. Statistical evaluation was carried out using the SPSS 15.0 statistical software. The graphics of the study show the mean \pm standard error of the mean or the median of each group that was used for the comparisons in each experiment between the different entities of MDS and the range in each case.

Results

- **BM microenvironment from MDS patients induces endothelial proliferation**

Endothelial proliferation is crucial in the process of angiogenesis. First, we studied the effect of BM supernatant fluid from MDS patients and controls on BMEC-1 proliferation, during eight days. Endothelial cells reached the peak of maximum proliferation at the sixth day (Figure 1A) and the values at this day were chosen for comparison between different subgroups.

At the sixth day, MDS BM supernatant fluid induced a significantly higher proliferation rate in BMEC-1 than the control BM supernatant fluid ($p < 0.005$). Specifically, the proliferation was 2.4 times higher in MDS than controls (Figure 1A) and this significant difference ($p < 0.05$) was detected in all three MDS subgroups analyzed (low-risk excluding RCMD, RCMD, high-risk) while no statistical differences in the endothelial proliferation were observed between the three groups of MDS themselves (Figure 1B).

- **BM microenvironment from MDS patients induces abnormal tube formation**

Tube formation indicates the extent of angiogenesis and is considered to be an important prognostic factor in this process. To investigate the BM supernatant fluid effects on BMEC-1 (Figure 2A) and HMVEC-L (Figure 2B) tube generation, we used a common method for gauging in vitro angiogenesis, the capillary-like tube formation assay on Matrigel®. As a control, the endothelial tube formation by BMEC-1 and HMVEC-L was maintained in culture medium (Figure 2Ai and 2Bi, respectively). The tubes seem to be completely formed after five hours of incubation, and this time was used to compare the effect of different MDS BM supernatant fluid.

When the endothelial cells lines were cultured with BM supernatant fluid from the control, there was a well organized tube formation. The endothelial tube appearance in cells treated with BM supernatant from controls and cell maintained in culture medium

was similar (Figure 2A and B i-ii). By contrast, the tube morphology was strikingly influenced by BM supernatant fluid from MDS patients. Therefore, BM supernatant fluid from MDS patients induces morphogenetic changes in the endothelial tube formation (Figure 2A and B iii-viii). MDS-treated BMEC-1 and HMVEC-L tended to assemble and form aggregates along the tube-like structures, which was not observed in control cells (Arrows in Figure 2). Incubation with different BM supernatant fluid from MDS stimulated the capillary network aggregation of endothelial cells, including increasing areas covered by the cells and lengths of network compared to controls (Figure 2A and B iii-viii). It should be noted that the tubes originated after the incubation of BMEC-1 and HMVEC-L with the BM supernatant fluid from RCMD patients almost completely disrupted the capillary networks (Figure 2 A and B vii-viii).

- **Endoglin and other angiogenic factors expression differences in RCMD patients with respect to other MDS patients**

Clonal-derived hematopoietic myeloid progenitor cells may facilitate the angiogenesis without directly participating in this process by promoting the activation of normal BMEC. To better understand the role of ENG in the angiogenesis of MDS patients, a gene expression study was performed. RNA obtained from BM mononuclear cells from MDS was used to analyze four angiogenic factors: *ENG*, *VEGF*, *HIF1* and *FN1*. Regarding *ENG* expression, no differences were observed between all MDS patients as a single group and the control group (Supplementary Figure 1A). However, marked differences in the *ENG* levels were observed in the separate analysis of MDS groups. Thus a down-regulation of *ENG* expression was patent in RCMD patients ($p < 0.05$). By contrast, *ENG* expression in high-risk MDS cases was higher than in controls ($p < 0.05$). No differences were found between the *ENG* levels of low-risk MDS (excluding RCMD) and healthy controls (Figure 3A).

Overall the expression levels of *VEGF*, *HIF1* and *FN1* in MDS were significantly higher ($p < 0.05$) than in controls (Supplementary Figure 1B-D). Thus, the low-risk MDS groups (including RCMD) showed over-expression of *VEGF* (Figure 3B), *HIF* and *FN1*

(Supplementary Figure 2) with respect to the control group ($p < 0.05$). Moreover, patients with RCMD showed the highest values in the expression of these three genes with respect to the other low-risk MDS (Figure 3B and Supplementary Figure 2). By contrast, no differences in high-risk MDS patients regarding *VEGF*, *HIF1* and *FN1* expression with respect to the control group were observed (Figure 3B and Supplementary Figure 2).

- **Patients with RCMD display high concentrations of anti-angiogenic soluble factors in the BM microenvironment**

To assess the levels of angiogenic and anti-angiogenic factors present in the BM supernatant fluid in different MDS groups, ELISA assays were carried out in the BM supernatant fluid from MDS patients and controls. Therefore, circulating levels of sENG and sFLT-1 as well as VEGF were analyzed.

The Figure 4 summarizes the results: RCMD displayed higher levels of sENG with respect to the controls ($p < 0.005$), the remaining low-risk MDS ($p < 0.05$) and the high-risk MDS patients ($p = 0.05$). Moreover, sFLT-1 concentrations in BM supernatants were higher in RCMD with respect to the healthy cases ($p = 0.001$), the remaining low-risk MDS and high-risk patients ($p < 0.005$) (Figure 4B). By contrast, the study lacked in detect differences in the concentration of VEGF in the three MDS groups analyzed (Figure 4C).

Discussion

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal stem cell diseases in which altered angiogenic mechanisms have been described. In the present study, a combined analysis of gene expression, angiogenesis-related soluble factors and functional angiogenesis-related studies were carried out in bone marrow (BM) of patients with MDS. The results demonstrated marked differences in angiogenesis in the subtypes of MDS. Thus, the patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) showed an abnormal angiogenesis characterised by an increased level of soluble endoglin (sENG).

The involvement of the microenvironment in MDS disorders has been stressed. However, most of angiogenesis studies in MDS have been focused in plasma from peripheral blood, while results regarding the BM microenvironment analysis are scarce [8,30,31]. In the present report functional studies in the non-cellular portion of BM were performed. A proliferation assay showed that MDS BM supernatant fluid stimulated bone marrow endothelial cells (BMEC-1) proliferation more than supernatant fluid from controls. Our results support the aberrant angiogenesis in MDS previously analyzed by other techniques [26,32,33]. In addition, the generation of new vessels in MDS is critical in the multistep process of conversion from normal to dysplastic BM [5,33]. The endothelial tube formation by BMEC-1 and HMVEC-L in Matrigel® was performed in the presence of BM supernatant fluid from MDS patients and differences in thickness, structure and density of the formed tubes were observed. In addition, the differences between the capillary-like structures originated by BMEC-1 in RCMD and the remaining patient groups were evident. RCMD cases showed less extensive capillary network and reduced vessel formation (Figure 2vii-viii). BM angiogenesis in MDS has been usually studied by measuring the microvascular density by immunohistochemistry [8,26,31,34]. However, this is the first time, to our knowledge, that the formation of pseudocapillaries in MDS BM supernatant fluid by means of functional techniques has been carried out. Thus, the present studies demonstrated that MDS patients displayed an abnormal angiogenesis characterized by

a high endothelial proliferation and aberrant pseudocapillary formation. Therefore the BM microenvironment plays an important role in this aberrant angiogenesis.

It has been demonstrated that leukemic cells may have intimate interactions with bone marrow endothelial cells (BMEC) and can elicit the sprouting of new blood vessels from pre-existing capillaries by the active release of angiogenic factors [32,33,35]. Based on this consideration, we focused our attention on the analysis of several molecules in BM mononuclear cells from MDS that have been reported to be involved in the angiogenesis processes and could be influencing on BMEC behavior. Thereby, we demonstrated that vascular endothelial growth factor (*VEGF*), hypoxia-inducible factor 1-alpha (*HIF*), and fibronectin (*FN1*) expression were differentially over-expressed in low-risk MDS patients, including RCMD cases. These findings are supported by some studies where *VEGF* and other angiogenic factors were significantly increased in the overall MDS group [34]. In addition, the over-expression of these molecules could explain the abnormal proliferation and tube formation by endothelial cell lines in low-risk MDS.

However, angiogenesis involves two stages of vascular development: the differential growth and sprouting of endothelial tubes and the remodeling of the primary endothelial network into a mature circulatory system. Endoglin gene (*ENG*) encodes an endothelial transmembrane protein that is required for both processes [14,21]. As *ENG* staining represents a powerful marker to quantify tumor angiogenesis [13] we have evaluated the expression of *ENG* in MDS cells and we have demonstrated an over-expression in the high-risk cases. *ENG* expression is elevated during alterations in vascular structure and has been associated to many cancers, including breast, ovary, prostate and cervical cancer [20]. As cellular *ENG* levels regulate the formation of new blood vessels [14], *ENG* antibodies have been successfully used to elicit anti-angiogenic effects in tumor-associated endothelium mouse models where *ENG* was highly expressed [36]. These advances will provide new approaches for the development of new therapies for high-risk MDS patients.

Interestingly, *ENG* expression was significantly lower in RCMD patients than in cell from healthy controls. This event may resemble other vascular diseases, such as the hereditary hemorrhagic telangiectasia type I (HHT). HHT patients have significantly lower *ENG* levels and are characterized by arteriovenous malformations and focal loss of capillaries [37]. In addition, it has been reported that isolated murine *Eng*^{+/-} cells display impaired capillary tube formation and significantly less vascular structures compared to wild type mice [28]. Based on these findings, we suggest that the under-expression of *ENG* in RCMD patients could be associated with the decreased blood vessel formation *in vitro* models of angiogenesis observed in the same group of patients. Furthermore, the expression variations in the diverse angiogenic factors could play different roles in the MDS subtypes suggesting different mechanisms involved in the pathogenesis of these diseases leading to a different angiogenesis in patients with RCMD with respect to the other MDS patients.

The results of *ENG* gene expression led us to investigate their presence in the extracellular medium as well as the levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFLT-1) (anti-angiogenic factor) and VEGF (angiogenic factor). RCMD patients showed the highest levels of s*ENG* and sFLT-1 in BM supernatant fluid with respect to both the other MDS and the control group (Figure 4). By contrast, the VEGF levels were similar to the controls. A high concentration of s*ENG* has been also described in acute myeloid leukemia and chronic myeloproliferative disorders[38] and in patients with pathologies associated to vascular dysfunction[39]. Elevated circulating concentrations of s*ENG* and sFLT-1 have been showed in the maternal endothelial dysfunction called preeclampsia. In fact, some authors suggest that s*ENG* may act in concert with sFLT-1 to induce severe preeclampsia [21,40]. In addition, some studies have displayed that sFLT-1 binds to and neutralizes the pro-angiogenic actions of VEGF and the contributions of s*ENG* and sFLT-1 to the pathogenesis of maternal preeclampsia are, at least in part, related to their inhibition of TGF β and VEGF, respectively [41]. This finding could explain the mitigated VEGF secretion observed in RCMD patients in relation to the expression gene in the

same group of patients. Based on our results, we suggest that the soluble form of ENG antagonizes the membrane bound form in RCMD patients and therefore potentiates the anti-angiogenic actions of sFLT-1, by disrupting the capacity to form capillary tubes of BMEC-1 and HMVEC-L as we have previously showed in this group of patients.

Angiogenesis is a balanced process between pro and anti-angiogenic factors. In MDS patients, our results suggest the presence of an altered balance that could be involved in RCMD patients. In fact, RCMD patients showed high expression levels of pro-angiogenic factors such as *VEGF*, *HIF*, and *FN1*. In contrast, this group of MDS had low *ENG* expression, high levels of sENG and sFLT-1 in BM microenvironment, a decrease level of VEGF with respect to the expression gene and the reduced vessel formation by endothelial cell lines. Regarding the increased BMEC-1 proliferation observed in RCMD there are conflicting evidences: endothelial cell proliferation is key early event in angiogenesis, but some studies have demonstrated that myeloid malignancies with high levels of sENG are characterized by a high cellular proliferation rate in BMEC and even, in myelopoietic lineage what could explain the high proliferation in an anti-angiogenic environment [28,38]. Therefore we suggest that the RCMD display features that tip the balance of angiogenesis and appear to be impairing this process.

Previous studies have demonstrated an abnormal angiogenesis in MDS. However most of them have analyzed the differences between the low-risk and high-risk patients while the RCDM patients were not included as an independent group [26,34]. The RCMD has been recently proposed by the WHO classification as a specific MDS disorder [2] and the present study showed these patients had a different pattern of angiogenesis. These results provide new insights in the molecular mechanisms of RCMD patients that could be ENG-related. Furthermore, recently, it has been suggested that the inhibition of putative protease involved in sENG shedding may be of therapeutic benefit in the treatment of preeclampsia [20]. These observations could provide new therapeutic approaches for this specific subtype of MDS.

Acknowledgements

The authors would like to thank Irene Rodríguez, Sara González, Teresa Prieto, M^a Ángeles Ramos, Almudena Martín, Ana Díaz, Ana Simón, María del Pozo and Vanesa Gutiérrez of the Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, Spain, for their technical assistance.

Reference List

1. Cazzola M, Malcovati L (2005) Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 352: 536-538.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ et al. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114: 937-951.
3. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292-2302.
4. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P et al. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89: 2079-2088.
5. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM et al. (2009) Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia* 23: 664-672.
6. Nolte F, Hofmann WK (2008) Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol* 87: 777-795.
7. Hillen F, Griffioen AW (2007) Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26: 489-502.
8. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E et al. (2000) Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 96: 2240-2245.
9. Longo V, Vacca A, Ribatti D (2007) Imaging and angiogenesis in hematological malignancies. *Leukemia* 21: 1605
10. Wimazal F, Krauth MT, Vales A, Bohm A, Agis H et al. (2006) Immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes: correlation between VEGF expression and the FAB category. *Leuk Lymphoma* 47: 451-460.

11. Lundberg LG, Hellstrom-Lindberg E, Kanter-Lewensohn L, Lerner R, Palmblad J (2006) Angiogenesis in relation to clinical stage, apoptosis and prognostic score in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 30: 247-253.
12. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M (2009) The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1792: 954-973.
13. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H959-H974.
14. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC et al. (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534-1537.
15. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M et al. (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 81: 568-572.
16. Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, Decarli N, Tresoldi M et al. (2002) Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 118: 817-820.
17. Pruneri G, Bertolini F, Baldini L, Valentini S, Goldaniga M et al. (2003) Angiogenesis occurs in hairy cell leukaemia (HCL) and in NOD/SCID mice transplanted with the HCL line Bonna-12. *Br J Haematol* 120: 695-698.
18. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277: 43799-43808.
19. Velasco-Loyden G, Arribas J, Lopez-Casillas F (2004) The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem* 279: 7721-7733.
20. Ten DP, Goumans MJ, Pardali E (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11: 79-89.
21. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T et al. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12: 642-649.

22. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K et al. (2005) Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 11: 261-262.
23. Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U et al. (2004) Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 351: 250-259.
24. Bellamy WT, Richter L, Sirjani D, Roxas C, Glinsmann-Gibson B et al. (2001) Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood* 97: 1427-1434.
25. Watarai M, Miwa H, Shikami M, Sugamura K, Wakabayashi M et al. (2002) Expression of endothelial cell-associated molecules in AML cells. *Leukemia* 16: 112-119.
26. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A et al. (1999) Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* 81: 1398-1401.
27. Candal FJ, Rafii S, Parker JT, Ades EW, Ferris B et al. (1996) BMEC-1: a human bone marrow microvascular endothelial cell line with primary cell characteristics. *Microvasc Res* 52: 221-234.
28. Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M et al. (2006) Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 69: 845-854.
29. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
30. Aguayo A, Kantarjian HM, Estey EH, Giles FJ, Verstovsek S et al. (2002) Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer* 95: 1923-1930.

31. Alexandrakis MG, Passam FH, Pappa CA, Sfiridaki K, Tsirakis G et al. (2005) Relation between bone marrow angiogenesis and serum levels of angiogenin in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 29: 41-46.
32. Campioni D, Punturieri M, Bardi A, Moretti S, Tammiso E et al. (2004) "In vitro" evaluation of bone marrow angiogenesis in myelodysplastic syndromes: a morphological and functional approach. *Leuk Res* 28: 9-17.
33. la Porta MG, Malcovati L, Rigolin GM, Rosti V, Bonetti E et al. (2008) Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 22: 530-537.
34. Keith T, Araki Y, Ohyagi M, Hasegawa M, Yamamoto K et al. (2007) Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia. *Br J Haematol* 137: 206-215.
35. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.
36. Fonsatti E, Maio M (2004) Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2: 18
37. Abdalla SA, Letarte M (2006) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 43: 97-110.
38. Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F et al. (2003) Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* 194: 171-175.
39. Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Sanchez-Rodriguez A et al. (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8: 86
40. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE et al. (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 355: 992-1005.

41. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P (2008) FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 8: 942-956.

Figures

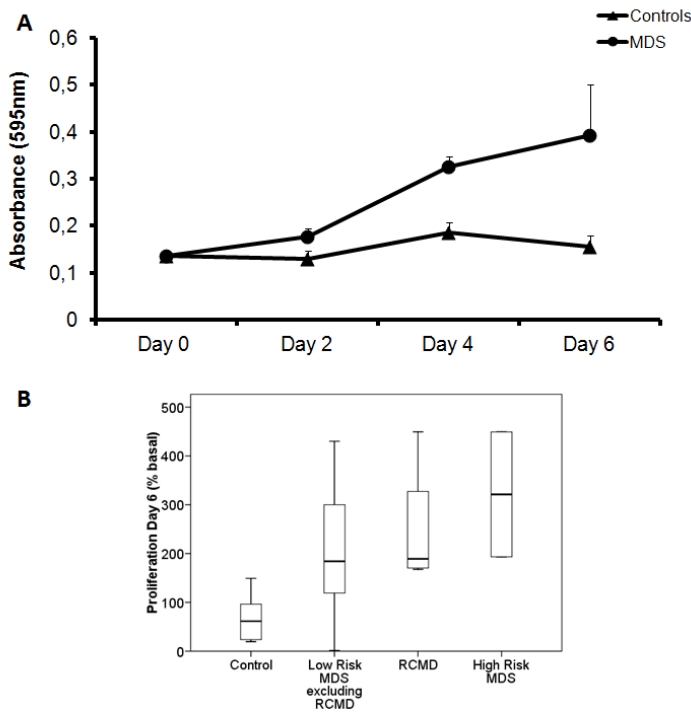


Figure 1. Effect of MDS BM microenvironment on BMEC-1 proliferation. (A) BMEC-1 proliferation curve. To analyze the effect of the BM supernatant fluid from MDS patients and controls on BMEC-1 proliferation, the cell line was incubated with BM supernatant fluid. The cell number was estimated by MTT at two, four or six days. The measurement of absorbance is indicative of the rate of cell proliferation and each value of each patient is the mean of four independent experiments. Each point is the mean of these values \pm SEM. The graphics show the increase of proliferation in MDS patients. ANOVA test was used to analyze the overall MDS results at sixth day. The proliferation was 2.4 times higher in MDS than controls ($p < 0.005$). (B) The box plot compares median levels of BMEC-1 proliferation at sixth day in the different subtypes of MDS. Whiskers represent the range. Significant differences between RCMD and the control group ($p < 0.01$), the other low-risk MDS and the control group ($p < 0.05$) and high-risk MDS patients and the controls ($p < 0.05$) were observed by Mann-Whitney test.

MDS: myelodysplastic syndrome; BM: bone marrow; BMEC-1: bone marrow endothelial cells; MTT: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; SEM: standard error of the mean; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia.

(Controls $n = 8$; MDS $n = 14$; Low-Risk MDS excluding RCMD $n = 6$; RCMD $n = 4$; High-Risk MDS $n = 4$)

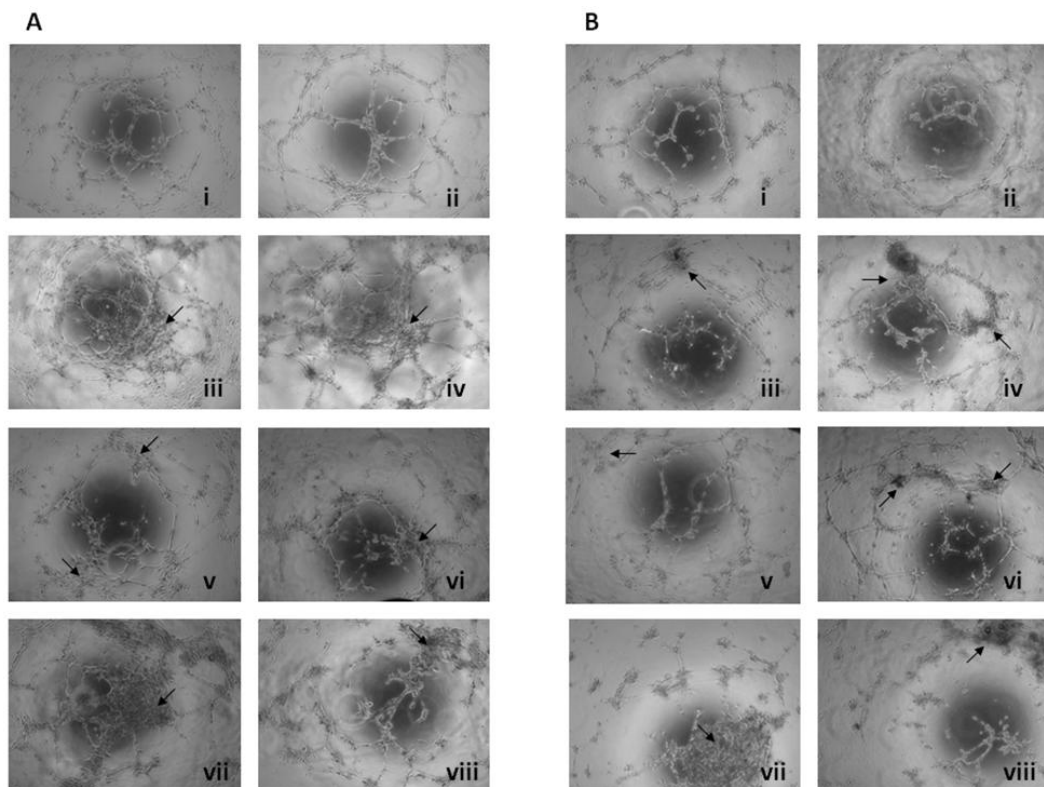


Figure 2. Effect of the MDS BM microenvironment on BMEC-1 and HMVEC-L tube formation. BMEC-1 (A) and HMVEC-L (B) were seeded at a concentration of 8,000 cells per well of 96-well plate and incubated for 7h at 37°C in 5% CO₂. The endothelial tube formation was photographed at 5h using a phase contrast inverted microscope. Each experiment was performed in duplicate. The pictures show the appearance of endothelial cell tubes on Matrigel® precoated plates in culture medium (i) and BM supernatant fluid from healthy control (ii), RA (iii), RARS (iv), 5q syndrome (v), RAEB (high-risk MDS) (vi) and RCMD (vii-viii) patients at 1:10 dilution in culture medium. As the arrows show in the figure, the tube morphology was strikingly influenced by BM supernatant fluid from MDS (iii-viii) with respect to the controls (ii). The tubes originated after the incubation of BMEC-1 or HMVEC-L with the BM supernatant fluid from RCMD patients (vii-viii) were almost completely disrupted and formed closed capillary networks.

MDS: myelodysplastic syndrome; BM: bone marrow; BMEC-1: bone marrow endothelial cells; HMVEC-L: lung-derived normal human microvascular endothelial cells; RA: refractory anemia; RARS: refractory anemia with ring sideroblast; RAEB refractory anemia with excess of blasts; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia.

(Controls n= 13; RA n= 5; RARS n= 6; 5q syndrome n= 2; RAEB n= 4; RCMD n= 7)

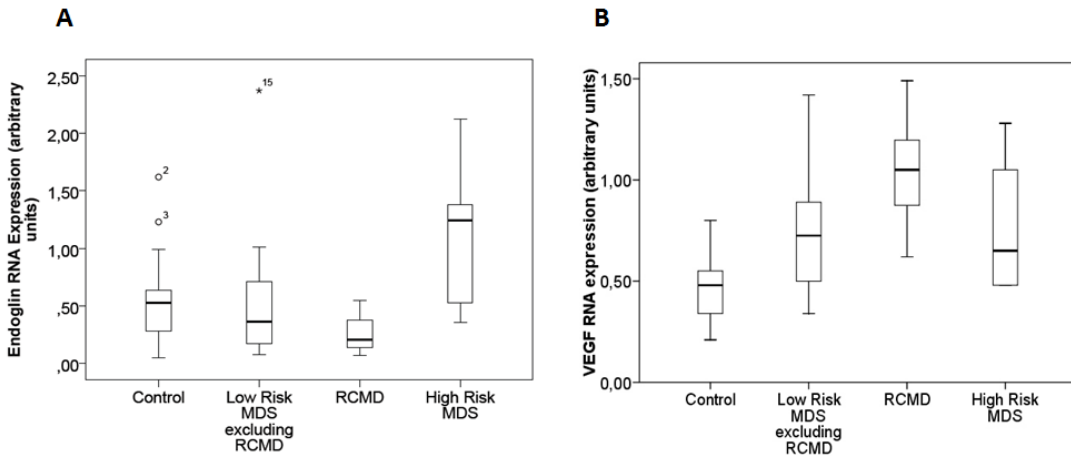


Figure 3. *ENG* and *VEGF* RNA expression in mononuclear BM cells of MDS subtypes. The box plot compares median of *ENG* and *VEGF* expression levels in BM mononuclear cells between the different MDS groups and controls. The gene expression levels were analyzed by RT-PCR. Each sample was performed in triplicate. Value of each patient is the mean of these three experiments. Mann-Whitney test was used to analyze the results. The box plot compares the RNA expression in BM mononuclear cells of subtypes of MDS. Whiskers represent the range. A down-regulation of *ENG* was showed in RCMD cases ($p < 0.05$). By contrast, *ENG* expression in high-risk MDS patients was higher than in controls or in the other MDS ($p < 0.05$). No significant differences in low-risk MDS excluding RCMD patients in *ENG* expression with respect to the healthy controls were found (A). The low-risk MDS groups showed over-expression of *VEGF* with respect to the control group ($p < 0.05$). Moreover, patients with RCMD showed the highest values in the expression of this gene with respect to the other low-risk MDS. No significant differences in high-risk MDS patients in *VEGF* expression with respect to the healthy controls were found (B).

ENG: endoglin; VEGF: vascular endothelial grow factor; BM: bone marrow; MDS: myelodysplastic syndrome; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB: refractory anaemia with excess of blasts.

(Controls n= 13; Low-Risk MDS excluding RCMD n= 22; RCMD n= 12; High-Risk MDS n= 16)

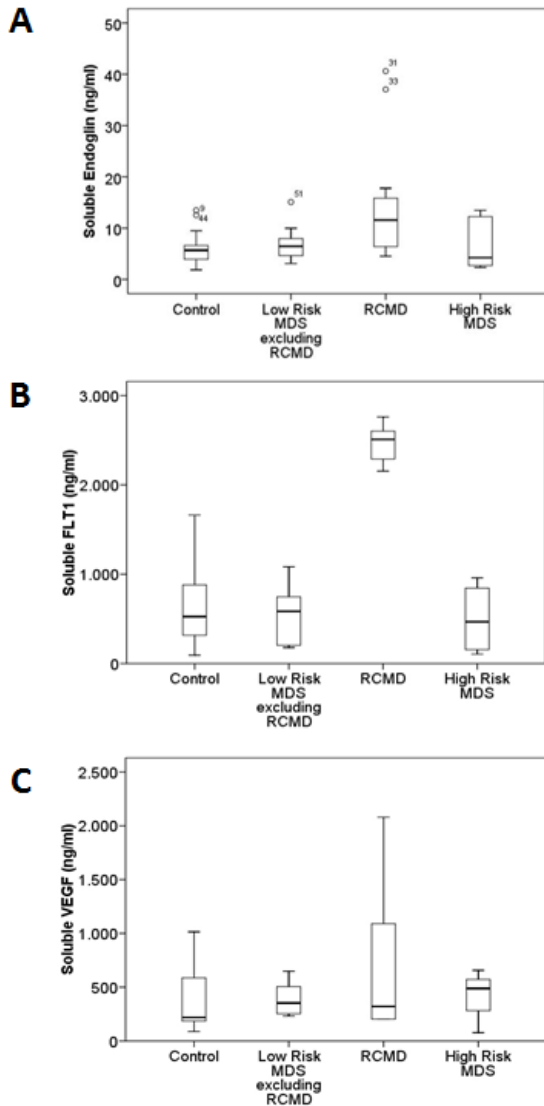
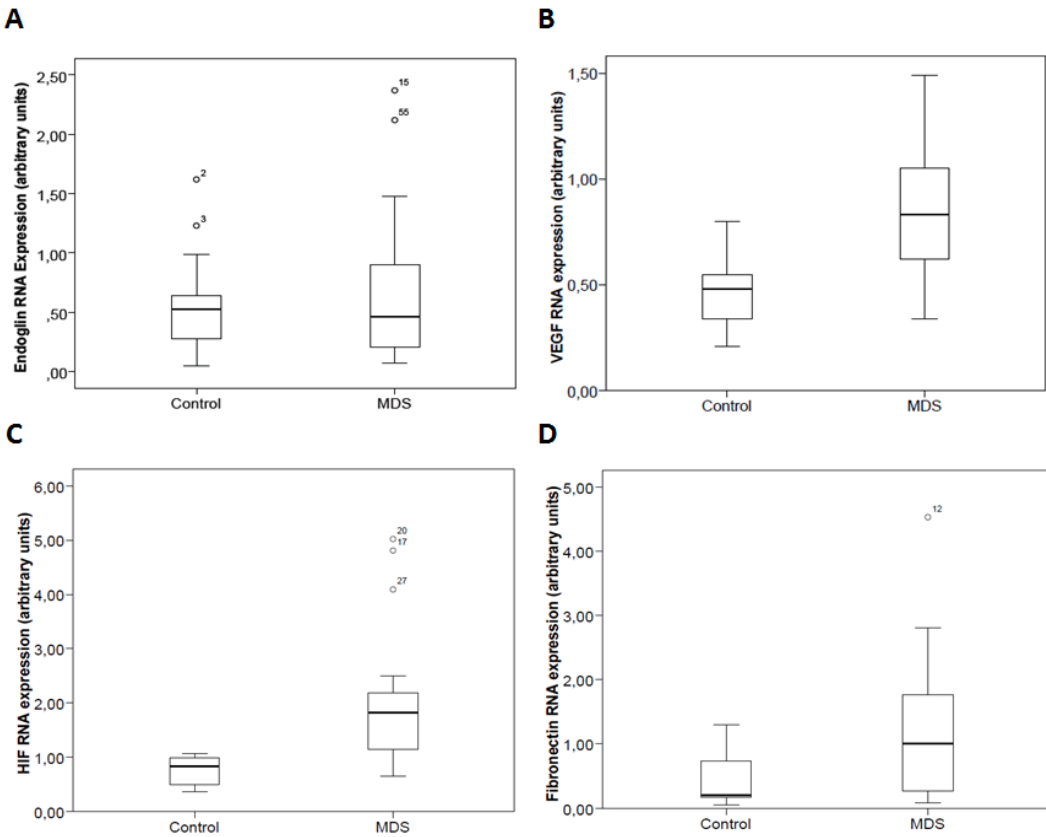


Figure 4. Soluble angiogenic factors in MDS BM microenvironment. The box plot compares median levels of sENG, sFLT-1 and sVEGF in BM supernatant fluid of various types of MDS. To measure the levels of angiogenic factors present in the BM supernatant fluid in the different MDS groups, ELISA assays were carried out in the BM supernatant fluid from MDS patients and controls. Whiskers represent the range. Mann-Whitney test showed that sENG concentrations in BM supernatants was higher in RCMD with respect to the healthy cases ($p < 0.005$), the remaining low-risk MDS ($p < 0.05$) and high-risk patients ($p = 0.05$) (A). RCMD displayed higher levels of sFLT-1 with respect to the controls ($p = 0.001$), the remaining low-risk MDS ($p < 0.005$) and the high-risk MDS patients ($p < 0.005$) (B). No significant differences in sVEGF concentration of MDS groups were found (C).

MDS: myelodysplastic syndrome; BM: bone marrow; ENG: endoglin; sFLT-1: fms-like tyrosine kinase 1; VEGF: vascular endothelial grow factor; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia.

(Controls $n = 24$; Low-Risk MDS excluding RCMD $n = 15$; RCMD $n = 15$; High-Risk MDS $n = 6$)

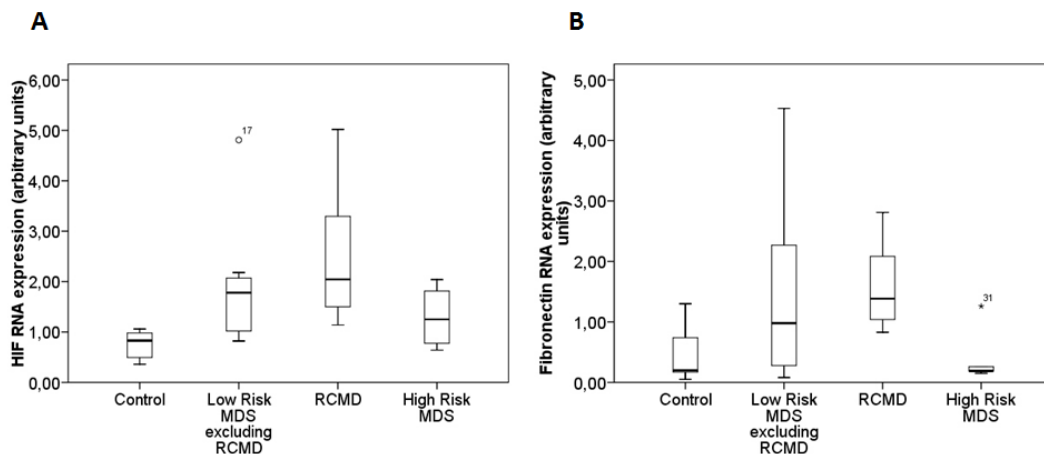
Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. *ENG*, *VEGF*, *HIF1* and *FN1* RNA expression in mononuclear MDS BM cells. The box plot compares median of *ENG*, *VEGF*, *HIF1* and *FN1* expression levels in BM mononuclear cells between MDS and controls. To analyze the gene expression levels of the angiogenic factors we used RT-PCR. Each value of each sample is the mean of three independent experiments. The box plot shows the differences between the samples expression distributions in control and MDS group. Whiskers represent the range. Mann-Whitney test was applied in all cases. No significant differences were found in *ENG* expression between MDS patients and control group (A). Overall the expression levels of *VEGF*, *HIF1* and *FN1* in MDS were significantly higher ($p < 0.05$) than levels of controls (B-D).

ENG: endoglin; *VEGF*: vascular endothelial grow factor; *HIF1*: hypoxia-inducible factor 1-alpha; *FN1*: fibronectin; BM: bone marrow; MDS: myelodysplastic syndrome.

(Controls n= 13; MDS n= 50)



Supplementary Figure 2. *HIF1* and *FN1* RNA expression in mononuclear BM cells of MDS subtypes. The box plot compares median of *HIF1* and *FN1* expression levels in BM mononuclear cells between the different MDS groups and controls. The gene expression levels were analyzed by RT-PCR. Each sample was performed in triplicate. Each value of each patient is the mean of these three experiments. Mann-Whitney test was used to analyze the results. The box plot compares the RNA expression in BM mononuclear cells of subtypes of MDS. Whiskers represent the range. The low-risk MDS groups showed over-expression of *HIF1* and *FN1* respect to the control group ($p < 0.05$). Moreover, patients with RCMD showed the highest values in the expression of these two genes respect to the other low-risk MDS. Overall no significant differences in high-risk MDS patients in *HIF1* and *FN1* expression respect to the healthy controls were found.

HIF1: hypoxia-inducible factor 1-alpha; FN1: fibronectin; BM: bone marrow; MDS: myelodysplastic syndrome; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB: refractory anaemia with excess of blasts.

(Controls n= 13; Low Risk MDS excluding RCMD n= 22; RCMD n= 12; High Risk MDS n= 16)

***Supplementary Tables in CD**

Deregulation of genes related to iron and mitochondrial metabolism in refractory anaemia with ring sideroblasts

Under review in British Journal of Haematology

Mónica del Rey^{1,2}, Rocío Benito^{1,2}, Celia Fontanillo^{1,2}, Talía Velasco-Hernández³, María Hernández^{1,2}, María Abaigar^{1,2}, Rebeca Cuello⁴, Daniel Borrego⁴, Dionisio Martín-Zanca³, Javier De Las Rivas^{1,2}, Ken I. Mills⁵ and Jesús M. Hernández-Rivas^{1,2,6}

¹IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Universidad de Salamanca-CSIC, Spain; ²IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Spain; ³Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca, Spain; ⁴Servicio de Hematología, Hospital Clínico de Valladolid, Spain; ⁵Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast, UK; ⁶Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Spain

3

Discusión general

Los SMD constituyen un grupo de enfermedades clonales caracterizadas por la presencia de displasias morfológicas, hematopoyesis ineficaz y citopenias periféricas, que pueden evolucionar a LAM en el 25% de los casos. Los SMD son además un grupo heterogéneo de enfermedades cuyo diagnóstico está basado en criterios morfológicos y citogenéticos. Es por ello, que los SMD, y en especial aquéllos con una escasa población de blastos, cariotipo normal o pocas alteraciones morfológicas son, en ocasiones, entidades difíciles de separar de la normalidad y, por tanto, presentan dificultades en su diagnóstico. En este trabajo de tesis doctoral se ha querido profundizar en el estudio del transcriptoma, genoma y metiloma en los SMD de bajo riesgo con el fin de conocer si otras características distintas a las morfológicas y citogénéticas podrían permitir su identificación. Para ello, usamos las nuevas metodologías como los microarrays o la secuenciación masiva en el estudio de estas enfermedades.

La posibilidad de analizar, en un solo experimento y de manera simultánea, la transcripción de la casi totalidad de los genes conocidos proporcionó nuevos datos que han permitido profundizar en el conocimiento de la biología de los SMD. Este trabajo preliminar sirvió para delimitar una serie de genes y de funciones celulares que han sido la base del estudio posterior y que se encuentran esquematizados en la figura 13. El análisis del estado de metilación de los SMD y sobre todo, el estudio integrado del transcriptoma y del metiloma identificó genes con la expresión inactivada que participan en la desregulación de rutas implicadas en el desarrollo de los SMD. También mediante los arrays de expresión, fuimos capaces de identificar un conjunto de genes relacionados con la angiogénesis que están diferencialmente expresados en los SMD, lo que nos llevó a un estudio más detallado del proceso. De la misma manera, se observó un perfil de expresión diferencial en el subgrupo de las ARSA que constituyó la base para un análisis mutacional global en el que los genes implicados en el metabolismo del hierro y mitocondrial desempeñan un papel fundamental.

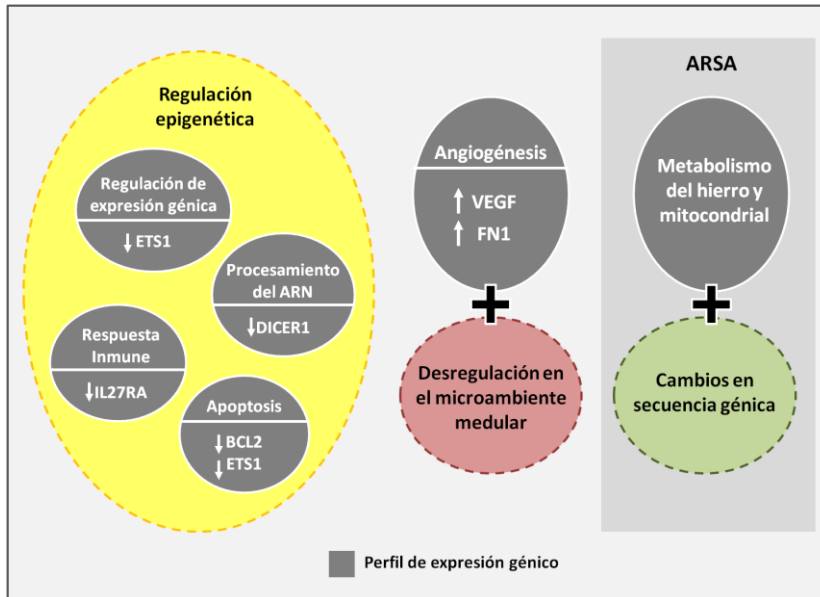


Figura 13. Visión global de los mecanismos de regulación celular en los SMD de bajo riesgo

El estudio del **perfil de expresión génico** en las células mononucleares de MO demostró que *GDF15* es el gen más sobreexpresado en los SMD de bajo riesgo. *GDF15* desempeña un papel fundamental en la regulación de las vías inflamatorias y apoptóticas durante los procesos de enfermedad. Sin embargo, el desarrollo celular y la modificación post-traducciona fueron las funciones moleculares y celulares más frecuentemente desreguladas, mientras que el proceso en el que se afectaban un mayor número de genes fue el crecimiento y proliferación celular. El uso de células no fraccionadas frente a las células separadas (CD34+) ha constituido en los últimos años un tema de debate. En este sentido, nuestro trabajo está avalado por estudios previos, que, han sido capaces de identificar características biológicas y de carácter pronóstico en los SMD y la LAM mediante el estudio del perfil de expresión génico y el uso de células mononucleares^{166,192}. Además, es importante señalar que estos estudios demostraron diferencias entre los distintos grupos en un análisis no supervisado mediante el uso de células mononucleares. Bien es cierto que los defectos hematopoyéticos en los SMD tienen su origen en la célula progenitora por lo que los

estudios en células CD34+ poseen un gran valor científico. Sin embargo, el uso de muestras no fraccionadas permite la identificación de las interacciones entre los distintos tipos celulares, circunstancia que las muestras fraccionadas no permiten. Cabe señalar además que al realizarse estudios comparativos entre los resultados obtenidos con células mononucleadas y los descritos con células CD34+ ¹⁶⁴ se obtuvo un alto nivel de concordancia entre ambos procedimientos. De esta manera, los estudios en células mononucleares estarían añadiendo información adicional y probablemente de carácter muy interesante en la comprensión de la biología de la enfermedad.

La **metilación** aberrante es un mecanismo potencial para la inactivación de genes que ha sido implicado en varias enfermedades hematológicas, incluyendo los SMD ^{193,194}. Sin embargo, la mayoría de los estudios que existen hasta el momento se han centrado en análisis que se restringen a un número limitado de genes, generalmente, supresores tumorales. Además, el perfil de metilación de los SMD de bajo riesgo nunca ha sido bien definido y existen pocos estudios donde se haya demostrado que este grupo de pacientes presenten un perfil de metilación diferencial tal y como sucede con el perfil de expresión ^{141,163}. La primera parte de nuestro estudio demostró por primera vez que los pacientes con SMD de bajo riesgo tenían un perfil de metilación diferente a los individuos sanos, que implicaba la desregulación de 817 genes. Además, se observó que la hipermetilación era un proceso más frecuente que la hipometilación. También en el estudio del metiloma el uso de células fraccionadas es un tema controvertido en la actualidad, aunque un estudio reciente demuestra que los perfiles de metilación del ADN eran muy similares entre la fracción CD34+ y la CD34- ($r > 0,93$), y que la variabilidad observada entre ambas era menor que la variabilidad entre pacientes ($r <= 0,83$) ¹⁷⁰. Todo ello sugiere que los perfiles epigenéticos aberrantes dentro de la médula pueden transmitirse verticalmente a partir de los progenitores hasta la progeñie más diferenciada. Nuestra estrategia de análisis con células no fraccionadas está basada en estos hallazgos.

Con el fin de poder explicar la desregulación en la expresión de ciertos genes previamente identificados en nuestro trabajo, realizamos un análisis combinado del perfil de expresión y de la metilación en los pacientes con SMD de bajo riesgo. Además, en este estudio fueron incluidos exactamente la misma cohorte de pacientes con SMD para analizar ambos perfiles, algo que no se había realizado previamente. En este estudio integrado se identificaron marcadores de metilación del ADN que podrían motivar una infraexpresión de algunos genes implicados en importantes funciones celulares en los SMD de bajo riesgo. Dentro de los genes afectados se encontraban ***DICER1***, ***IL27RA***, ***BCL2*** y ***ETS1***.

Son varios los trabajos que describen una desregulación en el conjunto global de los **miRNAs** en pacientes con SMD⁵⁰⁻⁵³. Nuestros datos corroboraron estos hallazgos ya que demostraron la existencia de una leve infraexpresión de los miRNAs en los SMD de bajo riesgo ($p= 0,039$). Existen estudios que sugieren que hay muchos miRNAs localizados en sitios frágiles del genoma y regiones con alteraciones genéticas. La expresión de un subconjunto de estos miRNAs está significativamente alterada y es probablemente relevante en los SMD⁵⁵. La adquisición de mutaciones somáticas o la presencia de polimorfismos en los miRNAs es otro mecanismo por el cual la expresión de los mismos podría verse modificada y por tanto la función de sus genes diana en los SMD podría alterarse. Sin embargo, Starczynowski et al. no presentan evidencias de mutaciones en los miRNAs en su estudio mediante secuenciación masiva¹⁹⁵. Por último, se podría pensar que la expresión anormal de estos miRNAs en los SMD podría producirse debido a procesos epigenéticos como la metilación. Esta idea es sustentada por un trabajo reciente donde se demuestra cómo la expresión del miR-124 es inversamente proporcional a su grado de metilación⁵⁵. No obstante, la expresión diferencial del conjunto de miRNAs descrita para los SMD no ha podido ser explicada hasta momento.

DICER1 es una endonucleasa RNAsa III esencial para la biogénesis de los miRNAs y el procesamiento del ARN ¹⁹⁶, por lo que se puede esperar que una expresión alterada de dichos miRNAs ocurra como resultado de variaciones en su procesamiento por esta endonucleasa. En el presente estudio, se observó que los niveles de expresión de *DICER1* eran muy inferiores en los pacientes con SMD de bajo riesgo respecto al grupo control. Además, *DICER1* estaba hipermetilado en estos pacientes, lo que podría explicar la infraexpresión de este gen observada en el mismo grupo de pacientes. La reciente publicación de un estudio con ratones knockout para *DICER1* sugiere que la desregulación global de los miRNAs pudiera estar implicada en la patogénesis de los SMD. En este modelo, la supresión específica de *DICER1* en osteoprogenitores produjo un deterioro de la diferenciación osteoblástica y de la integridad de la hematopoyesis así como una inducción de la disfunción de la MO similar a la que ocurre en la mielodisplasia ¹⁹⁶. Además, una expresión alterada de los miRNAs maduros en las células sanguíneas puede contribuir a defectos de la diferenciación, responsables de la neutropenia, la trombocitopenia y/o la anemia ⁵⁵.

La administración de “simuladores” de miRNAs pudiera ser una opción terapéutica en los SMD en un futuro. La administración *in vivo* de miRNAs presenta muchos problemas derivados de su baja estabilidad, degradación rápida e ineficiente liberación en las células “destino” ¹⁹⁷. Por todo ello, la investigación sobre liposomas, transportadores para la liberación de “simuladores” de miRNAs, puede abrir nuevas vías en el tratamiento de los SMD.

IL27RA es un componente heterodimérico del complejo receptor IL27R que está implicado en la **inmunosupresión** mediante la inducción de la transducción de señales en respuesta a IL27 (46). Para esta transducción de señales es necesaria la co-expresión de ambas subunidades del complejo receptor por lo que la pérdida o disminución de función de una de ellas podría llevar a defectos en el sistema inmune del individuo ¹⁹⁸. Nuestros estudios han identificado una marcada diferencia en los niveles de metilación

de *IL27RA* entre los pacientes con SMD de bajo riesgo y los controles sanos, que puede ser la responsable de la escasa expresión del gen presente en estos pacientes. Estos resultados son consistentes con estudios recientes en los que *IL27RA* ha demostrado ser, además, un promotor de la diferenciación de células madre hematopoyéticas, que parece aumentar la mielopoyesis en ratones transgénicos (46). De acuerdo con esto, la infraexpresión de *IL27RA* podría conducir a una diferenciación ineficaz de los progenitores hematopoyéticos, ya descrita en pacientes con SMD por otros autores (33), por lo que un solo componente de un receptor de citoquinas tendría la capacidad de regular vías de señalización en las células hematopoyéticas. A la luz de estos hallazgos, nuestros estudios sugieren que este tipo de receptores pueden desempeñar papeles en la mediación de la respuesta inmune o en la diferenciación celular en algunos trastornos mieloides como los SMD.

Los **factores de transcripción** son proteínas capaces de unirse a las regiones promotoras de algunos genes y así regular la expresión de los mismos. La desregulación de estos genes diana debido a una expresión aberrante del correspondiente FT podría constituir un mecanismo implicado en la patogenia de los SMD. Nuestro análisis integrado propone que la infraexpresión del FT ***ETS1*** se debe a la metilación en su secuencia génica. *ETS1* es una fosfoproteína nuclear que funciona como FT mediante la unión a secuencias de ADN diana que contienen el motivo GGAA/T denominado EBS¹⁹⁹. Hasta la fecha se han definido más de 400 genes diana para *ETS1*, basándose en la presencia del motivo EBS en sus regiones reguladoras²⁰⁰. Del mismo modo que otros estudios en tumores sólidos han demostrado una co-expresión entre *ETS* y sus posibles genes diana²⁰¹⁻²⁰³, nuestro estudio funcional demostró la presencia de 83 genes infraexpresados que presentaban el motivo EBS en sus regiones reguladoras. El estudio sugiere que la metilación del FT *ETS1* provoca su infraexpresión y que ello da lugar, a su vez, a la desregulación transcripcional de 83 genes diana. La proteína *ETS* controla la expresión de genes diana implicados en diversos procesos biológicos como apoptosis, hematopoyesis, proliferación celular y diferenciación²⁰⁰. De todas ellas, la apoptosis

constituyó el proceso celular más afectado en los SMD de bajo riesgo, con la infraexpresión de 9 genes.

Algunos estudios previos han sugerido que el aumento de la **apoptosis** en los precursores mieloides de la MO es un factor importante en la hematopoyesis ineficaz de pacientes con SMD. Además, estos estudios han demostrado que el aumento de la muerte celular programada, probablemente representa un mecanismo fisiopatológico como tal y no un proceso para contrarrestar el aumento en el crecimiento celular^{141,164,167}. Sin embargo, la causa de la apoptosis anormal en los SMD es aún desconocida y la cuestión de si el aumento de la actividad caspasa se debe a la activación de la vía extrínseca o de la ruta apoptótica intrínseca no ha sido todavía resuelta. Nuestro estudio aporta un dato más a esta investigación. Como ya se ha comentado, algunos miembros de la familia de Bcl-2, como el propio gen **BCL2**, son importantes inhibidores de la vía intrínseca de la apoptosis mediante el bloqueo en la liberación de citocromo c. En nuestro trabajo se demuestra que la expresión de **BCL2** es significativamente más débil en los SMD de bajo riesgo que en los individuos normales. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que pusieron de manifiesto una reducción de la expresión de **BCL2** en células CD34+ de los pacientes con SMD en estadios tempranos⁹⁵. Por otra parte, nuestro estudio mostró que **BCL2** presenta niveles significativamente más altos de metilación en los SMD de bajo riesgo que en el grupo control. Es importante destacar que existe una evidencia creciente del papel fundamental del silenciamiento epigenético en las vías de apoptosis en el cáncer²⁰⁴⁻²⁰⁶. Cabría esperar, por tanto, que la hipermetilación de **BCL2** y la correlación inversa con su expresión pudiera ser un mecanismo que promueva la apoptosis en los pacientes con SMD de bajo riesgo. En este trabajo de tesis doctoral se propone una investigación en profundidad de **BCL2** como biomarcador en los SMD de bajo riesgo así como una posible diana terapéutica para estos pacientes en un futuro. Además, el estudio combinado de la desregulación de la vía intrínseca de la apoptosis por **BCL2** junto con la

desregulación de la vía extrínseca, previamente descrita, aportarán nuevos datos para la comprensión de la apoptosis aberrante presente en los SMD.

La hipermetilación del ADN global en pacientes con cáncer puede ser un proceso tan frecuente como la **hipometilación** ²⁰⁷. Aunque no de manera tan clara como los procesos de hipermetilación, la hipometilación génica parece estar jugando también un papel causal en la formación de tumores produciendo la sobreexpresión del propio gen ^{29,31,33,35,36}. Así, nuestro estudio reveló que los genes **UBE2D3** e **ING1** presentan hipometilación y sobreexpresión en pacientes con SMD de bajo riesgo. Cabe destacar que la función de ambos genes está relacionada con P53. Mientras que UBE2D3 parece estar implicado en la ubiquitinación de P53 ²⁰⁸, **ING1** codifica para una proteína que puede inducir apoptosis mediante la estabilización de P53 y bloqueo de su poliubiquitinación ²⁰⁹. De estos resultados se deduce que estos dos genes podrían estar contribuyendo también, aunque no de manera directa, a la desregulación y aumento de la apoptosis en los SMD de bajo riesgo.

Por consiguiente, los hallazgos descritos en esta tesis doctoral podrían explicar la presencia de una mayor apoptosis en los SMD a través de dos vías principales (Figura 14): (1) la metilación y disminución de la expresión del gen **BCL2** y (2) la infraexpresión de los genes diana de ETS1 relacionados con apoptosis a través de su metilación y la disminución en la expresión de este FT. Además, la implicación indirecta de **UBE2D3** e **ING1** podría estar contribuyendo en este proceso. Una comprensión más clara de las alteraciones moleculares que conducen a la desregulación de la muerte celular en los SMD podría permitir, en un futuro, la identificación de nuevas dianas terapéuticas y marcadores diagnósticos para los enfermos con SMD.

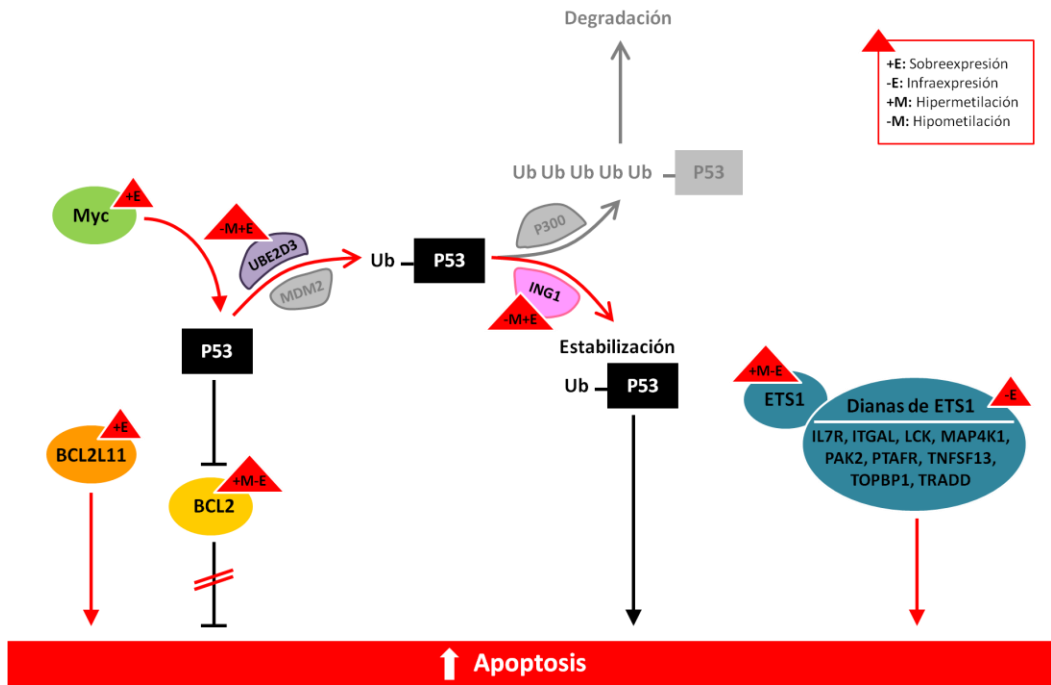


Figura 14. Modelo que incluye los distintos mecanismos de activación de apoptosis identificados en los SMD de bajo riesgo

En la segunda parte de esta tesis doctoral se llevó a cabo un análisis funcional, de la expresión génica y de los factores solubles relacionados con la **angiogénesis** en la MO de los pacientes con SMD.

La medida de la microvasculatura ha sido una de las técnicas más utilizadas para evidenciar la disregulación de la angiogénesis en los SMD ^{117,119,120,123}. Sin embargo, la demostración mediante técnicas funcionales de este hecho así como la participación del microambiente en este trastorno (resaltado en muchos trabajos como fundamental), no ha sido puesta de manifiesto en la MO, ya que la mayoría de los estudios se basan en la medida de los niveles de ciertos factores angiogénicos en la SP ^{117,119,122}. Basados en todo ello, se llevaron a cabo dos estudios funcionales donde se pudo demostrar la implicación directa del microambiente en la angiogénesis de la MO de los pacientes con

SMD. Más concretamente, en este trabajo se cuantificó la **proliferación** de las células endoteliales en presencia de sobrenadante de MO y la **formación de capilares** por estas células también en presencia del microambiente medular. Es importante destacar que para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron dos líneas celulares endoteliales, de las cuales una de ellas (BMEC-1) procede de MO humana. Hasta el momento esta línea celular nunca había sido utilizada para esta clase de experimentos y es posible que sus características la hagan la más adecuada para demostrar este tipo de procesos en la MO de los pacientes. El ensayo de proliferación demostró que el sobrenadante de la MO de los SMD estimula la proliferación de las células endoteliales en relación con el microambiente medular de los controles sin hemopatías malignas. Además los SMD presentaron diferencias de espesor, estructura y densidad en la formación de capilares en comparación con la MO normal (Tabla 11). Estos resultados están en concordancia con la angiogénesis aberrante previamente descrita en estas enfermedades ¹²³⁻¹²⁵. Asimismo, estos hallazgos aportan datos nuevos acerca del papel de las células endoteliales de la MO y del microambiente medular en la angiogénesis de los SMD. Cabe destacar además que la formación de capilares fue distinta en los subgrupos de SMD: los pacientes con CRDM presentaban redes capilares menos extensas y más cerradas y una formación de vasos más reducida (Tabla 11). Este hecho sugiere que los resultados contradictorios publicados hasta el momento en relación con la angiogénesis en los SMD pudieran ser debidos a que este proceso se desarrolla de manera diferente en las distintas entidades incluidas en los SMD.

Se ha demostrado que las células leucémicas pueden tener interacciones íntimas con las células endoteliales de la MO (BMEC), lo que puede provocar el crecimiento de vasos nuevos a partir de capilares preexistentes mediante la liberación activa de factores angiogénicos ^{124,125,210}. Con el fin de determinar si ésta podría ser una explicación para el comportamiento anormal de las BMEC, previamente observado en nuestros estudios funcionales, centramos nuestra atención en el **análisis transcripcional** de varias moléculas angiogénicas en células mononucleares de la MO de

pacientes con SMD. Así se observó que **VEGF**, **HIF1** y **FN1** estaban sobreexpresados en los SMD de bajo riesgo (incluido el subtipo de CRDM) respecto a los controles (Tabla 11). Estos hallazgos están en la misma línea que algunos trabajos publicados hasta la fecha que observan un incremento significativo de los factores angiogénicos en el conjunto de los SMD ¹²⁰. Además la sobreexpresión de estos genes podría estar influyendo en el comportamiento aberrante de las células endoteliales en los SMD de bajo riesgo. Cabe destacar además que en los pacientes con CRDM mostraron los valores más altos de expresión respecto al resto de pacientes con SMD de bajo riesgo (Tabla 11).

Sin embargo, la angiogénesis implica dos etapas del desarrollo vascular: el crecimiento diferencial, y la formación de tubos endoteliales y la remodelación de la red endotelial primaria en un sistema circulatorio maduro. El gen de **ENG** codifica una proteína transmembrana que se requiere para ambos procesos ^{133,211} por lo que es un buen marcador para cuantificar la angiogénesis tumoral ²¹². Curiosamente, al evaluar los niveles de expresión de **ENG** en los SMD de bajo riesgo se pudo observar una infraexpresión de **ENG** en pacientes con CRDM respecto al resto de SMD de bajo riesgo y respecto a los controles (Tabla 11). Este hallazgo podría compararse con lo observado en otras enfermedades vasculares tales como la telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (THH). Los enfermos con THH tienen niveles significativamente menores de **ENG** y se caracterizan por malformaciones arteriovenosas y la pérdida focal de capilares ²¹³. Además, algunos estudios han descrito ratones Eng+/- cuyas células muestran una menor formación de tubos capilares y una alteración en dicha formación, en comparación con ratones de tipo salvaje ²¹⁴. Basándonos en estos hallazgos, nuestro estudio sugiere que la “insuficiente” expresión de **ENG** en pacientes con CRDM podría estar asociada con la disminución en la formación de vasos en nuestro modelo *in vitro* de angiogénesis observada en el mismo grupo de pacientes.

Los resultados de la expresión de *ENG* en células mononucleares nos llevaron a investigar su **presencia en el microambiente medular (sENG)**, con el fin de valorar su influencia directa en las células endoteliales. También se midieron los niveles del factor anti-angiogénico **sFLT-1** y el factor angiogénico **sVEGF**. Así, los pacientes con CRDM presentaron los niveles más altos de sENG y sFLT-1 con respecto al resto de SMD de bajo riesgo y al grupo control. Sin embargo, los niveles de sVEGF fueron similares a los controles (Tabla 11). Se ha demostrado que la forma soluble de ENG es antagonista de la forma unida a la membrana y por lo tanto, potencia la acción anti-angiogénica de sFLT-1^{133,212}. Además, algunos estudios han mostrado que sFLT-1 se une y neutraliza la acción pro-angiogénica de sVEGF²¹⁵. Este hallazgo podría explicar la secreción “mitigada” de sVEGF observada en pacientes con CRDM en relación con la expresión del gen en el mismo grupo de pacientes.

Tabla 11. Visión general de la angiogénesis en los SMD

		CRDM	SMD de bajo riesgo (excepto CRDM)	SMD de alto riesgo
Expresión génica en las células mononucleares de MO	<i>ENG</i>	↓	Normal	Normal - ↑
	<i>VEGF</i>	↑↑	↑	Normal
	<i>HIF1</i>	↑↑	↑	Normal
	<i>FN1</i>	↑↑	↑	Normal
Niveles solubles en el microambiente medular (espacio extracelular)	sENG	↑↑	Normal	Normal
	sVEGF	Normal	Normal	Normal
	sFLT-1	↑↑	Normal	Normal
Linea endotelial en presencia del microambiente medular	Proliferación	↑	↑	↑
	Capilares	Reducidos	Gruesos	Gruesos

La angiogénesis es un proceso equilibrado entre los factores pro y anti-angiogénicos. Nuestros hallazgos sugieren una pérdida de este equilibrio en los pacientes con CRDM. De hecho, estos pacientes mostraron altos niveles de expresión de factores pro-angiogénicos tales como *VEGF*, *HIF1*, y *FN1* en las células

mononucleadas de la MO. Sin embargo, este grupo de SMD presentó una baja expresión del factor pro-angiogénico *ENG*. A esto hay que añadir los altos niveles de los factores con características anti-angiogénicas de sENG y sFLT-1 en el microambiente medular y la disminución de sVEGF respecto a la expresión génica probablemente debida al secuestro de esta proteína por sFLT-1. En base a estos resultados se podría sugerir que las características anti-angiogénicas del microambiente medular de los pacientes con CRDM podrían explicar las redes capilares menos extensas y más cerradas y la formación de vasos más reducida de estos pacientes observadas en nuestros estudios funcionales (Figura 15).

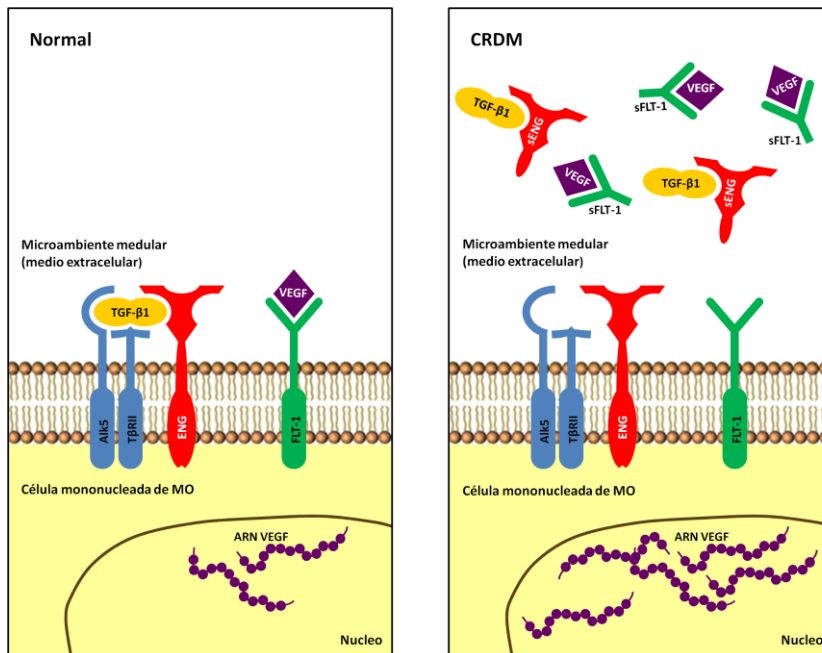


Figura 15. Modelo que incluye las características anti-angiogénicas del microambiente medular observadas en los enfermos con CRDM

En cuanto al aumento de la proliferación de las células endoteliales existen evidencias contradictorias: bien es cierto, que la proliferación de células endoteliales es un evento clave en la angiogénesis. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que

las neoplasias mieloides con altos niveles de sENG se caracterizan por una alta tasa de proliferación celular endotelial, lo que podría explicar la proliferación elevada, en un posible ambiente anti-angiogénico de los pacientes con CRDM ^{137,214}.

Los pacientes con CRDM constituyen una entidad que ha sido recientemente propuesta por la clasificación de la OMS como un trastorno específico dentro de los SMD ² y nunca antes había sido incluida como un grupo independiente en dichos estudios ^{120,123}. En el presente trabajo se muestran marcadas diferencias en la angiogénesis entre los subtipos de SMD y más concretamente presenta un patrón distinto de este proceso en los casos con CRDM. Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos en los mecanismos moleculares de los pacientes con CRDM que podrían estar relacionados con la ENG. Además, la inhibición de la proteasa encargada de la liberación de sENG al medio extracelular podría proporcionar nuevos enfoques terapéuticos para este subtipo de SMD.

En la tercera parte de este trabajo de tesis doctoral, tratamos de identificar los genes que están comúnmente desregulados en relación con el **metabolismo del hierro y mitocondrial** en pacientes con ARSA, con el fin de determinar su participación en los acúmulos de hierro característicos de esta entidad.

Los pacientes con ARSA presentaron un **perfil de expresión** génico particular. El metabolismo del hierro y mitocondrial constituyó la categoría más afectada y los genes presentaban mayor expresión en los pacientes con ARSA que en los controles o el grupo de CRDU, representado el 38% y el 33% del total de genes sobreexpresados, respectivamente. **GDF15** es un gen sensible a la depleción de hierro que mostró la mayor sobreexpresión en pacientes con ARSA. Dicha sobreexpresión podría ser una consecuencia de la acumulación de hierro dentro de la mitocondria y por lo tanto de la baja concentración de hierro en el citoplasma. En nuestro trabajo también se observó una mayor expresión de seis genes: *ALAD*, *HMBS*, *UROS*, *UROD*, *CPOX* y *PPOX*, que

codifican enzimas que catalizan la biosíntesis de grupo hemo, algunos de los cuales ya habían sido descritos como sobreexpresados en las células CD34+ de los pacientes con ARSA¹⁴¹. Además es importante destacar la sobreexpresión del gen **ABCB6** implicado en el transporte de coproporfirinógeno III desde el citoplasma a la mitocondria (también como parte del proceso de formación del hemo)^{140,216}. Nueve genes estaban relacionados con la homeostasis celular de iones de hierro, de los cuales *TF*, *TFR2*, *TFRC*, *FXN*, *SLC25A37* y *SCL25A38* estaban sobreexpresados en pacientes con ARSA. **SLC25A37** contribuye a la adquisición de hierro mitocondrial en células de mamíferos, ya que su disminución reduce drásticamente el hierro dentro de la mitocondria^{217,218}. Nuestros resultados sugieren por tanto, que este gen podría estar implicado en los acúmulos de hierro que presentan los pacientes con ARSA.

El gen **ALAD** codifica para una enzima citosólica que cataliza la condensación de dos moléculas de ácido D-aminolevulínico (ALA) para formar porfobilinógeno (PBG) en la segunda etapa de la ruta de biosíntesis de grupo hemo²¹⁹. En nuestro estudio se identificaron dos polimorfismos ya descritos en el exón 6 y, curiosamente, la presencia de uno de ellos estaba condicionada siempre por la presencia del otro, situado a 49 pares de bases del primero. Cabe destacar que la aparición conjunta de los dos polimorfismos ("haplotipo polimórfico") era más común en los SMD con sideroblastos en anillo (18%) que en resto de grupos analizados (6%). La presencia de haplotipos se ha relacionado con la desregulación algunos genes en diferentes neoplasias hematológicas, tales como la leucemia linfática crónica y la leucemia aguda linfoblástica^{220,221}. Basados en estos datos, la presencia de este "haplotipo polimórfico" podría estar implicada en la sobreexpresión del gen *ALAD* en los pacientes con ARSA, y por tanto, podría estar contribuyendo a la desregulación del metabolismo del hierro y mitocondrial en los SMD con sideroblastos en anillo.

La técnica de secuenciación masiva y la posterior secuenciación convencional del gen *ALAD* permitieron además identificar dos cambios no descritos en dos pacientes

con ARSA. Estos cambios se detectaron en el 4% de los casos con sideroblastos en anillo y se situaban muy próximos entre sí en el exón 7. A pesar de que estas variaciones fueron detectadas también en las células CD3+ de la SP de los pacientes afectados y en dos familiares de uno de ellos, no fueron halladas en los controles o en otros SMD de bajo riesgo analizados. Además, ambas variaciones daban lugar a un cambio de aminoácido en su secuencia proteica. Por otro lado, la misma cohorte de pacientes con ARSA fue utilizada para el análisis mutacional de *SF3B1*, recientemente descrito como mutado en un alto porcentaje de SMD con sideroblastos en anillo. Curiosamente, los dos pacientes que presentaban variaciones en *ALAD* se encontraban entre el 30% de los casos con sideroblastos en anillo que no presentan mutaciones en *SF3B1*. Estos resultados sugieren que estas variaciones podrían tener un posible papel en la predisposición a la enfermedad y podrían estar contribuyendo a la patogénesis de la ARSA.

SLC25A38 es un gen que ha sido implicado en la patogénesis de la anemia sideroblástica congénita debido a la presencia de mutaciones en su secuencia ²²². Este gen fue incluido en nuestro estudio mutacional y fue analizado en los SMD de bajo riesgo y en un único caso con anemia sideroblástica congénita. Los resultados mostraron que este caso tenía una mutación diferente de las mutaciones descritas previamente para esta enfermedad ²²², a pesar de que se encontraba localizada en la misma posición que una de ellas. La enferma portaba un cambio 187R>Q en su secuencia proteica mientras que la mutación anteriormente descrita daba lugar al cambio 187R>P. Curiosamente, cuando este gen fue secuenciado en un grupo de casos con CRDU, se detectó una nueva mutación en el exón 4 de uno de los casos estudiados. La mutación daba lugar un cambio de aminoácido en su secuencia proteica (97V>A). Sin embargo, no se encontraron mutaciones en ninguno de los casos con sideroblastos en anillo. Todo ello sugiere que puedan ser otros los mecanismos que podrían estar dando lugar a la sobreexpresión de este gen en pacientes con ARSA. Además, estos resultados indican que las mutaciones del gen *SLC25A38* no son exclusivas de la anemia

sideroblástica congénita y por tanto, existen otras variaciones en este gen que podrían estar relacionadas con los SMD de bajo riesgo.

En resumen, el trabajo de investigación llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis doctoral ha permitido identificar, gracias a un análisis global (transcriptoma-metiloma-genoma), varias alteraciones que aportan nueva información acerca de la patogénesis de los SMD de bajo riesgo y que podrían tener relevancia clínica para esta enfermedad. En primer lugar, la integración de los datos procedentes de los arrays de expresión y metilación ha permitido describir la desregulación epigenética de *DICER1*, *IL27RA*, *BCL2* y *ETS1*. Los estudios funcionales en los SMD de bajo riesgo han demostrado una angiogénesis aberrante en los pacientes con CRDM que podría estar relacionada con *ENG*. Finalmente, el estudio combinado de la expresión y el estado mutacional ha permitido identificar nuevas variaciones en el gen *ALAD* en los pacientes con ARSA que podría estar desempeñando un papel en la predisposición a la enfermedad. En conjunto, todos los genes descritos en esta tesis doctoral podrían estar contribuyendo con la patogénesis de los SMD de bajo riesgo y, en un futuro podrían considerarse como marcadores diagnósticos e incluso, en algunos casos, como posibles dianas terapéuticas. Por consiguiente, estos resultados confirman que los SMD son una enfermedad muy heterogénea. Además resaltan la utilidad de las técnicas de análisis masivo (microarrays y secuenciación masiva) en el estudio del cáncer en general y de los SMD en particular, al tratarse de una enfermedad heterogénea a nivel clínico y molecular.

Conclusiones

1. Los enfermos con SMD de bajo riesgo presentan un perfil de expresión génica característico y diferente a los enfermos sin hemopatías malignas.

2. El análisis del perfil de expresión génica de los enfermos con SMD de bajo riesgo demuestra que el desarrollo celular, las modificaciones post-traduccionales y la respuesta inmune son las funciones moleculares y celulares alteradas con más frecuencia en estos pacientes. Además, el crecimiento y la proliferación celular son los procesos con un mayor número de genes diferencialmente expresados respecto al grupo de enfermos sin hemopatías malignas.

3. Los enfermos con SMD de bajo riesgo tienen un perfil de metilación característico en el que la hipermetilación de los genes es un proceso más frecuente que la hipometilación.

4. La integración de los datos procedentes de los microarrays de expresión y de metilación demuestra que el 66.7% de los genes hipermetilados en los SMD de bajo riesgo también presentan infraexpresión. Los resultados de este estudio revelan que la infraexpresión de los genes *DICER1*, *BCL2*, *ETS1* e *IL27RA* está motivada por una desregulación epigenética. La alteración de estos genes puede determinar cambios en las funciones celulares en las que están implicados el procesamiento del ARN, la apoptosis, la regulación génica y la respuesta inmune.

5. Los estudios funcionales en los SMD de bajo riesgo ponen de manifiesto la existencia de una angiogénesis aberrante en la médula ósea de estos pacientes. La activación de este proceso es claramente diferente en los subtipos de SMD de bajo riesgo.

6. Los enfermos con citopenia refractaria con displasia multilineal se caracterizan por presentar una baja expresión de *ENG* asociada con altos niveles de sENG y sFLT1 en el sobrenadante de la médula ósea así como disminución de sVEGF y una formación de pseudocapilares deficiente, lo que podría estar produciendo un desequilibrio en los procesos angiogénicos.

7. El perfil de expresión génica ha permitido diferenciar el grupo de las ARSA del conjunto de enfermos sin hemopatías malignas y de los pacientes con CRDU. Una gran cantidad de genes sobreexpresados en las ARSA están implicados en el metabolismo del hierro y mitocondrial. Este hecho podría justificar las alteraciones morfológicas observadas en esta entidad.

8. El estudio combinado de la expresión y del estado mutacional ha permitido la identificación y caracterización de nuevas alteraciones en los SMD con sideroblastos en anillo:

- El 4% de los enfermos con sideroblastos en anillo tienen variaciones en el gen *ALAD*, que podrían estar implicadas en su patogénesis y predisposición a la enfermedad. En estos enfermos no se han observado mutaciones del gen *SF3B1*.
- La sobreexpresión del gen *SLC25A37* en pacientes con sideroblastos en anillo no es debida a variaciones en su secuencia.
- Las mutaciones en el gen *SLC25A38* no son exclusivas de las ARSA congénitas sino que también pueden producirse en enfermos con SMD adquirido

Bibliografía

1. Cazzola, M. & Malcovati, L. Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 536-538 (2005).
2. Germing, U. *et al.* No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **89**, 905-910 (2004).
3. Phekoo, K. J., Richards, M. A., Moller, H. & Schey, S. A. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica* **91**, 1400-1404 (2006).
4. Williamson, P. J., Kruger, A. R., Reynolds, P. J., Hamblin, T. J. & Oscier, D. G. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* **87**, 743-745 (1994).
5. Catenacci, D. V. & Schiller, G. J. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood Rev.* **19**, 301-319 (2005).
6. Chen, B. *et al.* Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries. *Leukemia* **19**, 767-775 (2005).
7. Irons, R. D. *et al.* Prevalence of MDS subtypes in Shanghai, China: a comparison of the World Health Organization and French American British classifications. *Leuk. Res.* **30**, 769-775 (2006).
8. Chatterjee, T. *et al.* Clinical, haematological and histomorphological profile of adult myelodysplastic syndrome. Study of 96 cases in a single institute. *Eur. J. Haematol.* **73**, 93-97 (2004).
9. Wong, K. F. & So, C. C. Hypoplastic myelodysplastic syndrome-a clinical, morphologic, or genetic diagnosis?. *Cancer Genet. Cytogenet.* **138**, 85-88 (2002).
10. Vallespi, T., Imbert, M., Mecucci, C., Preudhomme, C. & Fenaux, P. Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **83**, 258-275 (1998).

11. Kantarjian, H. *et al.* The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndromes. *Cancer* **109**, 1705-1714 (2007).
12. Malcovati, L. *et al.* Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7594-7603 (2005).
13. Sanz, G. F. *et al.* Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood* **74**, 395-408 (1989).
14. Williamson, P. J., Oscier, D. G., Bell, A. J. & Hamblin, T. J. Red cell aplasia in myelodysplastic syndrome. *J. Clin. Pathol.* **44**, 431-432 (1991).
15. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **51**, 189-199 (1982).
16. Vardiman, J. W., Harris, N. L. & Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292-2302 (2002).
17. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937-951 (2009).
18. Greenberg, P. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**, 2079-2088 (1997).
19. Malcovati, L. *et al.* Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3503-3510 (2007).
20. Greenberg, P. L. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **120**, 2454-2465 (2012).
21. Bernasconi, P. *et al.* World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **137**, 193-205 (2007).

22. Haase, D. *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* **110**, 4385-4395 (2007).
23. Sole, F. *et al.* Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **90**, 1168-1178 (2005).
24. Wong, A. K. *et al.* Loss of the Y chromosome: an age-related or clonal phenomenon in acute myelogenous leukemia/myelodysplastic syndrome?. *Arch. Pathol. Lab Med.* **132**, 1329-1332 (2008).
25. Pozdnyakova, O. *et al.* Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer* **113**, 3331-3340 (2008).
26. Schanz, J. *et al.* New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J. Clin. Oncol.* **30**, 820-829 (2012).
27. Tefferi, A. & Vardiman, J. W. Myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1872-1885 (2009).
28. Herman, J. G. & Baylin, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042-2054 (2003).
29. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148-1159 (2008).
30. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080 (2001).
31. Brinkman, A. B., Pennings, S. W., Braliou, G. G., Rietveld, L. E. & Stunnenberg, H. G. DNA methylation immediately adjacent to active histone marking does not silence transcription. *Nucleic Acids Res.* **35**, 801-811 (2007).
32. Figueroa, M. E. *et al.* An integrative genomic and epigenomic approach for the study of transcriptional regulation. *PLoS. One.* **3**, e1882 (2008).

33. Jones, P. A. & Laird, P. W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* **21**, 163-167 (1999).
34. Singal, R. & Ginder, G. D. DNA methylation. *Blood* **93**, 4059-4070 (1999).
35. Esteller, M. *et al.* Cancer epigenetics and methylation. *Science* **297**, 1807-1808 (2002).
36. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-692 (2007).
37. Bennett, L. B. *et al.* DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes. Cancer* **48**, 828-841 (2009).
38. Nakamaki, T. *et al.* Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes, p15, p16, p18 and p19 in the myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* **21**, 235-240 (1997).
39. Quesnel, B. *et al.* Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* **91**, 2985-2990 (1998).
40. Uchida, T. *et al.* Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* **90**, 1403-1409 (1997).
41. Jiang, Y. *et al.* Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* **113**, 1315-1325 (2009).
42. Boulwood, J. *et al.* Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br. J. Haematol.* **139**, 578-589 (2007).
43. Aggerholm, A., Holm, M. S., Guldborg, P., Olesen, L. H. & Hokland, P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur. J. Haematol.* **76**, 23-32 (2006).
44. Shen, L. *et al.* DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* **28**, 605-613 (2010).
45. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).

46. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228-234 (2009).
47. Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.* **66**, 7390-7394 (2006).
48. Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 857-866 (2006).
49. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-838 (2005).
50. Dostalova, M. M. *et al.* Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **19**, 313-319 (2011).
51. Erdogan, B. *et al.* Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Exp. Hematol.* **39**, 915-926 (2011).
52. Hussein, K. *et al.* Aberrant microRNA expression pattern in myelodysplastic bone marrow cells. *Leuk. Res.* **34**, 1169-1174 (2010).
53. Sokol, L. *et al.* Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* **153**, 24-32 (2011).
54. Pons, A. *et al.* Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma* **50**, 1854-1859 (2009).
55. Rhyasen, G. W. & Starczynowski, D. T. Deregulation of microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **26**, 13-22 (2012).
56. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306 (1980).
57. Greenberg, P. L. Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leuk. Res.* **22**, 1123-1136 (1998).
58. Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C. & Kerr, J. F. Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* **13**, 18-54 (1988).

59. Wyllie, A. H. The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res.* **5**, 131-136 (1985).
60. Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 647-656 (2002).
61. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512 (1995).
62. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456 (1995).
63. Parker, J. E. & Mufti, G. J. The myelodysplastic syndromes: a matter of life or death. *Acta Haematol.* **111**, 78-99 (2004).
64. Zang, D. Y., Goodwin, R. G., Loken, M. R., Bryant, E. & Deeg, H. J. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis. *Blood* **98**, 3058-3065 (2001).
65. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489 (1997).
66. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157 (1996).
67. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).
68. Desagher, S. *et al.* Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* **144**, 891-901 (1999).
69. Hsu, Y. T., Wolter, K. G. & Youle, R. J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 3668-3672 (1997).
70. Schendel, S. L. *et al.* Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 5113-5118 (1997).

71. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628 (1996).
72. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. & Martinou, J. C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.* **20**, 929-935 (2000).
73. Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. & Nunez, G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 4386-4391 (1998).
74. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619 (1993).
75. Yang, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132 (1997).
76. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 277-288 (2002).
77. Parker, J. E. *et al.* The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* **96**, 3932-3938 (2000).
78. Raza, A. *et al.* Simultaneous assessment of cell kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplastics reveals extensive apoptosis as the probable basis for ineffective hematopoiesis. *Am. J. Hematol.* **48**, 143-154 (1995).
79. Raza, A. *et al.* Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* **86**, 268-276 (1995).
80. Parker, J. E. *et al.* 'Low-risk' myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br. J. Haematol.* **103**, 1075-1082 (1998).

81. Li, X., Bryant, C. E. & Deeg, H. J. Simultaneous demonstration of clonal chromosome abnormalities and apoptosis in individual marrow cells in myelodysplastic syndrome. *Int. J. Hematol.* **80**, 140-145 (2004).
82. Bernasconi, P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions-a review. *Br. J. Haematol.* **142**, 695-708 (2008).
83. Campioni, D. *et al.* Evidence for a role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the anemia of myelodysplastic syndromes. *Am. J. Pathol.* **166**, 557-563 (2005).
84. Bouscary, D. *et al.* Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **11**, 839-845 (1997).
85. Hellstrom-Lindberg, E. *et al.* Apoptosis in refractory anaemia with ringed sideroblasts is initiated at the stem cell level and associated with increased activation of caspases. *Br. J. Haematol.* **112**, 714-726 (2001).
86. Boudard, D. *et al.* Expression and activity of caspases 1 and 3 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **14**, 2045-2051 (2000).
87. Bouscary, D. *et al.* Activity of the caspase-3/CPP32 enzyme is increased in "early stage" myelodysplastic syndromes with excessive apoptosis, but caspase inhibition does not enhance colony formation in vitro. *Exp. Hematol.* **28**, 784-791 (2000).
88. Claessens, Y. E. *et al.* In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood* **99**, 1594-1601 (2002).
89. Fontenay-Roupie, M. *et al.* Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *Br. J. Haematol.* **106**, 464-473 (1999).
90. Mundle, S. D. *et al.* Correlation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) with high Caspase 3-like activity in myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett.* **140**, 201-207 (1999).

91. Mundle, S. D. *et al.* Evidence for involvement of tumor necrosis factor-alpha in apoptotic death of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *Am. J. Hematol.* **60**, 36-47 (1999).
92. Gattermann, N. From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* **24**, 141-151 (2000).
93. Span, L. F. *et al.* Programmed cell death is an intrinsic feature of MDS progenitors, predominantly found in the cluster-forming cells. *Exp. Hematol.* **33**, 435-442 (2005).
94. Hellstrom-Lindberg, E., Kanter-Lewensohn, L. & Ost, A. Morphological changes and apoptosis in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes treated with granulocyte-CSF and erythropoietin. *Leuk. Res.* **21**, 415-425 (1997).
95. Parker, J. E. & Mufti, G. J. The role of apoptosis in the pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Int. J. Hematol.* **73**, 416-428 (2001).
96. Papavassiliou, A. G. Molecular medicine. Transcription factors. *N. Engl. J. Med.* **332**, 45-47 (1995).
97. Nolte, F. & Hofmann, W. K. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann. Hematol.* **87**, 777-795 (2008).
98. Nucifora, G., Laricchia-Robbio, L. & Senyuk, V. EVI1 and hematopoietic disorders: history and perspectives. *Gene* **368**, 1-11 (2006).
99. Buonamici, S. *et al.* EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice. *J. Clin. Invest* **114**, 713-719 (2004).
100. Vyas, P., Ault, K., Jackson, C. W., Orkin, S. H. & Shivdasani, R. A. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* **93**, 2867-2875 (1999).
101. Hopfer, O. *et al.* Epigenetic dysregulation of GATA1 is involved in myelodysplastic syndromes dyserythropoiesis. *Eur. J. Haematol.* **88**, 144-153 (2012).
102. Harada, H., Harada, Y., Tanaka, H., Kimura, A. & Inaba, T. Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-

- related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood* **101**, 673-680 (2003).
103. Saif, M. W., Hopkins, J. L. & Gore, S. D. Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **43**, 2083-2092 (2002).
 104. Greenberg, P. L., Young, N. S. & Gattermann, N. Myelodysplastic syndromes. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 136-161 (2002).
 105. Ogata, K. *et al.* Identification and hematopoietic potential of. *Stem Cells* **23**, 619-630 (2005).
 106. Chamuleau, M. E. *et al.* Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* **94**, 496-506 (2009).
 107. Fozza, C. *et al.* Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4(+) subset and oligoclonal in the CD8(+) subset. *Exp. Hematol.* **37**, 947-955 (2009).
 108. Fenaux, P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin. Hematol.* **41**, 6-12 (2004).
 109. Sloand, E. M. *et al.* Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood* **106**, 841-851 (2005).
 110. Jonasova, A. *et al.* Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* **100**, 304-309 (1998).
 111. Killick, S. B. *et al.* A pilot study of antithymocyte globulin (ATG) in the treatment of patients with 'low-risk' myelodysplasia. *Br. J. Haematol.* **120**, 679-684 (2003).
 112. Molldrem, J. J. *et al.* Antithymocyte globulin for treatment of the bone marrow failure associated with myelodysplastic syndromes. *Ann. Intern. Med.* **137**, 156-163 (2002).

113. Deeg, H. J. *et al.* Hematologic responses of patients with MDS to antithymocyte globulin plus etanercept correlate with improved flow scores of marrow cells. *Leuk. Res.* **28**, 1177-1180 (2004).
114. Kochenderfer, J. N., Kobayashi, S., Wieder, E. D., Su, C. & Molldrem, J. J. Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood* **100**, 3639-3645 (2002).
115. Pepper, M. S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 21-43 (1997).
116. Hillen, F. & Griffioen, A. W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 489-502 (2007).
117. Aguayo, A. *et al.* Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* **96**, 2240-2245 (2000).
118. Longo, V., Vacca, A. & Ribatti, D. Imaging and angiogenesis in hematological malignancies. *Leukemia* **21**, 1605 (2007).
119. Alexandrakis, M. G. *et al.* Relation between bone marrow angiogenesis and serum levels of angiogenin in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* **29**, 41-46 (2005).
120. Keith, T. *et al.* Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia. *Br. J. Haematol.* **137**, 206-215 (2007).
121. Pruneri, G. *et al.* Angiogenesis occurs in hairy cell leukaemia (HCL) and in NOD/SCID mice transplanted with the HCL line Bonna-12. *Br. J. Haematol.* **120**, 695-698 (2003).
122. Aguayo, A. *et al.* Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer* **95**, 1923-1930 (2002).
123. Pruneri, G. *et al.* Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br. J. Cancer* **81**, 1398-1401 (1999).

124. Campioni, D. *et al.* "In vitro" evaluation of bone marrow angiogenesis in myelodysplastic syndromes: a morphological and functional approach. *Leuk. Res.* **28**, 9-17 (2004).
125. la Porta, M. G. *et al.* Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **22**, 530-537 (2008).
126. Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M. & Kumar, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* **17**, 984-992 (2003).
127. Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M. R., Natali, P. G. & Maio, M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene* **22**, 6557-6563 (2003).
128. Miller, D. W. *et al.* Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int. J. Cancer* **81**, 568-572 (1999).
129. Craft, C. S., Romero, D., Vary, C. P. & Bergan, R. C. Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway. *Oncogene* **26**, 7240-7250 (2007).
130. Liu, Y., Jovanovic, B., Pins, M., Lee, C. & Bergan, R. C. Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* **21**, 8272-8281 (2002).
131. Velasco-Loyden, G., Arribas, J. & Lopez-Casillas, F. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 7721-7733 (2004).
132. Ten, D. P., Goumans, M. J. & Pardali, E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis.* **11**, 79-89 (2008).
133. Venkatesha, S. *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* **12**, 642-649 (2006).
134. Li, C. *et al.* Role of transforming growth factor beta3 in lymphatic metastasis in breast cancer. *Int. J. Cancer* **79**, 455-459 (1998).

135. Li, C. *et al.* Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* **89**, 122-126 (2000).
136. Takahashi, N. *et al.* Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin. Cancer Res.* **7**, 524-532 (2001).
137. Calabro, L. *et al.* Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J. Cell Physiol* **194**, 171-175 (2003).
138. Nikpour, M. *et al.* Gene expression profiling of erythroblasts from refractory anaemia with ring sideroblasts (RARS) and effects of G-CSF. *Br. J. Haematol.* **149**, 844-854 (2010).
139. Cuijpers, M. L., Raymakers, R. A., Mackenzie, M. A., de Witte, T. J. & Swinkels, D. W. Recent advances in the understanding of iron overload in sideroblastic myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* **149**, 322-333 (2010).
140. Krishnamurthy, P., Xie, T. & Schuetz, J. D. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol. Ther.* **114**, 345-358 (2007).
141. Pellagatti, A. *et al.* Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferon-stimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. *Blood* **108**, 337-345 (2006).
142. Flatmark, T. & Romslo, I. Energy-dependent accumulation of iron by isolated rat liver mitochondria. Requirement of reducing equivalents and evidence for a unidirectional flux of Fe(II) across the inner membrane. *J. Biol. Chem.* **250**, 6433-6438 (1975).
143. Williams, D. M., Loukopoulos, D., Lee, G. R. & Cartwright, G. E. Role of copper in mitochondrial iron metabolism. *Blood* **48**, 77-85 (1976).
144. Gattermann, N., Aul, C. & Schneider, W. Is acquired idiopathic sideroblastic anemia (AISA) a disorder of mitochondrial DNA?. *Leukemia* **7**, 2069-2076 (1993).
145. Aoki, Y. Multiple enzymatic defects in mitochondria in hematological cells of patients with primary sideroblastic anemia. *J. Clin. Invest* **66**, 43-49 (1980).

146. Gattermann, N. *et al.* A heteroplasmic point mutation of mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) in non-lymphoid haemopoietic cell lineages from a patient with acquired idiopathic sideroblastic anaemia. *Br. J. Haematol.* **93**, 845-855 (1996).
147. Gattermann, N. *et al.* Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Blood* **90**, 4961-4972 (1997).
148. Wang, Y. L., Choi, H. K., Aul, C., Gattermann, N. & Heinisch, J. The MERRF mutation of mitochondrial DNA in the bone marrow of a patient with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Am. J. Hematol.* **60**, 83-84 (1999).
149. Boultonwood, J. *et al.* The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts. *PLoS. One.* **3**, e1970 (2008).
150. Steensma, D. P., Hecksel, K. A., Porcher, J. C. & Lasho, T. L. Candidate gene mutation analysis in idiopathic acquired sideroblastic anemia (refractory anemia with ringed sideroblasts). *Leuk. Res.* **31**, 623-628 (2007).
151. Cazzola, M. *et al.* Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood* **101**, 1996-2000 (2003).
152. van de Loosdrecht, A. A. *et al.* Mitochondrial disruption and limited apoptosis of erythroblasts are associated with high risk myelodysplasia. An ultrastructural analysis. *Leuk. Res.* **25**, 385-393 (2001).
153. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511 (2000).
154. Bullinger, L. *et al.* Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1605-1616 (2004).
155. Ferrando, A. A. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75-87 (2002).
156. Gutierrez, N. C. *et al.* Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression

- patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* **21**, 541-549 (2007).
157. Lossos, I. S. *et al.* Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1828-1837 (2004).
 158. Margalit, O., Somech, R., Amariglio, N. & Rechavi, G. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. *Blood Rev.* **19**, 223-234 (2005).
 159. Pellagatti, A. *et al.* Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes using cDNA microarray technology. *Br. J. Haematol.* **125**, 576-583 (2004).
 160. Sigal, S., Ninette, A. & Rechavi, G. Microarray studies of prognostic stratification and transformation of follicular lymphomas. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **18**, 143-156 (2005).
 161. Miyazato, A. *et al.* Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* **98**, 422-427 (2001).
 162. Hofmann, W. K. *et al.* Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* **100**, 3553-3560 (2002).
 163. Sridhar, K., Ross, D. T., Tibshirani, R., Butte, A. J. & Greenberg, P. L. Relationship of differential gene expression profiles in CD34+ myelodysplastic syndrome marrow cells to disease subtype and progression. *Blood* **114**, 4847-4858 (2009).
 164. Pellagatti, A. *et al.* Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* **24**, 756-764 (2010).
 165. Sternberg, A. *et al.* Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood* **106**, 2982-2991 (2005).
 166. Mills, K. I. *et al.* Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome. *Blood* **114**, 1063-1072 (2009).

167. Vasikova, A., Budinska, E., Belickova, M., Cermak, J. & Bruchova, H. Differential gene expression of bone marrow CD34+ cells in early and advanced myelodysplastic syndrome. *Neoplasma* **56**, 335-342 (2009).
168. Bibikova, M. *et al.* High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* **98**, 288-295 (2011).
169. Estecio, M. R. *et al.* High-throughput methylation profiling by MCA coupled to CpG island microarray. *Genome Res.* **17**, 1529-1536 (2007).
170. Figueroa, M. E. *et al.* MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* **114**, 3448-3458 (2009).
171. Hopfer, O. *et al.* DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation. *Exp. Hematol.* **35**, 712-723 (2007).
172. Podolak, E. Sequencing's new race. *Biotechniques* **48**, 105-111 (2010).
173. Haferlach, T., Bacher, U., Haferlach, C., Kern, W. & Schnittger, S. Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 90-97 (2007).
174. Chapman, M. A. *et al.* Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467-472 (2011).
175. Mardis, E. R. *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1058-1066 (2009).
176. Puente, X. S. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101-105 (2011).
177. Cui, R. *et al.* Clinical importance of SF3B1 mutations in Chinese with myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Leuk. Res.* **36**, 1428-1433 (2012).
178. Damm, F. *et al.* SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: clinical associations and prognostic implications. *Leukemia* **26**, 1137-1140 (2012).

179. Damm, F. *et al.* Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood* **119**, 3211-3218 (2012).
180. Damm, F., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M. & Bernard, O. A. Spliceosome and other novel mutations in chronic lymphocytic leukemia and myeloid malignancies. *Leukemia* **26**, 2027-2031 (2012).
181. Makishima, H. *et al.* Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* **119**, 3203-3210 (2012).
182. Malcovati, L. *et al.* Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 6239-6246 (2011).
183. Matsuda, K. *et al.* Spliceosome-related gene mutations in myelodysplastic syndrome can be used as stable markers for monitoring minimal residual disease during follow-up. *Leuk. Res.* **36**, 1393-1397 (2012).
184. Ohba, R. *et al.* Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann. Hematol.* (2012).
185. Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1384-1395 (2011).
186. Visconte, V. *et al.* SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia* **26**, 542-545 (2012).
187. Visconte, V. *et al.* SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* **120**, 3173-3186 (2012).
188. Visconte, V., Makishima, H., Maciejewski, J. P. & Tiu, R. V. Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia* (2012).
189. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69 (2011).

190. Quesada, V. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* **44**, 47-52 (2012).
191. Rossi, D. *et al.* Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* **118**, 6904-6908 (2011).
192. Theilgaard-Monch, K. *et al.* Gene expression profiling in MDS and AML: potential and future avenues. *Leukemia* **25**, 909-920 (2011).
193. Galm, O., Herman, J. G. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev.* **20**, 1-13 (2006).
194. Martin-Subero, J. I. *et al.* A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS. One.* **4**, e6986 (2009).
195. Starczynowski, D. T. *et al.* Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. *Blood* **117**, 595-607 (2011).
196. Raaijmakers, M. H. *et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852-857 (2010).
197. Gary, D. J., Puri, N. & Won, Y. Y. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J. Control Release* **121**, 64-73 (2007).
198. Pflanz, S. *et al.* WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J. Immunol.* **172**, 2225-2231 (2004).
199. Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G., Kondoh, A. & Papas, T. S. High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene* **6**, 2249-2254 (1991).
200. Seth, A. & Watson, D. K. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur. J. Cancer* **41**, 2462-2478 (2005).
201. Arora, S. *et al.* Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with

- microvessel density, progression, and prognosis. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2272-2284 (2005).
202. Buggy, Y. *et al.* Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br. J. Cancer* **91**, 1308-1315 (2004).
203. Span, P. N. *et al.* Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* **21**, 8506-8509 (2002).
204. Carvalho, J. R. *et al.* Detailed analysis of expression and promoter methylation status of apoptosis-related genes in prostate cancer. *Apoptosis*. **15**, 956-965 (2010).
205. Friedrich, M. G. *et al.* Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7457-7465 (2004).
206. Kang, G. H. *et al.* DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis. *Lab Invest* **88**, 161-170 (2008).
207. Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**, 5400-5413 (2002).
208. Saville, M. K. *et al.* Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 42169-42181 (2004).
209. Thalappilly, S. *et al.* The p53 tumor suppressor is stabilized by inhibitor of growth 1 (ING1) by blocking polyubiquitination. *PLoS. One.* **6**, e21065 (2011).
210. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257 (2000).
211. Li, D. Y. *et al.* Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**, 1534-1537 (1999).
212. Lopez-Novoa, J. M. & Bernabeu, C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **299**, H959-H974 (2010).
213. Abdalla, S. A. & Letarte, M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J. Med. Genet.* **43**, 97-110 (2006).

214. Jerkic, M. *et al.* Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc. Res.* **69**, 845-854 (2006).
215. Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B. & Carmeliet, P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer* **8**, 942-956 (2008).
216. Krishnamurthy, P. C. *et al.* Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* **443**, 586-589 (2006).
217. Paradkar, P. N., Zumbrennen, K. B., Paw, B. H., Ward, D. M. & Kaplan, J. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1007-1016 (2009).
218. Shaw, G. C. *et al.* Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* **440**, 96-100 (2006).
219. Sassa, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* **28**, 133-145 (1982).
220. Martin-Guerrero, I. *et al.* A putative "hepitype" in the ATM gene associated with chronic lymphocytic leukemia risk. *Genes Chromosomes. Cancer* **50**, 887-895 (2011).
221. Rousseau, J. *et al.* ATF5 polymorphisms influence ATF function and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **118**, 5883-5890 (2011).
222. Guernsey, D. L. *et al.* Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat. Genet.* **41**, 651-653 (2009).